

THESE

Présentée à
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE1
Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille

par

SAMUEL MEIGNAN

IMPACT DE LA SUREXPRESSION DES RECEPTEURS DU NGF SUR LA CROISSANCE DES CELLULES DE CANCER DU SEIN

Soutenue le 4 Mars 2009 devant la commission d'examen :

Rapporteurs :

Dr. Nathalie THERET

Pr. Brian RUDKIN

Examineurs :

Pr. Corinne ABBADIE

Pr. Philippe BECUWE

Pr. Hubert HONDERMARCK

Directeur de thèse :

Pr. Xuefen LE BOURHIS

Remerciements,

Ces travaux ont été réalisés au sein du laboratoire INSERM U908 « Signalisation des facteurs de croissance dans le cancer du sein. Protéomique fonctionnelle » dirigé par le Professeur Hubert Hondermarck que je remercie pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour ses précieux conseils et ses critiques avisées.

Je tiens bien sur à remercier sincèrement ma directrice de thèse, le Professeur Xuefen Le Bourhris, pour son encadrement que j'aime à qualifier de « de luxe », fait de disponibilité, de patience, de conseils, de confiance, de riches enseignements, de gentillesse mais aussi d'une nécessaire fermeté parfois. Un grand merci pour m'avoir permis autant qu'aidé à mener ce travail à bien.

Je souhaite remercier vivement pour l'honneur qu'ils me font, le Docteur Nathalie Theret et le Professeur Brian Rudkin, qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que les Professeurs Corinne Abbadie et Philippe Becuwe qui ont accepté d'examiner mon travail.

Un très grand merci aux docteurs Chann Lagadec et Elsa Vanhecke. Chann pour m'avoir pris sous son aile et m'avoir appris tout les rudiments du parfait scientifique avec une patience qui m'échappe encore, méritant largement son titre de « maître Chane ». Elsa, intrépide colocataire, confidente et amie, pour l'art délicat de la biomol dont tu m'as fait don, pour tes conseils bien veillant et pour l'atmosphère délicieuse de notre cagibi.

Merci beaucoup également à tous les autres « acteurs » de cette épopée, pour leur présence, leur amitiés et pour toutes les précieuses leçons que je dois à chacun,

Les amis de la grande époque devenu docteurs; le turbulent et revitalisant Dr. Alessandro, l'exquisément folle Dr. Ginger, le booster de moral Dr. Emma et la souriante et indépendante Dr. Nath.

L'inclassable Yo, camarade d'infortune et très bientôt Dr. lui aussi je lui souhaite.

La brillante relève doctorale; mon fidèle et irremplaçable disciple Vaik, le maqueux mais néanmoins ami Rod, la jolie nourrisse de mon bébé p75 Stef, « Corbet! » et le trop craqué JP.

Et enfin, le piou-piou Thomas, que j'aurais aimé côtoyer davantage.

Merci aussi aux « grands » pour leur aide et leurs conseils,

L'exubérant Pr. Eric pour ses conseils et toutes les souris qu'il à bien voulu bichonner pour moi, Tof, architecte d'un labo que j'aurais aimé salir, Bob, râleur néanmoins mine d'informations et Manu, riche de bons conseils une fois décodés.

Sans oublier Valérie, Johann, Isabelle et Véronique, pour toutes ces petites choses indispensables que l'on oublie trop facilement.

En espérant que votre route à tous, scientifique et personnelle soit belle et croise de nouveau la mienne...

Un merci tout particulier à mes parents, jamais avares de soutien de toutes natures, sans qui tout ceci ne serait pas.

Je terminerais évidemment par remercier Nathalie, que dire sinon merci pour tout et le reste...

Résumé

Notre laboratoire fut le premier à démontrer l'effet mitogène et antiapoptotique du NGF sur les cellules de cancer du sein de façon autocrine. Cette action du NGF se fait *via* ses deux récepteurs membranaires : le récepteur à activité tyrosine kinase TrkA, et le récepteur p75^{NTR} appartenant à la superfamille du TNFR.

Afin de comprendre le rôle et les mécanismes d'action de ces deux récepteurs dans le cancer du sein, nous avons établi et caractérisé des modèles cellulaires MDA-MB-231 surexprimant TrkA ou p75^{NTR}.

Lors de mes travaux de thèse, j'ai montré que la surexpression de TrkA augmente la croissance, la migration et l'invasion des cellules. D'autre part, la surexpression de TrkA augmente la résistance des cellules aux apoptogènes et à l'anoïkis. *In vivo*, en souris immunodéficientes SCID, la surexpression de TrkA induit une augmentation de la croissance des tumeurs primaires et de la métastase dans les poumons, le foie et le cerveau. L'augmentation de la croissance tumorale est corrélée à une prolifération des cellules cancéreuses et à une angiogenèse accrue, tandis que la métastase est corrélée avec une augmentation de la résistance à l'anoïkis.

La surexpression de p75^{NTR} dans les cellules de cancer du sein entraîne quant à elle un ralentissement important de la croissance cellulaire du à un blocage du cycle en G1. Cependant, la surexpression de p75^{NTR} s'accompagne également d'une survie accrue aux apoptogènes. Nos investigations montrent que ces effets pourtant apparemment contradictoires sont tous deux le fruit d'une augmentation de l'expression de p21^{waf1} induite par la surexpression de p75^{NTR}. Malgré ces effets apparemment opposés observés *in vitro*, la surexpression de p75^{NTR} *in vivo* provoque une augmentation de la croissance des tumeurs primaires.

L'ensemble de ces résultats montre que la surexpression de TrkA et celle de p75^{NTR} augmentent l'agressivité des cellules cancéreuses de sein et ouvrent des perspectives encourageantes dans le développement de stratégies thérapeutiques contre le cancer du sein.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
SOMMAIRE DES FIGURES ET DES TABLES	2
INTRODUCTION	4
I. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCERISATION.....	5
I.A. LA GLANDE MAMMAIRE	5
I.A.1 Anatomie et histologie	5
I.A.1 Développement et contrôle	7
I.B. LE CANCER DU SEIN	9
I.B.1 Généralité	9
I.B.1.a Les différents types de cancer du sein	10
I.B.2 La tumorigenèse mammaire	13
I.B.2.a Altérations du génome.....	15
I.B.2.b Origine cellulaire du cancer du sein	18
I.B.2.c Rôle des facteurs de croissance	21
II. ROLE DU NGF ET DE SES RECEPTEURS DANS LE CANCER	23
II.A. LA NEUROTROPHINE NGF	23
II.A.1 Découverte	23
II.A.2 Structure : des gènes aux protéines.....	24
II.B. LE RECEPTEUR TRKA.....	25
II.B.1 Découverte	25
II.B.2 Le gène codant TrkA	26
II.B.3 La protéine TrkA	27
II.C. LE RECEPTEUR p75 ^{NTR}	29
II.C.1 Découverte	29
II.C.2 Le gène codant p75 ^{NTR}	29
II.C.3 La protéine p75 ^{NTR}	30
II.D. TRKA, p75 ^{NTR} ET CANCER	36
II.D.1.a Effet anti-tumoral	37
II.D.1.a Effet pro- et anti-tumoral.....	38
II.D.1.b Pro-tumoral.....	40
II.E. MECANISMES D'ACTION DU NGF ET DE SES RECEPTEURS	44
II.E.1 Les voies de signalisation des récepteurs du NGF	44
II.E.1.a Voies de signalisation activées par TrkA	44

SOMMAIRE

II.E.1.b Voies de signalisation activées par p75 ^{NTR}	46
II.E.2 Les partenaires de TrkA et p75 ^{NTR}	50
II.E.2.a Partenaire d'activation de TrkA.....	51
II.E.2.b Les corécepteurs de p75 ^{NTR}	51
II.E.3 L'interaction p75 ^{NTR} -TrkA.....	52
OBJECTIF DE LA THESE	55
RESULTATS.....	58
ARTICLE 1: TRKA OVEREXPRESSION ENHANCES GROWTH AND METASTASIS OF BREAST CANCER CELLS.....	59
ARTICLE 2: INVOLVEMENT OF P21 ^{WAF1} IN P75 ^{NTR} OVEREXPRESSION-INDUCED GROWTH INHIBITION AND SURVIVAL IN BREAST CANCER CELLS.....	61
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	63
I. POUVOIR PRO-TUMORAL DE TRKA ET DE P75 ^{NTR} DANS LE CANCER DU SEIN	64
II. MECANISMES MOLECULAIRES MIS EN JEU	67
A/ Activation constitutive des récepteurs surexprimés	67
B/ Interactions possibles des deux récepteurs surexprimés.....	69
III. LIMITES DE NOS APPROCHES EXPERIMENTALES.....	70
A/ Les clones surexprimants.....	70
B/ Méthodes d'analyse globale	72
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	74
BIBLIOGRAPHIE.....	75
ANNEXE	90
ARTICLE 3: BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR AND NEUROTROPHIN-4/5 ARE INVOLVED IN BREAST CANCER.....	91

SOMMAIRE

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1. Anatomie et structure de la glande mammaire.	5
Figure 2. Structure du lobe mammaire	6
Figure 3. Histologie de la glande mammaire normale	7
Figure 4. Développement de la glande mammaire.....	9
Figure 5. Représentation des principaux types de cancer du sein.....	12
Figure 6. Représentation schématique des stades de la cancérisation mammaire.....	14
Figure 7. Représentation schématique des deux hypothèses de l'origine cellulaire du cancer.	20
Figure 8. Hypothétique modèle des cellules souches de cancer du sein.....	20
Figure 9. Contrôle paracrine et autocrine de la croissance des cellules cancéreuses mammaires.....	21
Figure 10. Spécificité de liaison des neurotrophines à leurs récepteurs tyrosine kinase.	25
Figure 11. Représentation schématique du récepteur TrkA.	28
Figure 12. Représentation schématique du récepteur p75 ^{NTR}	32
Figure 13. Les différentes formes du récepteur p75 ^{NTR}	33
Figure 14. Expression et rôle de TrkA et de p75 ^{NTR} dans les cellules prostatiques.	39
Figure 15. Représentation schématique des voies de signalisation des TrkA.....	44
Figure 16. Représentation schématique des voies de signalisation de p75 ^{NTR}	46

SOMMAIRE DES TABLES

Table 1. Classification des stades du cancer du sein.....	12
Table 2. Classification moléculaire des cancers du sein.....	13
Table 3. Caractéristiques géniques des neurotrophines.....	24
Table 4. Caractéristiques géniques des récepteurs tyrosine kinase humains.....	26
Table 5. Effets pro- et anti-tumoraux des récepteurs du NGF dans différents cancers.	37

INTRODUCTION

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

I. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCERISATION

I.A. La glande mammaire

I.A.1 Anatomie et histologie

Le sein est formé de tissus adipeux englobant la glande mammaire, glande exocrine cutanée qui se développe au cours de la vie de la femme mais est également présent chez l'homme de façon réduite. Sa fonction est la sécrétion lactée suite à la parturition.

La glande mammaire est annexée à la paroi antérieure du thorax, soutenue par les ligaments de Cooper et rattachée à la peau par ses seuls canaux excréteurs. Elle est formée de 15 à 20 unités glandulaires indépendantes, les lobes mammaires, développés en période d'allaitement et chacun drainé par un canal galactophore principal. Chacun de ces canaux excréteurs s'ouvre séparément au niveau du mamelon par une dilatation nommée « sinus lactifère » (Figure 1).

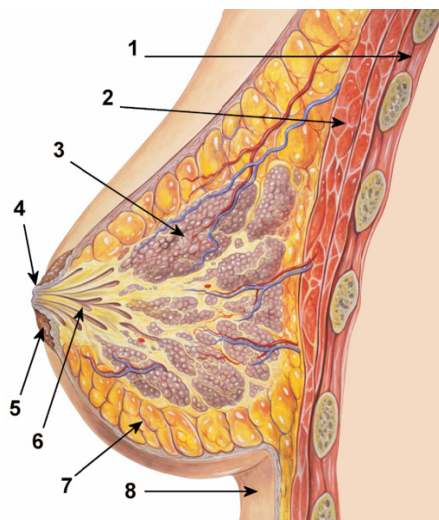


Figure 1. Anatomie et structure de la glande mammaire.

Représentation schématique en coupe de la glande mammaire. 1: Cage thoracique ; 2: Muscles pectoraux ; 3: Lobe mammaire ; 4: Mamelon ; 5: Aréole ; 6: Canal galactophore ; 7: Tissu adipeux ; 8: Peau (Medical Illustrations by Patrick Lynch)

INTRODUCTION

Un lobe est constitué de 20 à 40 lobules s'organisant autour du canal excréteur galactophore ramifié en canaux lobulaires. Les lobules sont eux-mêmes constitués de 10 à 100 acini, ou alvéoles mammaires, débouchant dans les canaux intermédiaires dits lobulaires (Figure 2).

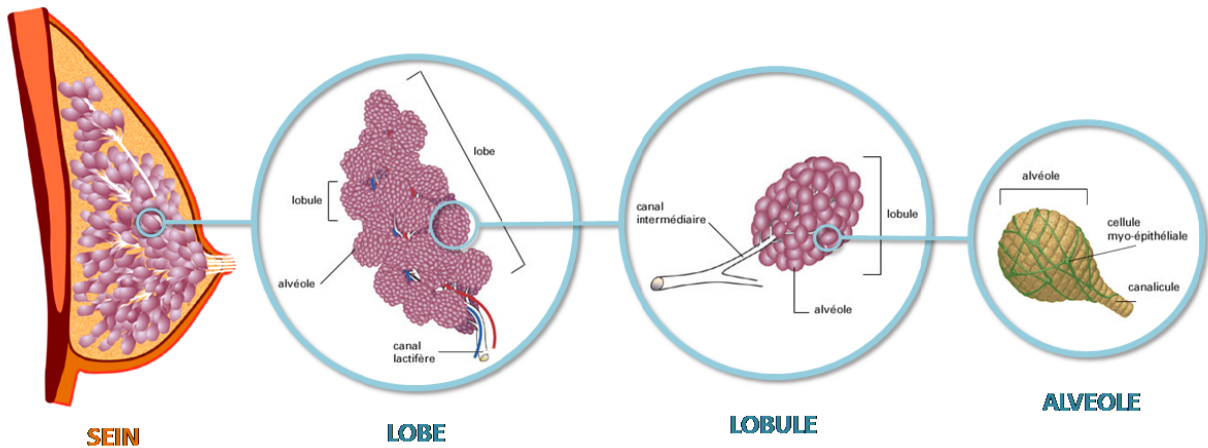


Figure 2. Structure du lobe mammaire

Représentation schématique de la structure du lobe mammaire. Un lobe mammaire compte de 20 à 40 lobules eux même formés par les alvéoles. Les alvéoles sont composées d'un épithélium sécrétoire qui éjecte le lait dans la lumière de l'alvéole vers les canaux alvéolaires, ou canicules, jusqu'au canal galactophore grâce à la contraction des cellules myoépithéliales. (Adapté de www.santeallaitementmaternel.com).

La glande mammaire est composée de plusieurs types cellulaires distincts. Le système alvéolo-lobulo-canaire est formé d'une assise continue de cellules épithéliales cubiques sécrétrices de lait, doublée d'une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales fusiformes contractiles. Ces deux couches cellulaires reposent sur une lame basale. Les acini baignent dans un stroma mésenchymateux, le tissu palléal, composé de la matrice extracellulaire (notamment les fibres de collagène), de cellules fibroblastiques et d'adipocytes. Ce stroma est également richement vascularisé assurant le développement de l'épithélium mammaire. Le tissu conjonctif extra-lobulaire est lui plus dense et pauvre en cellule (Figure 3). L'éjection du lait dans les canaux alvéolaires, lobulaires et enfin galactophores, se fait en réponse au stimulus de succion qui provoque la contraction des cellules myoépithéliales.

INTRODUCTION

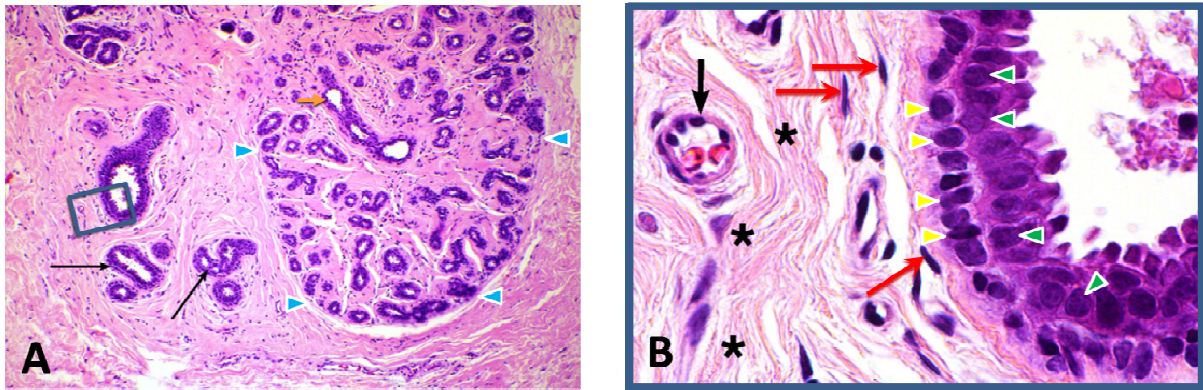


Figure 3. Histologie de la glande mammaire normale

A) Lobule mammaire post-pubertaire hors lactation. Les flèches bleues délimitent le lobule, la flèche orange indique le canal terminal alvéolaire menant au réseau canalaire (flèches noires), les fibres roses de la matrice extracellulaire (surtout du collagène) s'enroule concentriquement autour des lobules et canaux formant un véritable tissu de soutien. B) Agrandissement de la coupe A (rectangle bleu), les flèches jaunes indiquent les cellules myoépithéliales du canal, les flèches vertes montrent l'assise de cellules épithéliales du canal, les flèches rouges indiquent les fibroblastes péri-canalaire parallèles à la lame basale, les astérisques représentent les fibres de collagène et la flèche noire une artériole. (adapté de *Biology of the mammary gland*: <http://mammary.nih.gov>).

I.A.1 Développement et contrôle

L'architecture de la glande mammaire est l'aboutissement d'un long processus de développement et de différenciation des tissus mammaires.

Au stade embryonnaire, un motif de base de la glande mammaire, commun aux deux sexes, est mis en place. A la différence des autres organes, la glande mammaire reste très peu présente jusqu'à la puberté. Son développement est transitoire, par conséquent chacune de ses étapes est hautement contrôlée par différentes hormones agissant en synergie avec le microenvironnement conjonctif des acini (Figure 4).

A la puberté, la glande mammaire développe son arborescence sous le contrôle d'hormones ovariennes, progestérone et œstrogènes, et de l'hormone hypophysaire GH (Growth Hormone). Les œstrogènes stimulent la croissance et les ramifications du système canalaire et de son tissu conjonctif périphérique. La progestérone provoque elle la dilatation des canaux et une différenciation des cellules épithéliales en cellules sécrétoires.

L'action de ces hormones se fait à la fois de manière directe, par leur action sur les cellules épithéliales et indirecte par leur action sur les cellules mésenchymateuses qui sécrètent alors

INTRODUCTION

des facteurs de croissance. Ces facteurs de croissance, EGF (Epithelial Growth Factor), TGF- α , TGF- β (Transforming Growth Factor α et β), IGF (Insulin-like Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) stimulent à leur tour, de manière paracrine ou autocrine, la prolifération et la différenciation de l'épithélium mammaire. Les œstrogènes ont également une action indirecte sur la prolifération des cellules en stimulant la synthèse de protéases (MMP2, 3, 14, ADAM 17) qui, en dégradant localement la matrice extracellulaire contribuent à la migration et la prolifération des cellules épithéliales.

Au cours de la gestation, l'extension des canaux galactophores et la différenciation des acini glandulaires s'effectuent sous le contrôle des œstrogènes, de la progestérone et des facteurs de croissance tels que le TGF- α . Les hormones lactogènes (la prolactine, les glucocorticoïdes, la GH et l'hormone placentaire lactogène), dont les concentrations restent élevées durant toute la gestation et la période d'allaitement, induisent la différenciation des cellules épithéliales des acini productrices de lait. En fin de lactation, après une période de sevrage, l'accumulation du produit de sécrétion provoque la régression de la glande mammaire par divers mécanismes (activation des enzymes protéolytiques, apoptose des cellules épithéliales, arrivée massive de macrophages).

INTRODUCTION

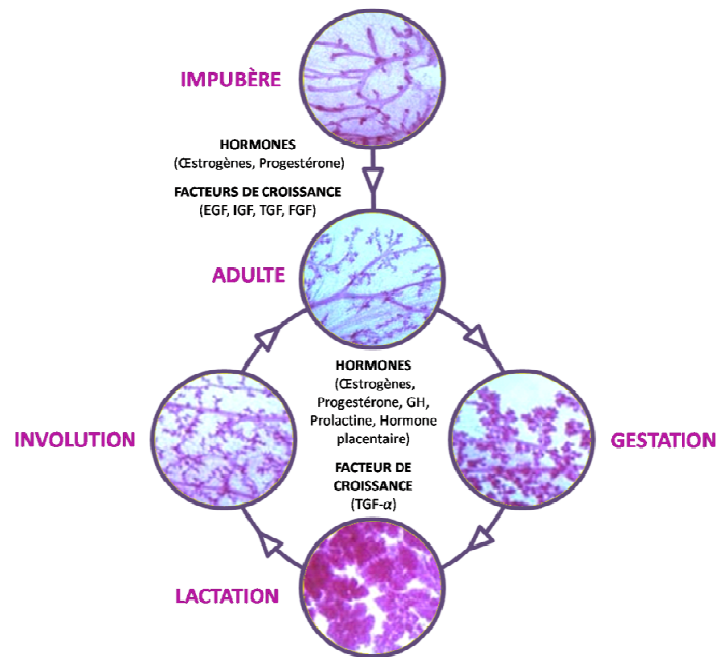


Figure 4. Développement de la glande mammaire.

À la puberté, la glande mammaire subit l'effet de nombreuses hormones et facteurs de croissance provoquant un développement de l'arborescence et des alvéoles. Lors d'une grossesse, les hormones lactogènes induisent la différenciation des cellules épithéliales des acini en cellules productrices de lait. Le sevrage entraîne la disparition de ces cellules et l'involution de la glande. Photos de glandes mammaires murines issues de *Biology of the mammary gland* (<http://mammary.nih.gov>).

I.B. Le cancer du sein

I.B.1 Généralité

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers féminins. Dans le monde, plus de 1 050 000 nouveaux cas de cancer du sein surviennent chaque année, dont plus de 580 000 dans les pays développés (Europe de l'ouest, Amérique du nord) où il est plus fréquent qu'en Afrique ou en Asie. Il est responsable chaque année de plus de 400 000 décès de femmes et constitue ainsi la première cause de mortalité chez les femmes de 35 à 65 ans dans les pays développés.

INTRODUCTION

En France, il représente plus du tiers de l'ensemble des nouveaux cas de cancer chez la femme. On estime qu'en 2005, 49 814 nouveaux cas y ont été diagnostiqués et 11 637 décès ont été liés à ce cancer. Entre 1980 et 2000, le nombre de nouveaux cas a presque doublé, dans le même temps la mortalité n'a que très peu augmenté grâce à l'amélioration des thérapeutiques. Plus de 50 % des cancers sont observés après 65 ans, près de 10 % avant 35 ans. Statistiquement, une femme sur 9 sera concernée par le cancer du sein au cours de sa vie. Notons que le cancer du sein peut survenir aussi chez l'homme, mais il est rare et environ 200 fois moins fréquent que chez la femme (source: Institut National du Cancer).

Aujourd'hui cependant, le taux global de survie relative à 5 ans après le diagnostic est de 85 % et un recul du taux d'incidence entre 2004 et 2006 est observé (Allemand et al., 2008) alors que le dépistage s'est considérablement accentué (augmentation de l'examen par mammographie de plus de 300% en France entre 2000 et 2006).

Le cancer du sein est une pathologie à évolution lente. Il faut compter entre 6 et 8 ans pour qu'à partir d'une seule cellule apparaisse une tumeur d'un volume de 1cm^3 , c'est-à-dire détectable par mammographie classique. L'amélioration des techniques d'imagerie et la campagne de dépistage intensive pour les femmes de plus de 50 ans a permis une prise en charge précoce des patientes atteintes d'un cancer du sein. Cependant, durant cette période infra-clinique, où la tumeur est non détectable, celle-ci évolue et peut passer d'un stade *in situ* (non invasif) à un stade invasif qui mènera, via les voies lymphatiques ou sanguines, à l'apparition de métastases principalement pulmonaires, hépatiques, cérébrales et osseuses dans le cas du cancer du sein.

I.B.1.a Les différents types de cancer du sein

Les tumeurs de sein peuvent être dites **bénignes**, c'est-à-dire bien limitées et encapsulées. Elles ont alors une croissance lente et locale et ne récidivent pas après exérèse. L'adénofibrome par exemple représente la plus fréquente des tumeurs bénignes du sein de la femme jeune.

La seconde classe de tumeurs de sein, qualifiées de **malignes**, sont au contraire mal délimitées et non-encapsulées. Ce sont des cellules à croissance rapide et tendent à infiltrer et détruire les

INTRODUCTION

tissus adjacents. On compte parmi ces tumeurs les sarcomes, les lymphomes non hodgkiniens mais surtout (dans plus de 95% des cas) des **adénocarcinomes**, c'est-à-dire issus de la cancérisation de épithélium glandulaire à partir soit de cellules des canaux, on parle alors de cancer canalaire, soit de cellules des lobes glandulaires, on parle alors de cancer lobulaire.

Il est possible de subdiviser les adénocarcinomes en 3 types selon leurs caractéristiques d'infiltration des tissus environnants.

- Les carcinomes *in situ* (non infiltrants) : Ils peuvent être localisés soit dans les canaux et sont alors dits canaux (CCIS) soit dans les lobes et sont alors dits lobulaires (CLIS). Leur prolifération épithéliale maligne est cantonnée dans la lumière du canal galactophorique ou des acini, la membrane basale reste intacte et le tissu conjonctif n'est pas envahi. Les carcinomes mammaires *in situ* sont rares, les CCIS sont de bon pronostic et les CLIS sont souvent bilatéraux et évoluent dans 20 à 50% des cas vers une forme infiltrante.
- Les carcinomes infiltrants : Dans les carcinomes dits infiltrants, les cellules ont détruit la lame basale et infiltrent le tissu adjacent. Ils représentent une très large majorité des cancers du sein (98%), sont le plus souvent canaux (75%), ou lobulaires (4 à 11%). Il existe d'autres formes, plus rares, que sont les carcinomes tubuleux, mucineux, adénoïdes kystiques, cribriformes dits de bon pronostic, ou les carcinomes apocrines, médullaires ou neuroendocrines, eux extrêmement rares.
- La maladie de Paget du mamelon (2% des carcinomes): Il s'agit d'une infiltration épidermique mamelonnaire par des cellules carcinomateuses, sans infiltration du derme sous-jacent. Cette lésion est en général associée à un carcinome mammaire intracanaire ou canalaire infiltrant sous-jacent.

INTRODUCTION

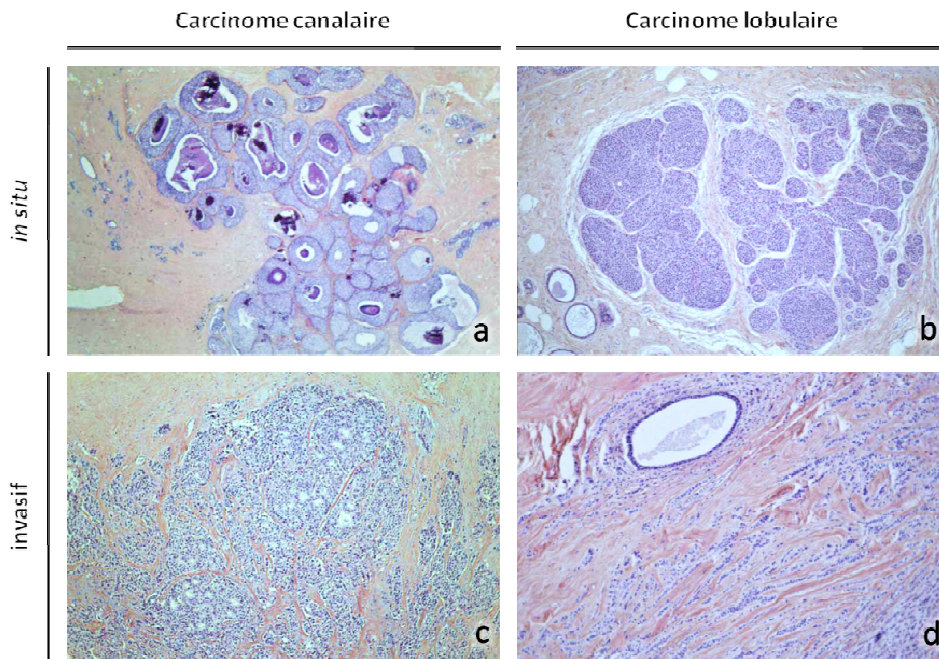


Figure 5. Représentation des principaux types de cancer du sein.

Coupes histologiques de carcinomes *in situ* canalaire, ou CCIS (a), et lobulaire, ou CLIS (b) où la prolifération épithéliale maligne est cantonnée dans la lumière du canal galactophorique ou des acini, et de carcinomes invasifs canalaire (c) et lobulaire (d) où la lame basale est dégradée et où les cellules épithéliales cancéreuses ont envahi le stroma (<http://www.med.univ-rennes1.fr/resped/s/gyneco/kcsein/cancersein.htm>).

D'un point de vue clinique les cancers du sein sont classifiés selon deux méthodes :

- **La classification TNM**, datant de 1987, basée sur l'extension tumorale à la fois loco-régionale (T0-T4), ganglionnaire (N0-N3) et métastatique (M0-M1). Le chiffre associé à chaque critère augmente en fonction de la gravité du cancer. Sur cette base, une seconde classification décrit 5 stades (table 1) correspondant à une combinaison des facteurs T, N et M.

Stade	Description
Stade 0	Cancer <i>in situ</i> (non invasif)
Stade I	La tumeur mesure au plus 2 cm et il n'y a pas de propagation à l'extérieur du sein
Stade II	La tumeur mesure de 2 à 5 cm et/ou il y a atteinte ganglionnaire satellite mineure.
Stade III	Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure
Stade IV	Tumeur avancée localement et/ou métastases à distance

Table 1. Classification des stades du cancer du sein.

Description des stades 0, I, II, III et IV des cancers du sein issus de la classification TNM.

INTRODUCTION

- **La classification moléculaire**, plus récente, est basée sur les différences d'expression génique entre le tissu tumoral mammaire invasif et le tissu mammaire normal, classées et corrélées afin de pouvoir prédire l'évolution des cancers du sein et adopter une stratégie thérapeutique adaptée (Sotiriou et al., 2003). Cette classification compte 5 sous-types décrits dans la table 2.

Sous type	Description
Luminal A	Cancer généralement de bas grade et de bon pronostic, exprimant les récepteurs hormonaux (E α)
Luminal B	Cas luminaux moins différenciés que les A et plus prolifératifs. Ils sont de grade plus élevé et de pronostic moins favorable
HER2	Présentent une forte expression de HER2 (ErbB2) et souvent un P53 muté mais n'expriment pas de récepteurs hormonaux. Ils sont de grade III
Basal-like	N'expriment ni les récepteurs hormonaux ni Her2 (ErbB2) mais possèdent une forte expression des gènes de prolifération et des CK 5/6 et 17 et une mutation fréquente de p53. Ils sont de grade III et de mauvais pronostic
Normal breast-like	Expriment des gènes connus pour être exprimés par des cellules non épithéliales, ce dernier sous-type reste assez mal défini

Table 2. Classification moléculaire des cancers du sein.

Description des 5 sous-types basés sur leur expression spécifique de certains gènes.

I.B.2 La tumorigenèse mammaire

La cancérisation mammaire est un processus pathologique évolutif au cours duquel la succession d'altérations géniques confère aux cellules des avantages sélectifs menant à la transformation progressive de cellules normales en cellules tumorales. Il est possible de présenter la cancérogénèse mammaire en 3 étapes schématisées dans la figure 6.

INTRODUCTION

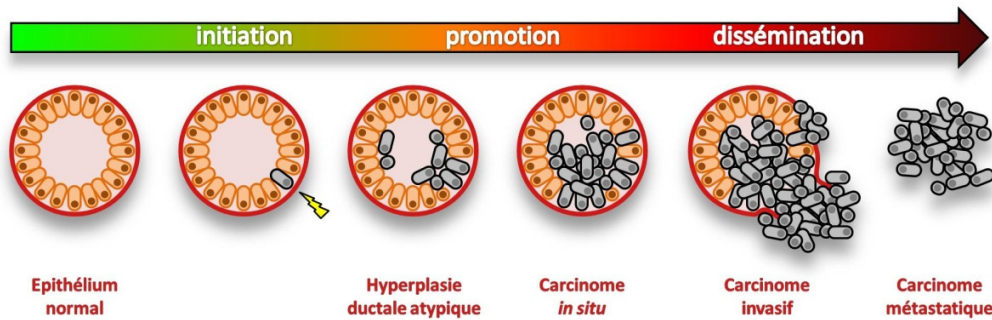


Figure 6. Représentation schématique des stades de la cancérisation mammaire.

*A partir d'un tube épithélial sain, les cellules « initiées » vont proliférer de façon anarchique sous l'influence de divers signaux jusqu'au stade de l'hyperplasie atypique. Lors de leur promotion, les cellules se différencient, acquièrent des modifications structurales et prolifèrent au niveau local pour donner un carcinome *in situ*. D'autres modifications phénotypiques permettront aux cellules cancéreuses de passer la membrane basale pour se disséminer en cancer invasif et métastatique.*

- **L'initiation** est l'évènement initial, souvent antérieur de plusieurs années à l'apparition de signes ou symptômes du cancer. Sous l'effet de mutations ou délétions touchant les gènes suppresseurs de tumeur, les cellules vont proliférer exagérément formant une excroissance tissulaire appelée hyperplasie.
- **La promotion** est l'étape de prolifération anarchique des cellules mutées ou « initiées » menant à la formation du carcinome *in situ*. Durant cette période, les cellules vont accumuler des altérations géniques et acquièrent alors de nouvelles propriétés biologiques rendant, en prenant l'ascendant sur les autres cellules, la tumeur de plus en plus agressive.
- **La dissémination** ou invasion tumorale. Les cellules vont dépasser le niveau local pour envahir le tissu conjonctif selon un processus actif et complexe lié à l'acquisition de nouvelles propriétés biologiques. Les cellules doivent avoir acquis la capacité de détruire la membrane basale, perdre leur connexion intercellulaire, développer une angiogenèse tumorale. Le stade ultime est la **métastase** par voie sanguine ou lymphatique (colonisation des ganglions axillaires, des chaînes mammaires internes et des ganglions sus-claviculaires). Plus tardivement, des sites de métastases secondaires pourront ainsi apparaître à distance notamment au niveau des os, du foie, des poumons, du cerveau, de la plèvre et de la peau.

INTRODUCTION

Pour permettre aux cellules transformées de prendre l'ascendant sur les autres cellules, six altérations dans la physiologie de la cellule sont considérées comme essentielles (Hanahan and Weinberg, 2000) :

- indépendance vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire
- insensibilité aux signaux anti-prolifératifs
- échappement à l'apoptose
- potentiel réplicatif illimité
- conversion angiogénique
- invasion et métastase

Ces modifications comportementales sont le fait d'altérations génétiques dont les principales sont l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et l'activation d'oncogènes (Thompson and Easton, 2004).

I.B.2.a Altérations du génome

❖ *Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs*

Les gènes suppresseurs de tumeur agissent à différents niveaux de la vie de la cellule. Communément, on les subdivise en 3 groupes, les **garants de la stabilité du génome** ou « caretakers » (p53, BRCA...), les **inhibiteurs de la croissance cellulaire** au sens large ou « gate-keepers » (Rb, PTEN...) et les **modulateurs du microenvironnement cellulaire** « landscapers » (E-Cadhérine, CD44...). Notons que pour que la fonction de régulation négative de la prolifération cellulaire soit perdue, il faut que les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur soient altérés (Knudson, 1993). En fait, les tumeurs ne contiennent plus qu'un seul allèle muté, le second allèle ayant été perdu lors d'un remaniement génétique qui a conduit à la délétion d'une partie plus ou moins importante du chromosome (perte d'hétérozygotie).

INTRODUCTION

Voici quelques exemples de gènes mutés dans le cancer du sein :

- **p53**, appartenant aux garants de la stabilité du génome, est considérée comme la gardienne du génome puisque cette protéine est responsable de l'arrêt temporaire du cycle cellulaire permettant la réparation des lésions moléculaires ou l'induction de l'apoptose des cellules endommagées. Son inhibition augmente le pool de cellules en prolifération et la probabilité de leur transformation maligne faute d'élimination des cellules mutées. Dans le cancer du sein, p53 est mutée dans 25% des cas (IARC TP53 database, Octobre 2007) et ses mutations sont associées à un mauvais pronostic.
- **Rb**, appartenant aux inhibiteurs de la croissance cellulaire, est phosphorylé et déphosphorylé par les complexes cycline-cdk et intervient dans le contrôle du cycle cellulaire en permettant la libération du facteur de transcription E2F. La perte du contrôle des « checkpoint » par Rb conduit à une prolifération anarchique des cellules. Dans le cancer du sein on observe une expression aberrante de Rb dans 20 à 30% des cas, provoquée par une perte d'hétérozygotie ou une perte totale de l'expression de Rb (Bosco and Knudsen, 2007).
- **La E-cadhérine**, appartenant aux modulateurs du microenvironnement cellulaire, est un constituant des jonctions adhérentes des cellules épithéliales mais possède également un pouvoir de signalisation cellulaire. La régulation de la E-cadhérine est fréquemment altérée dans les carcinomes et est inversement corrélée au caractère invasif des cellules cancéreuses lobulaires (Heimann et al., 2000). La diminution d'expression est souvent due à une perte d'hétérozygotie de l'E-cadhérine. L'E-cadhérine est ainsi considérée comme un suppresseur de tumeur et un suppresseur de métastases (Cowin et al., 2005).

❖ *Activation d'oncogènes*

Les oncogènes sont des facteurs de croissance (comme par exemple le PDGF), des récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR, Met), des adaptateurs de voies de signalisation (Ras, Src), des acteurs de la survie cellulaire (Akt, bcl2), des régulateurs du cycle cellulaire (cyclines) ou des facteurs de transcription (c-myc) qui, suractivés dans les cellules cancéreuses, vont stimuler la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses.

INTRODUCTION

Dans les cancers du sein, l'activation des oncogènes se fait majoritairement par amplification génique (augmentation anormale du nombre de copies du gène dans la cellule) alors que les mutations ponctuelles, les insertions ou les réarrangements géniques sont plus rarement observés (Bieche and Lidereau, 1997).

Les amplifications les plus fréquentes dans le cancer du sein concernent les oncogènes c-myc, ccdn1 et c-ErbB2.

- **c-myc** compte parmi les premiers oncogènes identifiés, c'est un facteur de transcription qui active l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Sa fréquence d'amplification se révèle plus importante dans les tumeurs envahissant les ganglions axillaires et les tumeurs de grade histopronostique élevé (Blancato et al., 2004).
- **ccdn1** code pour la cycline D1 qui est un régulateur majeur des transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire mais également un cofacteur de transcription. Il est le deuxième oncogène le plus souvent amplifié dans les tumeurs mammaires et est amplifié dans 15 % des carcinomes mammaires (Arnold and Papanikolaou, 2005). De plus, la cycline D1 est surexprimée au niveau transcriptionnel et protéique dans 50 % des cancers du sein avec ou sans amplification génique (Roy and Thompson, 2006).
- **c-ErbB2 (HER2)**, 3^{ème} gène le plus fréquemment amplifié dans les tumeurs mammaires (Slamon, 1987), est l'homologue humain du gène neu isolé dans les cellules de neuroblastomes de rat. La protéine ErbB2 est un récepteur de la famille de l'EGFR (récepteur de l'epithelial growth factor ou ErbB1) surexprimé dans 25 à 30 % des cancers du sein. Il induit la tumorigenèse, est associé à des phénotypes invasifs, à un mauvais pronostic, à une résistance à l'hormonothérapie et à une diminution de l'efficacité des chimiothérapies. C'est pourquoi il est aujourd'hui la cible d'un traitement basé sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti HER2, le trastuzumab (ou herceptine) (Vogel et al., 2001).

INTRODUCTION

❖ *Épigénétique*

Au-delà de ces modifications génétiques il est désormais établi une implication des phénomènes épigénétiques dans la carcinogénèse. L'épigénétique désigne des modifications stables au cours des générations cellulaires n'impliquant aucun changement de la séquence du génome. Les deux types d'informations épigénétiques les plus étudiés, en raison de leur fort impact sur la transcription des gènes, sont les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN. Ainsi, par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, les modifications épigénétiques jouent fréquemment un rôle dans la tumorigénèse. La méthylation de l'ADN est le système d'inhibition de la transcription le plus simple et le mieux connu, c'est pourquoi de nouvelles stratégies s'emploient à inhiber les ADN méthyltransférases.

❖ *Oncovirus*

Les oncovirus peuvent intervenir dans la cancérogenèse par les modifications du génome liées à leur intégration dans l'ADN chromosomique, ou par la production de protéines interagissant avec les protéines de contrôle de la prolifération cellulaire, à l'image des papillomavirus produisant des protéines détruisant la protéine p53 dans le cancer de l'utérus (Sun et al., 2008), ou encore en apportant des oncogènes dans leur acide nucléique comme *Myb* codé par le virus AMV causant la leucémie myéloïde chez l'homme (Lipsick and Wang, 1999). Cependant, l'implication de virus dans la carcinogénèse mammaire demeure discutée et les études montrant la présence du virus HMTV, équivalent humain du MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus), dans les biopsies de cancer de sein ne permettent aucune certitude quant à son implication réelle dans la maladie (Ross, 2008).

I.B.2.b Origine cellulaire du cancer du sein

L'origine cellulaire du cancer du sein fut longtemps expliquée par le seul concept **d'origine clonale des tumeurs** où l'accumulation d'altérations du génome à partir d'une cellule confère à sa descendance immortalité et avantage sélectif. Cependant, si le rôle des altérations géniques conduisant à la cancérisation est admis, la notion de cellules différenciées comme seules cibles

INTRODUCTION

des mutations géniques est parfois difficilement conciliable avec certaines observations. Par exemple, on observe que les tumeurs sont très hétérogènes, composées de cellules ayant des degrés de différenciation très différents. Il est alors difficile de comprendre comment une cellule cible bien différenciée, mutée et cancéreuse produit des cellules tumorales bien moins différenciées qu'elle (Polyak and Hahn, 2006). Avec la découverte des **cellules souches cancéreuses** dans des cas de leucémie (Bonnet and Dick, 1997), un nouveau concept voit le jour pour se répandre rapidement aux autres cancers dont le cancer du sein. Ce concept diffère du précédent de par la nature de la cellule initialement mutée ; alors que dans le concept de l'évolution clonale n'importe quelle cellule peut subir les mutations initiatrices, dans le concept des cellules souches ce sont des progéniteurs ou des cellules souches qui subissent les mutations et seront tumorigènes (figure 7).

Les cellules souches sont caractérisées par leur prolifération lente, leur potentiel de renouvellement illimité et leur capacité à produire diverses cellules différenciées et spécialisées. Les cellules souches cancéreuses conservent un potentiel de renouvellement important et la capacité à produire diverses cellules différenciées et spécialisées. Dans le cancer du sein, des cellules ayant ces capacités de cellules souches ont été identifiées comme hautement tumorigènes, elles sont CD44⁺ et CD24^{-/low} (Al-Hajj et al., 2003). Le concept de cellules souches cancéreuses permet également d'émettre une hypothèse quant à la carcinogénèse mammaire expliquant ainsi l'hétérogénéité des cancers du sein (figure 8).

INTRODUCTION

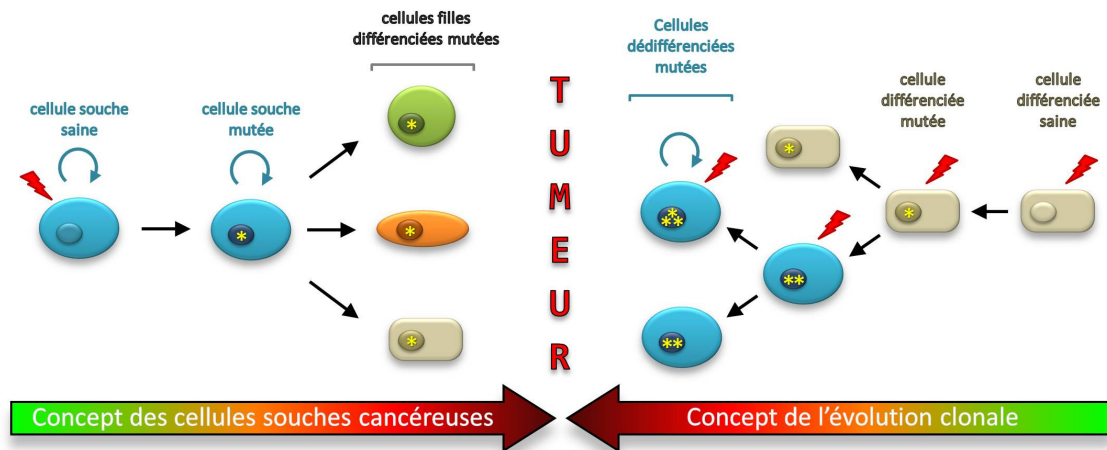


Figure 7. Représentation schématique des deux hypothèses de l'origine cellulaire du cancer.

Dans le concept des « cellules souches cancéreuses », une cellule souche subit une ou plusieurs mutations et produit des cellules souches mutées toujours capables de se multiplier et d'évoluer en cellules filles différenciées mutées pouvant acquérir de nouvelles mutations. Dans le concept de « l'évolution clonale », une cellule différenciée est altérée génétiquement et produit des cellules filles qui accumulent d'autres mutations leur permettant de se dédifférencier et d'acquérir un potentiel de renouvellement illimité. En bleu sont représentées les cellules indifférenciées à renouvellement illimité (flèches circulaires), les mutations sont représentées par les astérisques (Campbell and Polyak, 2007).

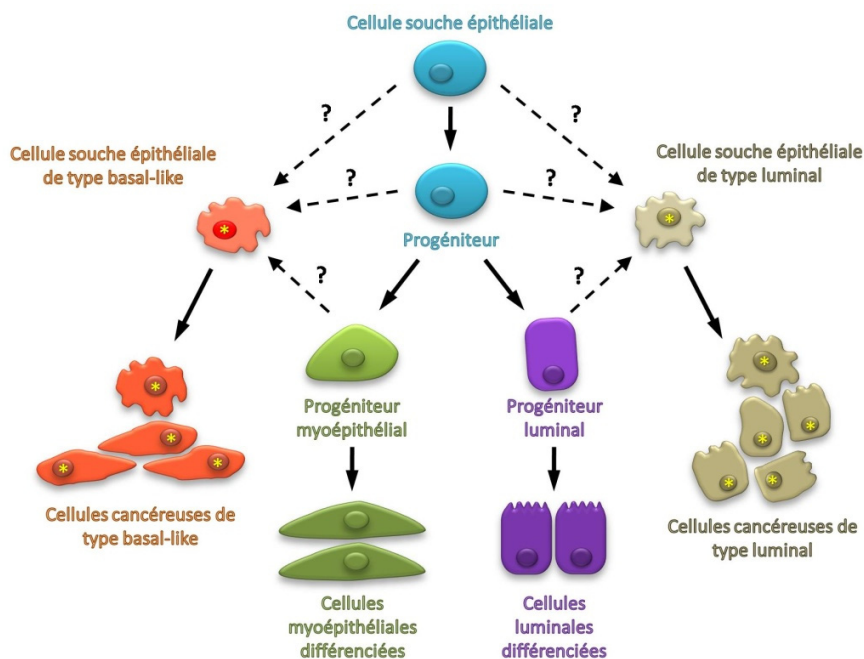


Figure 8. Hypothétique modèle des cellules souches de cancer du sein.

Au centre est représentée la voie de différenciation hypothétique des cellules épithéliales mammaires où une cellule souche donne naissance à des progéniteurs pouvant produire à leur tour des progéniteurs myoépithéliaux ou luminaux se différenciant en cellules myoépithéliales et épithéliales luminales. Lors de la différenciation, la capacité de renouvellement propre des cellules décroît. Les cellules cancéreuses mammaires pourraient ainsi potentiellement

INTRODUCTION

dériver des cellules souches, ou des cellules plus différenciées, hypothèses représentées par les flèches en pointillé. Les cellules souches cancéreuses ont un potentiel de différenciation plus limité et produiraient des cellules cancéreuses luminales ou de type basal-like (Shipitsin and Polyak, 2008).

I.B.2.c Rôle des facteurs de croissance

La cellule cancéreuse est souvent décrite comme ayant perdu tout contrôle, or, à l'image du développement de la glande mammaire saine, l'évolution du cancer du sein est soumis à l'action de facteurs régulateurs systémiques et locaux. Parmi eux, les facteurs de croissance jouent un rôle essentiel en favorisant d'une part la **croissance de la tumeur primaire**, en jouant sur la prolifération, la résistance des cellules à l'apoptose et sur l'angiogénèse, et d'autre part la **formation de métastases**, en jouant sur les capacités de migration et d'invasion des cellules cancéreuses et, là encore, sur l'angiogénèse. Ces facteurs de croissance peuvent être sécrétés par les cellules cancéreuses elles-mêmes ou par diverses cellules composant le stroma (Fibroblastes, cellules myoépithéliales, cellules immunitaires...)(figure 9).

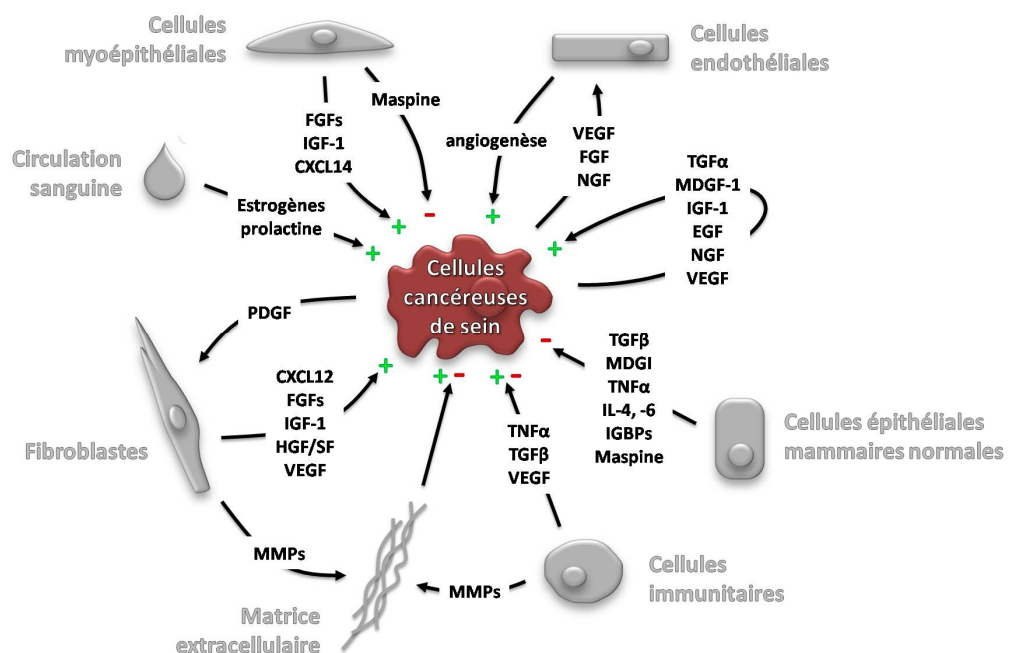


Figure 9. Contrôle paracrine et autocrine de la croissance des cellules cancéreuses mammaires.

Schéma résumant les différents facteurs impliqués dans le contrôle de la croissance mammaire, ainsi que l'influence des cellules avoisinantes. Les effets stimulateurs sur la croissance des cellules cancéreuses sont représentés par un « + », les effets inhibiteurs par un « - ». FGF : Fibroblast Growth Factor; IGF : Insulin-like Growth Factor; IGFbps : IGF Binding proteins; TGF α : Transforming Growth Factor α ; TGF β : Transforming Growth Factor β ;

INTRODUCTION

MDGI : Mammary-Derived Growth Factor Inhibitor; HGF-SF : Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor; EGF : Epithelial Growth Factor ; NGF : Nerve Growth Factor ; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ; TNF α : Tumor Necrosis Factor α ; IL-4, -6 : Interleukine-4, -6, CXCL12 et 14 : chemokine CXC motif ligand 12 et 14; MMPs : Métalloprotéases.

Les facteurs de croissance peuvent agir de deux façons sur les cellules cancéreuses, soit par stimulation directe des cellules activant leur prolifération, leur survie, leur migration et/ou leur invasion, soit indirectement, en agissant sur les cellules du stroma induisant ainsi des modifications du micro-environnement tumoral (modifications de la matrice extracellulaire, recrutement et activation des cellules endothéliales...) favorables à l'angiogenèse et à la métastase. Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) par exemple favorise la formation de métastases par différentes actions puisqu'il induit à la fois la résistance à l'apoptose et la migration des cellules cancéreuses, mais augmente également la perméabilité microvasculaire, et active l'angiogenèse tumorale favorisant la nutrition de la tumeur et l'essaimage des cellules cancéreuses. Le VEGF peut être sécrété par les cellules cancéreuses elles-mêmes mais aussi par les cellules stromales (Lee et al., 2007). L'expression du VEGF est associée à un mauvais pronostic (Mohammed et al., 2007) ce qui en fait, ainsi que ses récepteurs (VEGFR1, VEGFR2, neuropilin-1) la cible d'une approche thérapeutique antiangiogénique prometteuse (Hayes et al., 2007).

Le TGF β (Transforming Growth Factor β) est également un facteur de croissance intervenant dans la croissance des cellules cancéreuses de sein. Sa particularité est son effet antiprolifératif sur les cellules tumorales aux stades précoces alors qu'il augmente, à un stade tumoral plus avancé, l'agressivité des cellules cancéreuses en stimulant l'invasion et la métastase (Chang et al., 2007).

Les cellules du microenvironnement sont également capables de produire d'autres facteurs de croissance comme l'EGF, le FGF, les IGF ou l'HGF qui stimulent de façon paracrine la croissance et la migration des cellules cancéreuses.

Enfin, il a été montré au sein de notre laboratoire le rôle d'un facteur de croissance supplémentaire dans le cancer du sein, le NGF (Nerve Growth Factor). En effet, les cellules cancéreuses mammaires sécrètent du NGF agissant de manière autocrine pour stimuler la

INTRODUCTION

survie et la prolifération des cellules cancéreuses de sein (Descamps et al., 2001b; Dolle et al., 2003).

Notons que les facteurs de croissance ne sont pas le seul mode d'action du microenvironnement sur les cellules cancéreuses mammaires. C'est le cas par exemple de chimiokines, comme la CXCL14 sécrétée par les cellules myoépithéliales et augmentant la prolifération et la migration des cellules cancéreuses, ou les métalloprotéases (MMP) capables de dégrader la matrice extracellulaire et favoriser ainsi l'invasion des cellules tumorales.

II. ROLE DU NGF ET DE SES RECEPTEURS DANS LE CANCER

II.A. La neurotrophine NGF

II.A.1 Découverte

C'est dans les années 50 que Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger et Stanley Cohen émettent l'hypothèse de l'existence d'agents solubles, qu'ils nomment « nerve growth factors », favorisant l'innervation. Ils montreront que durant le développement, la survie des neurones dépend de substances sécrétées par leurs cibles et agissant de façon humorale. Le Nerve Growth Factor (NGF), premier facteur de croissance décrit, sera ainsi isolé en 1954 par Stanley Cohen (Cohen et al., 1954) ce qui lui vaudra, avec Rita Levi-Montalcini, le prix Nobel en 1986. Feront suite les découvertes des autres membres de la famille des neurotrophines ; le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) purifié en 1982 à partir de tissu de cerveau (Barde et al., 1982). La neurotrophine 3 (NT-3) identifiée par PCR en 1990 et la neurotrophine 4/5 (NT-4/5) découverte consécutivement chez le xénope, le rat et l'homme en 1991 (Hallbook et al., 1991).

INTRODUCTION

II.A.2 Structure : des gènes aux protéines

Issus de la duplication d'un même gène ancestral, les gènes des neurotrophines sont très conservés. Le NGF, le BDNF, la NT-3 et la NT-4/5 sont localisés respectivement sur les chromosomes 1, 11, 12 et 19 du génome humain et leur synthèse aboutit à des protéines de poids moléculaires très proches (Table 3).

Neurotrophine	Localisation Chromosomique	Taille de l'ARN (pb)	N° d'accension NCBI	Poids moléculaire (kDa)	N° d'accension swissprot
NGF	1p13, 1	1052	NM_002506	13,2	P01138
BDNF	11p13	4659	NM_00170735	13,6	P23560
NT-3	12p13	1204	NM_002527	13,6	P20783
NT-4/5	19q13, 3	1021	NM_006179	14	P34130

Table 3. Caractéristiques géniques des neurotrophines.

Neurotrophines humaines NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 et leur localisation chromosomique, leur taille de transcrit, leur poids moléculaire protéique et leurs numéros d'accension dans les banques NCBI et swissprot.

La synthèse du NGF, comparable aux autres neurotrophines, se fait par un processus de maturation où un seul exon codant est traduit en un précurseur protéique nommé préproNGF. Celui-ci va être séparé de son peptide signal dans le réticulum endoplasmique pour donner le proNGF. Enfin, le proNGF est clivé en un site d'acide aminé dibasique par des protéases intracellulaires telle la furine ou des proconvertases (Bresnahan et al., 1990; Seidah et al., 1996) ou, après sécrétion, par des protéases extracellulaires comme la plasmine et certaines métalloprotéases (Lee et al., 2001; Pang et al., 2004). Cette succession de clivages aboutie à la libération de la forme C-terminale mature d'environ 120 acides aminés, la neurotrophine mature NGF. Notons que cette maturation protéolytique dépendrait du type de la neurotrophine et de la disponibilité des protéases actives. Ainsi, alors que le NGF est souvent secrété sous sa forme mature, la proforme du BDNF semble être majoritairement excrétée par les neurones (Mowla et al., 1999).

Les neurotrophines matures s'homodimérisent de façon non covalente en complexe de 28 kDa grâce à 6 résidus cystéines, conservés dans chaque neurotrophine, et formant trois ponts

INTRODUCTION

disulfures. L'hétérodimérisation des neurotrophines fut montrée possible *in vitro* (Arakawa et al., 1994; Jungbluth et al., 1994) mais ces formes sont moins stables et réversent vers leurs homodimères respectifs. De plus, le rôle biologique des hétérodimères de neurotrophines *in vivo* demeure incertain.

Le NGF exerce ses effets en interagissant avec deux types de récepteurs membranaires : p75^{NTR}, un récepteur de la famille des récepteurs au TNF, et le récepteur à activité tyrosine kinase TrkA.

II.B. Le récepteur TrkA

II.B.1 Découverte

Les récepteurs Trk, pour tropomyosin-related kinase, tiennent leur nom du fait que le premier Trk fut découvert lors du clonage d'un oncogène impliqué dans un cancer du côlon, celui-ci contient les 7 premiers des 8 exons de la tropomyosine fusionnés avec les domaines transmembranaire et cytoplasmique d'une nouvelle tyrosine kinase (Martin-Zanca et al., 1986). Le NGF fut ensuite identifié comme étant le ligand de ce premier Trk nommé TrkA (Klein et al., 1991). Feront suite les découvertes de TrkB, liant le BDNF et la NT-4/5, et de TrkC, récepteur de la NT3. En 1994, il est démontré que la NT-3 peut se lier à TrkA et TrkB mais avec une affinité réduite (Figure 10).

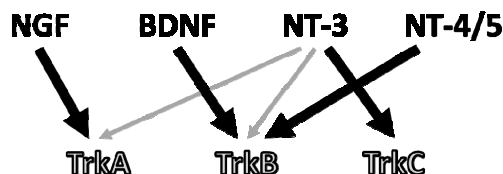


Figure 10. Spécificité de liaison des neurotrophines à leurs récepteurs tyrosine kinase.

TrkA est le récepteur du NGF, TrkB de la NT-4/5 et du BDNF, TrkC de la NT-3 (flèches en gras). La NT-3 peut également se fixer sur les récepteurs TrkA et TrkB avec une affinité réduite (flèches fines).

INTRODUCTION

II.B.2 Le gène codant TrkA

A l'image des neurotrophines, les gènes de leur récepteurs Trk présentent de fortes homologies de séquences et de structures suggérant que les gènes des Trk ont été formés lors d'événements similaires de ceux des neurotrophines. La table 4 présente les caractéristiques des gènes des récepteurs Trk nommés NTRK1 à 3 pour *Neurotrophin Receptor Kinase*.

Récepteur	Nom du Gène	Localisation chromosomique	Nombre d'exons	Taille de l'ARN (pb)	N° d'accension NCBI	Poids moléculaire (KDa)	N° d'accension swissprot
TrkA	NTRK1	1q21-q22	17	2663	NM_002529	140	P04629
TrkB	NTRK2	9q22.1	24	5608	NM_006180	145	Q16620
TrkC	NTRK3	15q25	20	2818	NM_002530	145	Q16288

Table 4. Caractéristiques géniques des récepteurs tyrosine kinase humains.

Récepteur tyrosine kinase TrkA, TrkB, TrkC et leur localisation chromosomique, leur taille de transcrit, leur poids moléculaire protéique et leur numéro d'accension dans les banques NCBI et swissprot.

Le gène NTRK1 se situe sur le chromosome 1, sa localisation exacte est 1q21-q22. Dans cette région du chromosome 1, on retrouve, entre autres, l'HDGF (Hepatoma-Derived Growth Factor) et l'INSRR (Insulin Receptor-Related Receptor). Le gène *trkA* contient 17 exons répartis sur 25 kb. Son promoteur ne contient pas de TATA box mais de nombreux sites de fixation putatifs de facteurs de transcription comme Sp1, AP1, AP2, Ap3, ATF et GCF.

Par des jeux d'épissage alternatif, chacun des 3 récepteurs tyrosine kinase se présente sous des isoformes de fonctions biologiques diverses. TrkA se présente ainsi sous 3 formes :

- **TrkA-I**, originellement cloné comme étant TrkA, est épissé de l'exon 9. C'est une forme ubiquitaire préférentiellement exprimé dans les tissus non neuronaux et ne peut lier la NT3.
- **TrkA-II** est l'isoforme le plus long puisque non-épissé. Il possède la même fonction biologique que TrkA-I mais est lui exprimé dans les tissus neuronaux (Clary and Reichardt, 1994).

INTRODUCTION

- **TrkA-III**, épissé des exons 6, 7 et 9, est un oncogène capable d'induire une signalisation indépendante du ligand NGF et de promouvoir un comportement tumorigène des cellules de neuroblastome (Tacconelli et al., 2004).

II.B.3 La protéine TrkA

D'un point de vue protéique, les récepteurs Trk ont également une structure commune de protéines transmembranaires de type 1 (un seul domaine transmembranaire) hautement glycosylées d'environ 800 acides aminés (Figure 11). Leurs domaines extracellulaires (environ 400 aa) contiennent deux **régions riches en cystéines** (domaines I et III) encadrant un **domaine riche en leucine** (domaine II), suivis dans la région juxtamembranaire de deux **domaines Immunoglobuline** (domaines IV et V ou IG-C1 et IG-C2). La partie extracellulaire des récepteurs Trk est très fortement glycosylée augmentant sensiblement leur poids moléculaire. Ces glycosylations permettent le bon adressage à la membrane et préviennent leur activation spontanée en absence de ligand (Watson et al., 1999).

Le domaine intracellulaire est composé d'une large région **tyrosine kinase** dont la séquence, conservée entre les espèces, présente plus de 75% d'homologie avec celle des autres récepteurs à tyrosine kinase. Au niveau du domaine intracellulaire de TrkA, les 4 sites tyrosines phosphorylables du domaine kinasique sont les tyrosines Y490, Y674/675, Y751 et Y785.

INTRODUCTION

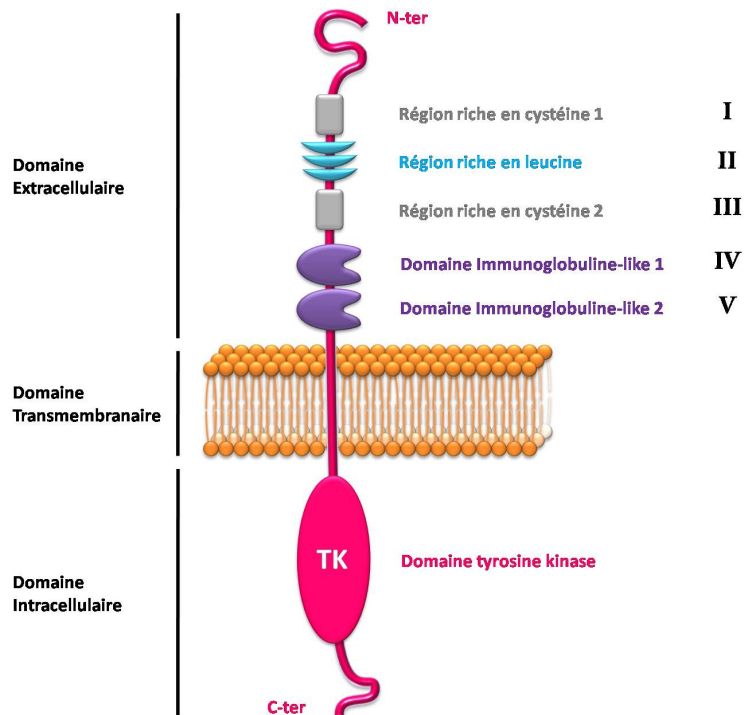


Figure 11. Représentation schématique du récepteur TrkA.

Le récepteur TrkA est composé d'un domaine extracellulaire constitué de régions riches en cystéine (domaines I et III), en leucine (domaine II), de 2 domaines Immunoglobuline like (domaines IV et V), d'un domaine transmembranaire unique et d'un domaine intracellulaire avec un large domaine tyrosine kinase.

Des expériences de délétion ont montré que le domaine V (IgG-like 2) du récepteur TrkA, tout comme dans les autres Trk, est responsable de la liaison du dimère de NGF (Perez et al., 1995; Ultsch et al., 1999; Urfer et al., 1995).

Le NGF lui, se lie à TrkA par l'intermédiaire de 2 régions. La première appelée « **conserved patch** » (du fait de sa conservation entre les neurotrophines) met en jeu la partie C-terminale des domaines 5 des Trk et la zone centrale des NT. La seconde région, « **specificity patch** », localisée en N-terminale du NGF, est caractéristique de chaque neurotrophine et constitue certainement le premier déterminant à la spécificité de liaison (Wiesmann et al., 1999).

Enfin, les différentes régions du domaine extracellulaire des Trk contrôlent les « dimérisations indépendantes du ligand ». Des délétions des domaines Ig-1 et/ou Ig-2 renforcent le potentiel de dimérisation et l'activation spontanée des récepteurs Trk prouvant leur implication dans l'inhibition des dimérisations en absence de ligand (Arevalo et al., 2000).

INTRODUCTION

II.C. Le récepteur p75^{NTR}

Le second type de récepteur aux neurotrophines est le récepteur p75^{NTR}, pour *neurotrophin receptor*, qui n'est autre que le récepteur commun à l'ensemble des neurotrophines et des proneurotrophines.

II.C.1 Découverte

C'est en 1973 que fut identifié p75^{NTR} comme étant le récepteur de la neurotrophine *Nerve Growth Factor* et appelé NGFR (NGF Receptor) (Herrup and Shooter, 1973). Son clonage en 1986 et des expériences de transfection ont révélé que le récepteur p75 liait le NGF à de faibles affinités, il fut alors nommé, récepteur de faible affinité du NGF (low affinity NGF receptor) (Chao et al., 1986; Johnson et al., 1986; Radeke et al., 1987). Avec la découverte des autres membres de la famille des neurotrophines, il est apparu que toutes liaient p75 avec la même affinité (10⁻⁹M) dans tous les types cellulaires, d'où le nom p75^{NTR} pour Neurotrophin Receptor (Rodriguez-Tebar et al., 1990; Squinto et al., 1991).

II.C.2 Le gène codant p75^{NTR}

Le gène *p75ntr* humain du récepteur p75^{NTR} couvre une région d'environ 23kb comptant 6 exons situés sur le chromosome 17, en région q12-q22. Ce gène code pour un ARNm de 3,8 kb contenant une courte région non codante d'environ 300 nucléotides à l'extrémité 5', et une région non codante plus longue d'environ 2000 nucléotides à l'extrémité 3' qui contient une séquence consensus de signal de polyadénylation (Johnson et al., 1986).

La séquence du promoteur de *p75ntr* est très similaire chez le rat, la souris et l'homme (Metsis, 2001), il ne possède pas de séquence consensus TATA ou CAAT (Chao et al., 1986) mais des séquences conservées riches en GC proches du site d'initiation de la transcription et constituant un élément de réponse au facteur de transcription SP1. Plusieurs E-box sont également présentes dans le promoteur de *p75ntr* et lieraient le facteur de transcription répresseur ME1

INTRODUCTION

ou les facteurs activateurs d'expression NeuroD ou bHLH (Chiaramello et al., 1995). Enfin d'autres régions du promoteur de *p75^{NTR}* ont été démontrées impliquées dans la régulation par l'acide rétinoïque, la vitamine D3 et la testostérone (Metsis et al., 1992; Naveilhan et al., 1996), cependant les éléments impliqués dans la régulation de l'expression de *p75^{NTR}* *in vivo* restent inconnus.

II.C.3 La protéine *p75^{NTR}*

Après le clivage du peptide signal de 28 acides aminés et les maturations post-traductionnelles, le récepteur *p75^{NTR}* humain est une protéine glycosylée de 399 acides aminés répartis dans le domaine extracellulaire (222 aa), le domaine transmembranaire (22 aa), et le domaine intracellulaire (155 aa).

- **Domaine transmembranaire et extracellulaire**

p75^{NTR} appartient à une superfamille de récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNF). La caractéristique de cette famille est la présence de domaines riches en cystéine (CRD) (Baldwin et al., 1992; Yan and Chao, 1991), répétitions de 6 cystéines chargées négativement et situées dans le domaine extracellulaire. Le récepteur *p75^{NTR}* compte 4 CRD numérotés de 1 à 4 à partir de l'extrémité N-terminale. Chacun contient trois ponts disulfures intra-chaînes, entraînant une conformation spécifique à chaque domaine CRD (Banner et al., 1993). Le domaine extracellulaire possède également des sites de N- et O-glycosylations notamment dans le domaine juxtamembranaire faisant passer sa masse moléculaire de 45 à 75 kDa.

Le domaine transmembranaire du récepteur *p75^{NTR}* est constitué d'une hélice transmembranaire unique et sa séquence en acides aminés est hautement conservée (Chao and Hempstead, 1995).

INTRODUCTION

- **Domaine intracellulaire**

Son domaine intracellulaire, unique et non catalytique, très conservé entre les espèces, possède un **site de palmitoylation** à la cystéine 279 (Roux and Barker, 2002) et est phosphorylable sur des résidus sérine et thréonine (Grob et al., 1985; Taniuchi et al., 1986). La fonction de ces modifications post-traductionnelles n'est pas totalement élucidée, elles pourraient participer aux interactions protéine-protéine, à la maturation et la localisation de la protéine à la membrane dans les rafts lipidiques, à l'endocytose, au transport vésiculaire ou à la régulation de la signalisation de p75^{NTR} (Bronfman and Fainzilber, 2004; Underwood et al., 2008). Sa phosphorylation pourrait également participer à la multimérisation du récepteur (Grob et al., 1985).

Comme tous les membres de la famille des récepteurs au TNF, p75^{NTR} contient dans son domaine cytoplasmique un **domaine de mort « Death Domain (DD) »**. Cependant, l'analyse des séquences protéiques de différents DD a révélé que le domaine de mort de p75^{NTR} était davantage lié à celui de protéines à DD de type II, plutôt qu'au DD de type I des autres membres de la famille des TNFR (Roux and Barker, 2002). Le domaine de mort est une structure compacte globulaire, d'environ 80 acides aminés, comportant 6 hélices α et permettant l'interaction avec des protéines adaptatrices responsables de l'activation de la voie des caspases et l'induction de l'apoptose (Roux and Barker, 2002). Le domaine de mort de p75^{NTR} diffère de celui des récepteurs de la famille du TNF par l'orientation de la 1^{ère} hélice, différente de près de 90°, lui permettant de recruter des protéines spécifiques et l'empêchant de multimériser en solution (Liepinsh et al., 1997; Roux and Barker, 2002; Wang et al., 2001). Enfin, le domaine de mort de p75^{NTR} comporte deux résidus tyrosine, Y337 et Y366, phosphorylés après liaison du ligand sur p75^{NTR}. Le récepteur, ainsi phosphorylé, active alors la protéine G RAS au moyen des mêmes protéines adaptatrices que les récepteurs Trk (Blochl et al., 2004).

L'autre principale région du domaine intracellulaire du récepteur p75^{NTR}, plus récemment identifiée, est un petit domaine de 29 aa localisé dans la partie intracellulaire juxtamembranaire. Ce domaine fut baptisé « **Chopper** » en référence à un célèbre criminel australien puisqu'il fut démontré nécessaire et suffisant pour initier la mort cellulaire. Chopper

INTRODUCTION

présente 95% d'homologie de séquence entre l'homme, le rat et la souris mais n'est cependant pas conservé dans les autres membres de la famille des TNFR (Coulson et al., 2000).

Le **tripeptide Ser-Pro-Val** à l'extrémité C-terminale intracellulaire du récepteur p75^{NTR} est conservé chez les différentes espèces, et est un site consensus de liaison à des domaines PDZ (Post-synaptic disc-large zona). Les protéines contenant des domaines PDZ, telle que FAP-1 (Fas-associated phosphatase-1), sont des molécules adaptatrices permettant la formation de complexes protéiques de signalisation intracellulaire (Sheng and Sala, 2001).

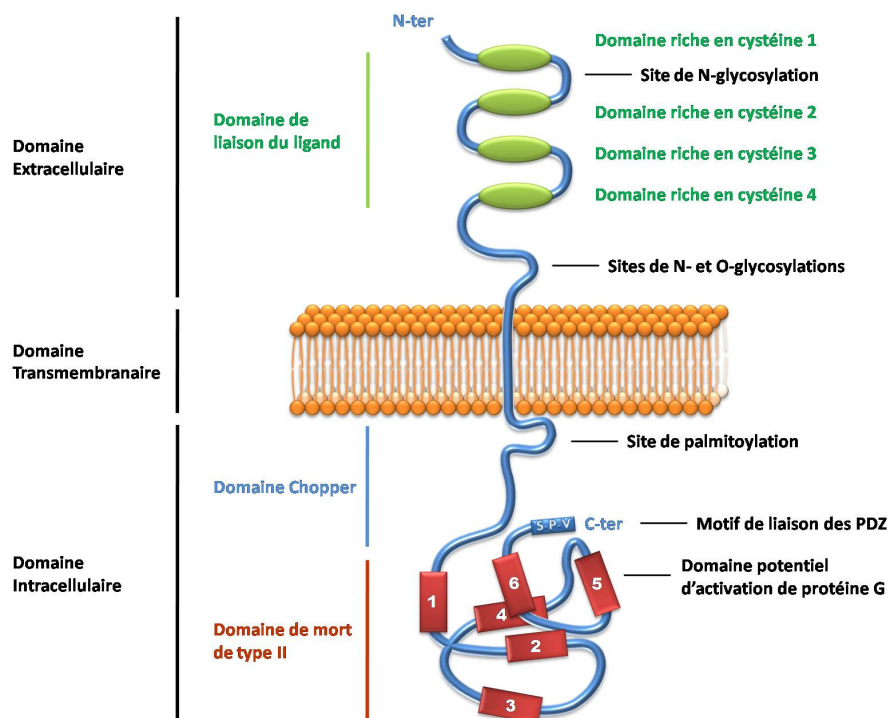


Figure 12. Représentation schématique du récepteur p75^{NTR}.

Le récepteur p75^{NTR} est constitué d'un domaine extracellulaire comprenant 4 régions riches en cystéine (CRD) et plusieurs sites de glycosylations, d'un domaine transmembranaire unique, et d'un domaine intracellulaire comprenant un domaine Chopper juxtamembranaire et un domaine de mort (DD) caractéristique des récepteurs de la mort ainsi qu'un domaine potentiel d'activation de protéine G et un domaine SPV en C-terminal.

(Roux and Barker, 2002)

Cependant, le récepteur p75^{NTR} peut, par des jeux d'épissages alternatifs et de protéolyses, se présenter sous différentes formes tronquées représentées en figure 13.

Un épissage alternatif de l'exon 3 du gène de p75^{NTR} peut générer un isoforme dépourvu des régions riches en cystéines 2, 3, 4 de son ectodomaine et ne pouvant fixer les neurotrophines

INTRODUCTION

(Rodriguez-Tebar et al., 1990). Les domaines intracellulaires et transmembranaires restent cependant intacts et fonctionnels bien que la fonction biologique de ce $p75^{NTR}$ tronqué reste inconnue.

- Le récepteur entier $p75^{NTR}$ peut être clivé par une protéase extracellulaire, l'ADAM 10 ou la 17, libérant un fragment extracellulaire composé des 4 régions riches en cystéines. Ce fragment nommé $p75^{NTR}$ -ECD, pour *Extracellular Domain*, est soluble et toujours capable de lier les neurotrophines. L'autre moitié du récepteur, comportant les domaines transmembranaire et intracellulaire est appelé CTF pour *C-Terminal Fragment*. Ce premier clivage est un pré-requis à un second réalisé sur le CTF par un complexe γ sécrétase intracellulaire (presenilin dépendant γ secretase). Il génère un fragment intracellulaire actif, le $p75^{NTR}$ -ICD, pour *Intracellular Domain*. Cet ICD peut lier la protéine TRAF6 grâce à son domaine de mort et conduire à l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Ce fragment a également été identifié dans le noyau des cellules, suggérant un rôle direct de régulateur transcriptionnel (Kanning et al., 2003).

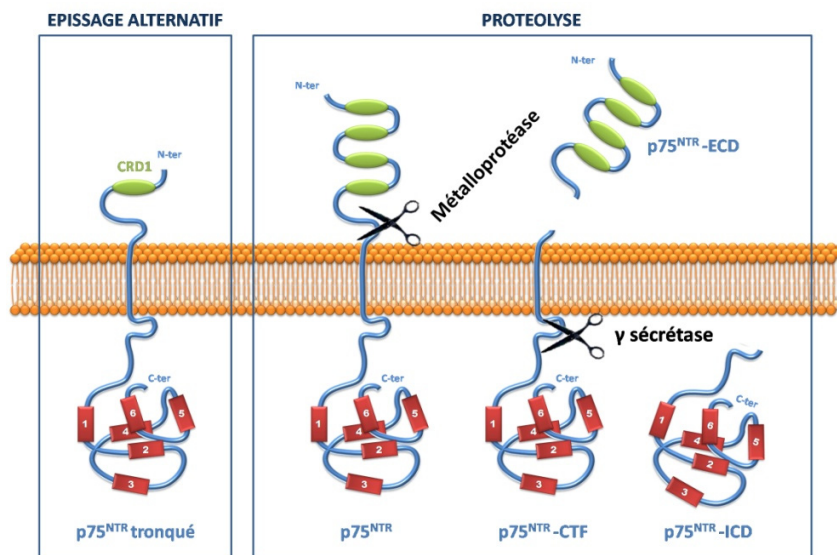


Figure 13. Les différentes formes du récepteur $p75^{NTR}$

La transcription du gène $p75^{NTR}$ conduit à la forme complète du récepteur mais aussi à une forme tronquée résultant de l'épissage alternatif de l'exon 3. Cette forme tronquée possède un domaine extracellulaire très court constitué d'un seul CRD et ne pouvant plus lier les neurotrophines. Des clivages protéolytiques séquentiels peuvent également

INTRODUCTION

intervenir et libérer différents fragments du récepteur. Le clivage par une métalloprotéase conduit à la libération de l'ECD (Extracellular Domain), soluble et pouvant toujours lier les neurotrophines, et d'autre part le CTF (C Terminal Fragment), constitué des domaines transmembranaire et intracellulaire intact pouvant toujours recruter des protéines. Enfin, le clivage du CTF par une γ -sécrétase libère l'ICD (Intracellular Domain) dans le cytoplasme. Cette forme peut réguler la transcription de gènes de manière directe, en migrant dans les noyaux des cellules et en jouant le rôle de facteur de transcription, ou de manière indirecte en recrutant des protéines adaptatrices.

(D'après Roux et Barker, 2002 et Chao, 2003)

Contrairement aux autres membres de la superfamille des récepteurs au TNF qui lient des ligands trimériques, $p75^{\text{NTR}}$ fixe les neurotrophines en dimère suggérant un mécanisme de reconnaissance ligand-récepteur différent.

Un premier modèle a proposé une interaction $p75^{\text{NTR}}$ -NGF avec un rapport asymétrique 2:1, c'est-à-dire 2 molécules de NGF s'associent à une molécule $p75^{\text{NTR}}$ (He and Garcia, 2004). Dans ce modèle, le NGF est reconnu par $p75^{\text{NTR}}$ grâce à deux sites situés sur un monomère de NGF (conservés dans les autres neurotrophines), néanmoins la contribution des 2 monomères est indispensable à l'interaction. Le site I du NGF s'associe aux CRD1 et CRD2 de $p75^{\text{NTR}}$, le site II interagit avec la jonction CRD3-CRD4. Dans ce modèle, la déformation du NGF induite par la fixation à $p75^{\text{NTR}}$ interdit la fixation d'un deuxième récepteur $p75^{\text{NTR}}$ sur le dimère de NGF mais autorise la liaison d'un récepteur TrkA.

Cependant, un modèle plus récent, réalisé lui sur le domaine extracellulaire de $p75^{\text{NTR}}$ humain et N-glycosylé montre le même mode de liaison du NGF à $p75^{\text{NTR}}$ mais met clairement en évidence un ratio 2 : 2 du complexe $p75^{\text{NTR}}$ -NGF dans leurs conditions expérimentales (Aurikko et al., 2005). Les différences observées entre ces études suggèrent un rôle important de la glycosylation du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ dans la liaison au NGF. De plus, l'existence de ces différentes stœchiométries pourrait suggérer différents rôles de ces formes, par le recrutement de protéines adaptatrices et l'activation de différentes voies de signalisation (Aurikko et al., 2005).

Notons que $p75^{\text{NTR}}$ est également le récepteur des pro-neurotrophines et que sa liaison avec elles, bien que de plus grande affinité, se fait par des acides aminés du domaine « mature » des pro-neurotrophines, commun avec les neurotrophines matures.

INTRODUCTION

La spécificité des pro-neurotrophines pour $p75^{NTR}$ est liée au fait que la liaison des NT avec leur Trk respectif implique l'extrémité N-terminale de la neurotrophine (Banfield et al., 2001). Or, cette extrémité N-terminale est séquestrée par le pro-domaine des pro-neurotrophines. La liaison à $p75^{NTR}$, ne faisant pas intervenir cette extrémité, reste elle possible. Ces observations suggèrent que l'activité biologique des neurotrophines, et du NGF en particulier, pourrait être régulée par son clivage protéolytique, avec le pro-NGF activant préférentiellement le récepteur $p75^{NTR}$ et sa signalisation, et le NGF mature activant préférentiellement le récepteur TrkA (Chao, 2003). Cependant, des travaux plus récents remettent en cause ce dogme de la sélectivité stricte des pro-neurotrophines pour le récepteurs $p75^{NTR}$ en montrant la fixation possible du pro-NGF et du pro-BDNF respectivement au récepteur TrkA et TrkB (Fahnestock et al., 2004; Fayard et al., 2005). Ainsi, le pro-NGF est capable, certes avec moins d'affinité que le NGF, de se fixer à TrkA, d'induire alors sa phosphorylation et l'activation de ERK et Akt suivie la différenciation des PC12 avec cependant moins d'efficacité que le NGF. Une nouvelle étude dans des cellules PC12 montre toutefois que la très forte affinité des pro-neurotrophines pour $p75^{NTR}$ ne permet leur fixation au Trk dans des conditions physiologiques. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de l'endocytose ou de la furine, ainsi que de forme résistante du pro-NGF, bloquent l'activation de TrkA par le pro-NGF mais pas par le NGF, prouvant que l'activation de TrkA par le pro-NGF nécessite l'internalisation du récepteur et le clivage de la pro-neurotrophine (Boutilier et al., 2008).

II.D. TrkA, p75^{NTR} et cancer

Le NGF et ses récepteurs sont connus pour être impliqués dans le développement et le maintien du système nerveux.

Des expériences de KO ont montré que l'inactivation des gènes Trk est dramatique pour le développement du système nerveux et provoque l'inhibition totale de certaines populations neuronales. Plus précisément, l'absence de TrkA engendre des souris plus petites, viables à la naissance mais qui ne survivent pas au-delà d'un mois. On observe que les racines dorsales des ganglions et des neurones trijumeaux de ces souris sont très réduites à la naissance, et que les ganglions sympathiques disparaissent après 10 jours. L'axe NGF-TrkA serait ainsi essentiel au développement du système nerveux central et périphérique.

Le phénotype KO pour p75^{NTR} se traduit lui par des altérations moins graves avec une diminution de l'innervation sensorielle, une perte de fonctions neurales associée à une perte neuronale. Il a ainsi été établi que les récepteurs Trk sont responsables de la plupart des fonctions biologiques comme la survie neuronale ou la croissance axonale alors que p75^{NTR} serait impliqué dans la régulation de la survie et de l'apoptose (Snider, 1994).

Le NGF et ses récepteurs, grandement impliqués dans le développement du système nerveux sont aussi étroitement liés à de nombreuses pathologies qui le touchent, telles que la schizophrénie, les œdèmes cérébraux ou la maladie d'Alzheimer (Schor, 2005). Cependant, TrkA et p75^{NTR} peuvent également être exprimés dans des tissus non neuronaux et sont ainsi retrouvés impliqués dans des maladies comme l'asthme mais aussi, comme nous allons le voir, dans de nombreux cancers.

Le NGF et ses récepteurs peuvent exercer, selon le type de cancer, une action anti- ou pro-tumorale selon divers mécanismes reportés en table 5.

INTRODUCTION

Cancer	TrkA	p75 ^{NTR}
Cancer Hépatique		blocage du cycle cellulaire
Cancer Gastrique	(apoptose ?)	blocage du cycle cellulaire
Neuroblastome	Différenciation	
	TrkA III : survie / tumorigenèse / angiogenèse	
Cancer prostatique	survie / prolifération / migration	différenciation apoptose / blocage du cycle cellulaire
Cancer pulmonaire SCLC	inhibition de la prolifération / migration / croissance sans ancrage	
Cancer pulmonaire non SCLC	croissance sans ancrage / inhibition de l'apoptose	
Cancer pancréatique	survie / croissance / migration/ tumorigenèse	
Cancer thyroïdiens	Prolifération	
Mélanome	migration / prolifération	survie / invasion / migration (+sortiline)
Cancer ovarien	(angiogenèse)	
Cancer du sein	Prolifération	survie

Table 5. Effets pro- et anti-tumoraux des récepteurs du NGF dans différents cancers.

Les cases bleues indiquent un effet anti-tumoral et les cases mauves un effet pro-tumoral des récepteurs TrkA et p75^{NTR} dans les cancers.

II.D.1.a Effet anti-tumoral

- **Cancers Hépatique et Gastrique**

Dans ces deux cancers, p75^{NTR} est identifié comme un potentiel suppresseur de tumeur. En effet, l'expression du récepteur p75^{NTR} est sensiblement diminuée voire absente dans les cancers gastriques et les cancers hépatiques comparativement aux tissus sains adjacents, phénomène retrouvé dans des lignées cellulaires. De plus, la surexpression de p75^{NTR} dans des cellules cancéreuses gastriques ou hépatiques inhibe la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* selon le même mécanisme. En effet, dans ces deux types de cancer le même laboratoire a montré un arrêt du cycle cellulaire en G0 induit par la surexpression de p75^{NTR} *via* une régulation des molécules du cycle cellulaire telles que les cyclines (Jin et al., 2007; Yuanlong et al., 2008). Ainsi, p75^{NTR} serait capable d'inhiber l'invasion et la formation de métastases dans les

INTRODUCTION

cancers gastriques (Jin et al., 2007). Notons que dans ce même cancer, l'expression du NGF et de TrkA se trouve également diminué comparativement aux tissus sains, suggérant un possible rôle anti-tumoral, encore non identifié, de l'axe NGF/TrkA dans le cancer de l'estomac (Du et al., 2003).

II.D.1.a Effet pro- et anti-tumoral

- **Neuroblastome**

Dans ces tumeurs, la surexpression de TrkA est corrélée à un bon pronostic (Eggert et al., 2000; Kogner et al., 1993) et la stimulation par le NGF des cellules *via* TrkA induit leur différenciation. De plus, la surexpression de TrkA dans les cellules de neuroblastomes réduit l'angiogenèse tumorale dans des modèles de xénogreffes (Eggert et al., 2002).

Cependant, lors de la progression tumorale, l'expression de l'isoforme TrkA-III prend le pas sur celle des TrkA-I et TrkA-II (Tacconelli et al., 2004). Cette isoforme est elle capable de s'autoactiver et d'antagoniser la signalisation de TrkA-I et -II indépendamment du NGF, activant ainsi la voie PI3K/Akt/NF- κ B et augmentant la survie des cellules. De plus, TrkA-III augmente la tumorigenèse et l'angiogenèse *in vivo* (Tacconelli et al., 2005). p75^{NTR} semble induire l'apoptose dans les cellules de neuroblastome bien que son rôle potentiel dans la maladie n'est pas clairement défini.

Dans les neuroblastomes, le rôle de l'axe NGF/TrkA évolue avec la progression tumorale : au stade précoce, cet axe exerce un effet anti-tumoral ; à un stade plus avancé, l'expression préférentielle de l'isoforme TrkA-III augmente l'agressivité tumorale.

- **Cancer prostatique**

Dans ce type cellulaire, les deux récepteurs du NGF jouent un rôle opposé et l'action du NGF va ainsi dépendre de la balance TrkA/p75^{NTR}.

En effet, alors que TrkA n'est pas exprimé dans les cellules prostatiques normales, son expression est augmentée au cours de la progression tumorale prostatique. Au contraire, p75^{NTR}

INTRODUCTION

est exprimé dans les cellules prostatiques normales et son expression diminue lors de la progression tumorale (Papatsoris et al., 2007).

Ainsi, il résulte de l'activation de TrkA par le NGF, la survie, la prolifération et la migration des cellules prostatiques cancéreuses (Festuccia et al., 2007; Weeraratna et al., 2000). De plus, l'inhibition de l'axe NGF/TrkA dans des modèles de xénogreffes de souris réduit la croissance tumorale (Miknyoczki et al., 2002).

A l'opposé, la perte d'expression de $p75^{NTR}$ est corrélée à la progression tumorale et contribuerait à la carcinogénèse par l'inhibition de l'apoptose, la stimulation de la prolifération cellulaire et des métastases. En effet, les cellules prostatiques exprimant le récepteur $p75^{NTR}$ sont à la fois induites en apoptose par la voie mitochondriale et l'activation des caspases 7 et 9 mais aussi retardées dans leur cycle cellulaire par blocage de la transition G0-G1 (Khwaja et al., 2006; Pflug et al., 1992).

Ainsi, dans le cancer de la prostate, le NGF peut favoriser d'une part le développement tumoral *via* TrkA, et d'autre part il peut agir en tant que suppresseur de tumeur *via* $p75^{NTR}$ (Krygier and Djakiew, 2001; Krygier and Djakiew, 2002).

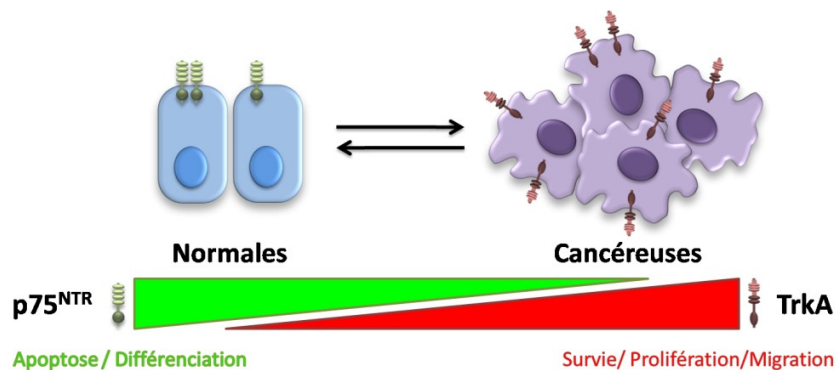


Figure 14. Expression et rôle de TrkA et de $p75^{NTR}$ dans les cellules prostatiques.

Dans les cellules prostatiques normales, seul le récepteur $p75^{NTR}$ est exprimé et peut induire l'apoptose ou la différenciation. Au cours de la cancérisation, l'expression de $p75^{NTR}$ est perdue au profit de celle de TrkA qui induit alors survie, prolifération et migration des cellules prostatiques cancéreuses.

- **Cancer pulmonaire**

Le cas des carcinomes pulmonaires est également particulier car ils peuvent être divisés en 2 groupes principaux : les cancers à petites cellules (SCLC, Small Cells Lung Cancer) et les cancers non à petites cellules (non-SCLC). Et, selon le type de cancer, le NGF et TrkA ne vont pas avoir la

INTRODUCTION

même influence sur leur développement alors que p75^{NTR} ne semble pas être exprimé (Ricci et al., 2001).

Les **cancers pulmonaires à petites cellules (SCLC)** représentent 20% des cancers pulmonaires et sont issus de cellules neuroendocrines pulmonaires. Ils sont très agressifs et se disséminent précocement lors du développement tumoral. Or, ces cellules expriment le récepteur TrkA (Missale et al., 1998) et leur prolifération, leur migration et leur croissance sans ancrage se trouvent inhibées par un traitement au NGF. De plus, l'injection de NGF inhibe la formation et la croissance tumorale de xénogreffes *in vivo* (Missale et al., 1998). Ces études indiquent un rôle anti-tumoral du NGF et de TrkA bien que la compréhension du rôle physiopathologique de l'axe NGF/TrkA dans ce type de cancer reste à déterminer.

Les **Cancers pulmonaires non à petites cellules (non-SCLC)** regroupent principalement les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes et les carcinomes bronchiolo-alvéolaires. Ces tumeurs expriment principalement soit le NGF, soit son récepteur TrkA (Koizumi et al., 1998; Ricci et al., 2005; Ricci et al., 2001), ou les deux dans un tiers des cancers bronchiolo-alvéolaires (Hoyle, 2003). Dans des lignées issues de tumeurs non-SCLC, le NGF stimule la croissance des cellules en agar mou (Oelmann et al., 1995) alors que l'inhibition de TrkA par le K252a induit l'apoptose des cellules A549 issues d'adénocarcinomes pulmonaires (Perez-Pinera et al., 2007). Ainsi, l'axe NGF/TrkA favoriserait le développement des tumeurs non-SCLC, contrairement aux tumeurs SCLC.

II.D.1.b Pro-tumoral

- **Cancer du pancréas**

Les cellules pancréatiques normales expriment les neurotrophines ainsi que leurs récepteurs Trk respectifs (Friess et al., 1999; Zhu et al., 1999). Le NGF a alors un effet anti-apoptotique *via* TrkA (Navarro-Tableros et al., 2004). De plus NGF provoque une augmentation de la sécrétion d'insuline par ces cellules qui jouerait alors un rôle anti-apoptotique sur les îlots (Miao et al., 2005; Miao et al., 2006). Dans les adénocarcinomes ductales pancréatiques, NGF et TrkA sont surexprimés, cependant aucune corrélation n'est observée entre leurs niveaux d'expression et les stades/grades histopathologiques des carcinomes (Miknyoczki et al., 2002; Schneider et al.,

INTRODUCTION

2001; Zhu et al., 1999) . On constate tout de même que, *in vitro*, l'axe NGF/TrkA stimule la croissance (Sakamoto et al., 2001; Zhu et al., 2001) et la migration des cellules pancréatiques cancéreuses. De plus, les cellules pancréatiques surexprimant le NGF sont plus tumorigènes *in vivo* (Zhu et al., 2002). Le NGF et son récepteur TrkA jouent ainsi un rôle pro-tumoral dans les carcinomes pancréatiques. P75^{NTR} semble induire un effet contraire à TrkA et l'effet global du NGF dépendrait de la balance p75^{NTR}/TrkA, à l'image du cancer de la prostate (Zhang et al., 2005). Toutefois l'action de p75^{NTR} dans les cancers prostatiques reste, à ce jour, peu documentée.

- **Cancers thyroïdiens**

TrkA est exprimé dans les tissus thyroïdiens hyperplasiques et dans les carcinomes médullaires thyroïdiens, alors qu'il est absent des tissus normaux (McGregor et al., 1999). De plus, le NGF stimule la prolifération des cellules de carcinomes médullaires thyroïdiens et la sécrétion de Calcitonine, une hormone utilisée comme marqueur pour ces carcinomes (Goretzki et al., 1987). D'autre part, les carcinomes papillaires (80% des carcinomes thyroïdiens) expriment fréquemment des protéines de fusion impliquant TrkA. Ces protéines de fusion possèdent un pouvoir oncogénique du fait de l'activation constitutive du domaine tyrosine kinase de TrkA. D'autre part, sans en connaître l'action, p75^{NTR} est trouvé exprimé dans les cancers thyroïdiens papillaires (Rocha et al., 2006). Ainsi, TrkA, et potentiellement p75^{NTR}, jouent un rôle pro-tumoral dans les carcinomes thyroïdiens.

- **Mélanome**

Le mélanome est une tumeur de la peau très agressive qui prend son origine dans l'épiderme et les mélanocytes. Dans les cellules de mélanome, l'expression de p75^{NTR} augmente durant la progression tumorale et son activation par le NGF est associée à l'invasion des cellules cancéreuses grâce à la sécrétion de métalloprotéases et ce de façon indépendante à TrkA (Herrmann et al., 1993; Marchetti et al., 1993). Ainsi, après avoir favorisé la colonisation du cerveau via la stimulation de la production d'héparanase (une enzyme dégradant la matrice

INTRODUCTION

extracellulaire), p75^{NTR} agit dans les métastases du cerveau comme un récepteur de survie (Marchetti et al., 1993; Menter et al., 1994; Walch et al., 1999).

De plus, le proNGF induit la migration des cellules de mélanomes qui se révèlent exprimer la sortiline, co-récepteur de p75^{NTR} (Shonukan et al., 2003). Cet effet de migration, ainsi que la prolifération cellulaire sont également stimulées par l'activation du récepteur TrkA (Truzzi et al., 2008) exprimé et phosphorylé dans les cellules de mélanomes (Florenes et al., 2004).

- **Cancer ovarien**

Les cellules ovariennes normales expriment le NGF ainsi que ses récepteurs (Campos et al., 2007). Il participe ainsi au développement de l'ovaire en stimulant l'expression du récepteur à la FSH (FSHR) et la sécrétion d'œstrogènes ainsi qu'en réduisant l'expression de la progestérone (Dissen et al., 2001; Romero et al., 2002; Salas et al., 2006). Or, des études ont montré que l'expression de FSHR au niveau des cellules de l'épithélium de surface des ovaires peut induire la néoplasie et le NGF pourrait ainsi participer à la tumorigenèse ovarienne *via* son effet sur l'expression de FSHR (Bose, 2005).

Dans les carcinomes ovariens, l'expression de p75^{NTR} n'est pas modifiée mais le niveau d'expression de phospho-TrkA lui est corrélé à un mauvais pronostic. De plus, on observe, dans les cellules endothéliales des carcinomes ovariens, la coexpression du NGF, de phospho-TrkA et de molécules angiogéniques suggérant un rôle de l'axe NGF/TrkA dans l'angiogenèse tumorale (Davidson et al., 2003; Odegaard et al., 2007). Ainsi, non seulement le NGF joue un rôle dans la progression tumorale en stimulant l'angiogenèse, mais il pourrait participer à la carcinogenèse.

- **Cancer du sein**

Les cellules normales de sein expriment les récepteurs TrkA et p75^{NTR} (Descamps et al., 2001a), mais pas le NGF (Dolle et al., 2003). De plus, le NGF exogène n'a aucun effet sur la croissance des cellules normales (Descamps et al., 1998).

Dans le cancer du sein, les cellules cancéreuses expriment TrkA et p75^{NTR} mais également le NGF (Aragona et al., 2001; Descamps et al., 2001a) et cette expression semble associée à un mauvais pronostic (Davidson et al. 2004). D'autre part, la forme active de TrkA (phospho-TrkA) est

INTRODUCTION

retrouvée très fréquemment dans les effusions (93%) et les récurrences locorégionales (92%), alors qu'elle est retrouvée de manière moins fréquente dans les tumeurs primaires (41%). L'activation de TrkA semble ainsi associée à un caractère tumoral plus agressif. *In vitro*, notre laboratoire a également montré que les cellules mammaires cancéreuses sécrètent du NGF qui stimulerait, *via* une boucle autocrine, leur survie, leur prolifération et leur migration (Descamps et al., 2001b; Dolle et al., 2005). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou d'anticorps bloquants, dans les cellules de cancer de sein MCF-7, a permis d'attribuer l'action mitogène du NGF à l'activation de TrkA et des MAP kinases (Erk) tandis que l'activité anti-apoptotique passerait par p75^{NTR} et l'induction de la voie NF-kB (Descamps et al., 2001b). Enfin, l'inhibition du NGF (Anticorps neutralisant, siRNA) et de TrkA (K252a) induit une forte réduction de la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes (Adriaenssens et al., 2008).

D'autres travaux ont montré que le NGF coopère avec p185 (erb-B2) pour activer la croissance des cellules de cancer du sein et que le tamoxifène, drogue anti-oestrogénique couramment utilisée en thérapie du cancer du sein, inhibe l'effet mitogène du NGF (Chiarenza et al., 2001; Tagliabue et al., 2000).

En résumé, l'axe NGF/TrkA favorise globalement le développement de tumeurs d'origine tissulaire différente, (à l'exception des neuroblastomes et des cancers pulmonaires à petites cellules). Cependant l'autre récepteur du NGF, p75^{NTR}, présente lui une dualité de rôle puisqu'il est capable d'une action pro-tumorale, ou anti-tumorale allant jusqu'à contre-balancer l'effet de NGF/TrkA dans les tumeurs prostatiques.

Ces différents effets de l'activation de TrkA et p75^{NTR} dépendent du contexte cellulaire comprenant le ligand, les adaptateurs et les corécepteurs à leur portée, mais aussi de l'interaction entre TrkA et p75^{NTR} eux même.

II.E. Mécanismes d'action du NGF et de ses récepteurs

II.E.1 Les voies de signalisation des récepteurs du NGF

II.E.1.a Voies de signalisation activées par TrkA

L'activation des récepteurs Trk est initiée par la fixation des neurotrophines matures en dimères provoquant la dimérisation des récepteurs et leur autophosphorylation sur les tyrosines de la boucle d'activation du domaine kinasique.

Les 3 voies de signalisation majeures activées par le récepteur tyrosine kinase TrkA sont les voies des MAP kinases, de la PI3 kinase et de la PLC γ et sont reportées dans la figure 12.

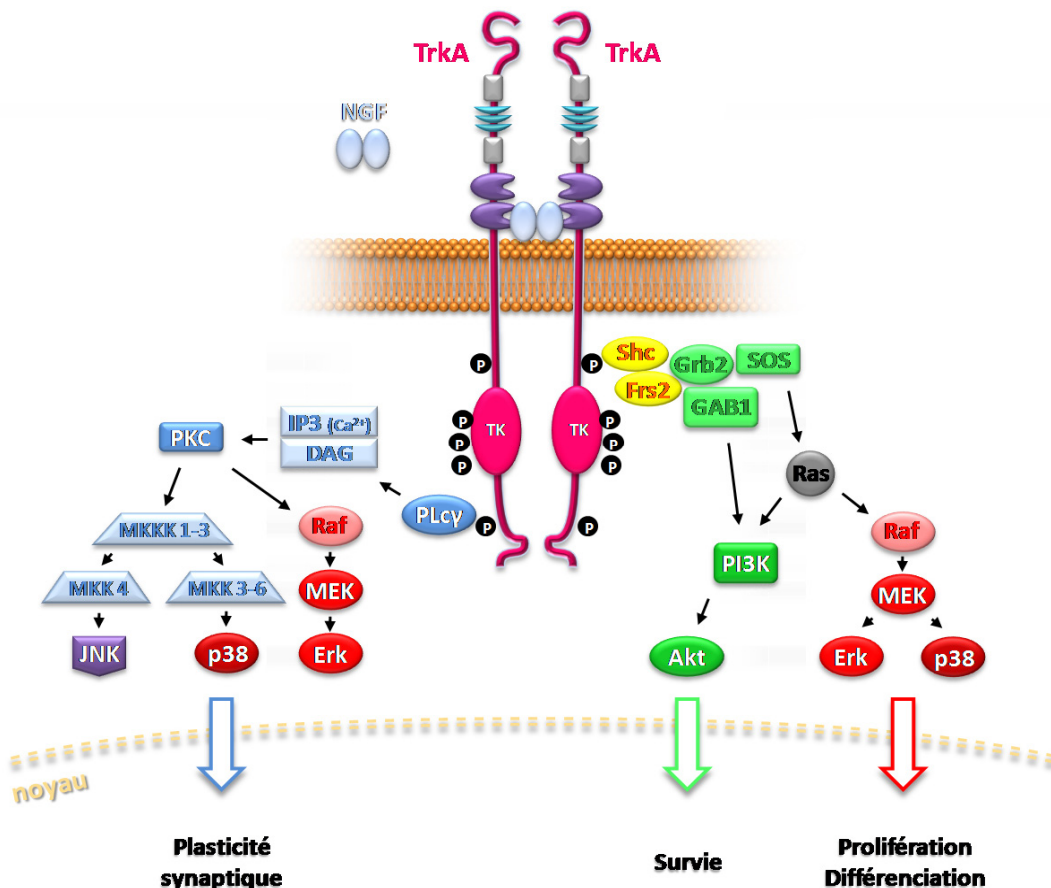


Figure 15. Représentation schématique des voies de signalisation des TrkA.

La fixation du NGF sur le récepteur tyrosine kinase TrkA, l'active par dimérisation et autophosphorylation. Les tyrosines phosphorylées recrutent des adaptateurs et activent les voies de signalisation Ras / Raf / MAPK, PI3 kinase / AKT et PLC γ (Phospholipase C γ). MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ; Shc : Src homology-2

INTRODUCTION

containing protein ; Grb-2 : growth factor receptor-bound protein ; GAB 1/2 :GrB2 Associated Binding Protein 1/2; FRS2: Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2; SOS : son of sevenless ; Ras : Ras GTPase activating protein ; Raf : Raf kinase; ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinase ; MEK : MAP ERK kinase ; PKC : Protein Kinase C ; DAG : Diacylglycerol ; PI3K : Phosphatidyl Inositol Tri-Phosphate kinase ; JNK : c-jun N-terminal kinase ; p38 : p38 MAP Kinase ; MKKK : MAP-kinase kinase kinase ; MKK : MAP-kinase kinase.

- **La voie des MAP Kinases :** Le récepteur TrkA activé, donc phosphorylé, recrute la protéine adaptatrice Grb2 interagissant avec la protéine SOS, un facteur activateur de la petite protéine G, Ras. La cascade de phosphorylation des MAPK peut alors avoir lieu, avec les phosphorylations de MEK1/2 puis Erk1/2 et de p38. De la même façon, la protéine FRS2 se fixe à TrkA activé et recrute les protéines adaptatrices Grb2 activant la même voie de signalisation SOS-Ras-MAPK. ERK1/2 phosphorylé conduit à l'activation et à la translocation dans le noyau de facteurs de transcription activant la transcription de gènes responsables de la différenciation neuronale et de la prolifération cellulaire.
- **La voie PI3 Kinase/AKT :** Cette voie est engagée par RAS ou *via* des protéines GAB recrutées par le complexe protéique shc-Grb2 lié à TrkA. La PI3K ainsi activée induit la formation de phosphatidyl inositol 3,4-biphosphate qui active en collaboration avec des PDK (phosphoinositide-dependent kinase) la protéine Akt. Akt entraîne la transcription de gènes décrits pour leur implication dans la survie cellulaire par l'intermédiaire notamment de NFκB, mais peut également agir directement avec des protéines de la cascade apoptotique telles que Bad (Bcl-2/Bcl-x-associated death promoter) ou encore la caspase 9.
- **La voie PLCγ / PKC :** La PLCγ se fixe à TrkA et est activée suite à sa phosphorylation par la kinase. La PLCγ activée va alors cliver le phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). L'IP3 induit une libération de calcium dans le cytoplasme de la cellule. Le DAG active les protéines kinases C (PKC) en synergie avec le calcium libéré. Ces voies conduisent à l'activation de la cascade Erk suite à la phosphorylation de Raf, et, des MAPK p38 et JNK par des cascades d'activation de MAPK (MKKK1-3 ; MKK4 et MKK3-6). Cette voie est impliquée dans la plasticité synaptique et la croissance des neurites.

INTRODUCTION

II.E.1.b Voies de signalisation activées par p75^{NTR}

Appartenant à la famille des récepteurs au TNF, p75^{NTR} ne possède pas d'activité catalytique propre. La signalisation de p75^{NTR} se fait donc par le recrutement de protéines adaptatrices intracellulaires menant à l'activation de diverses voies de signalisation représentées sur la figure 16. Ces voies de signalisation, majoritairement établies dans des modèles neuronaux et dans les cellules PC12, induisent majoritairement, selon le contexte cellulaire, la survie ou la mort cellulaire par apoptose, pourtant antagonistes.

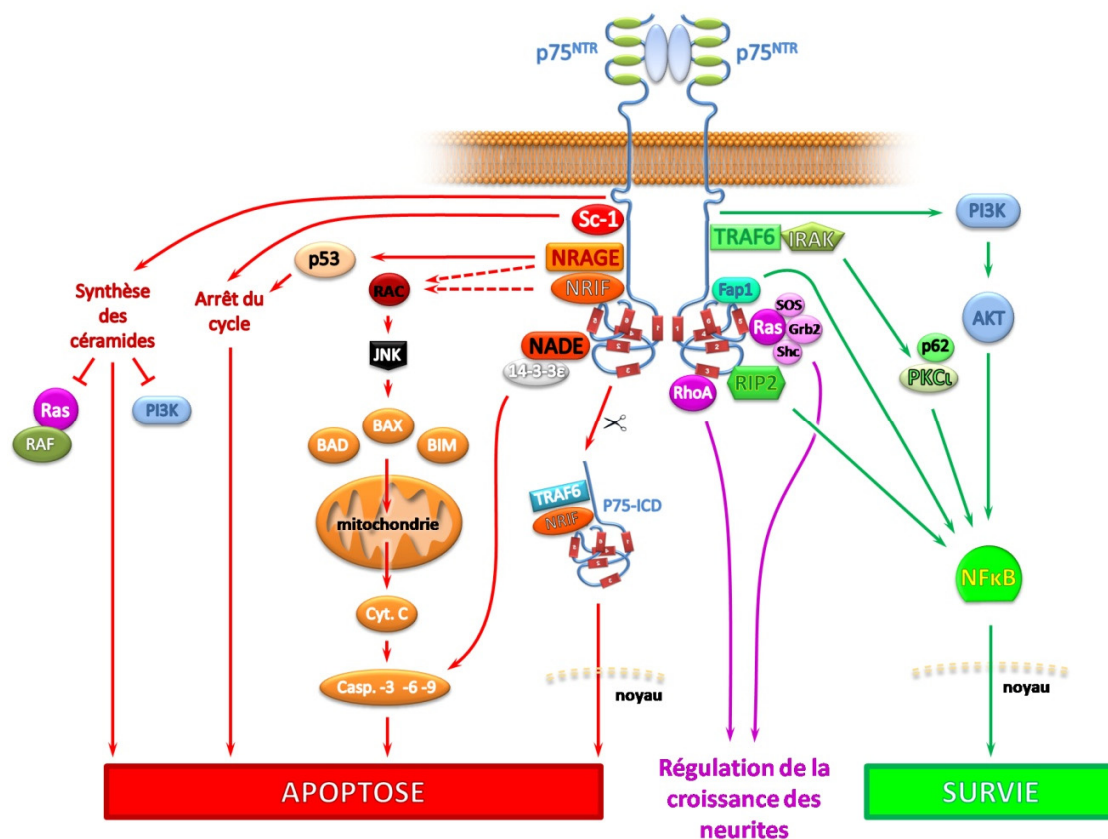


Figure 16. Représentation schématique des voies de signalisation de p75^{NTR}

La fixation des neurotrophines à p75^{NTR} entraîne le recrutement de protéines adaptatrices sur les domaines intracellulaires du récepteur. Elles initient des voies de signalisation de survie via NFκB ou de mort via JNK, un arrêt du cycle cellulaire ou les céramides et la voie mitochondriale apoptotique. Les protéines G RhoA et Ras initient une voie plus mineure de neuritogenèse. Le clivage de p75^{NTR} libère un domaine intracellulaire (p75-ICD) capable de se transloquer dans le noyau et d'induire l'apoptose. TRAFs : Tumor Necrosis Factor Associated Factor; IRAK : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase ;RIP-2 : Receptor-Interacting Protein 2 ; PKC : Protein Kinase C ; PI3K : Phosphatidyl Inositol Tri-Phosphate kinase ; NRIF : Neurotrophin Receptor Interacting Factor ; Sc-1 : Schwann cell factor-1 ; NADE : Neurotrophin receptor Associating Death Effector ; NRAGE : Neurotrophin Receptor-interacting MAGe homolog ; JNK : c-jun N-terminal Kinase ; Bad: Bcl-2/Bcl-x-associated death

INTRODUCTION

promoter ; *Bax* : *Bcl-2-associated X protein* ; *Bim* : *Bcl2-interacting protein* ; *cyt. c* : *cytochrome c* ; *Ras* : *Ras GTPase activating protein* ; *Raf* : *Raf kinase* ; *FAP-1* *Fas-associated protein-1*.

- **Les voies menant à l'apoptose**

La mort cellulaire induite par p75^{NTR} peut se faire *via* diverses voies à partir d'adaptateurs se fixant au domaine Chopper (Coulson et al., 1999) ou au domaine de mort du récepteur (Wang et al., 2001). Ces voies aboutissent dans la grande majorité des cas à l'activation, *via* Rac, de la kinase JNK, initiatrice, par phosphorylation, de nombreux acteurs de l'apoptose comme c-jun, p53, Bad et Bim ainsi que la translocation mitochondriale de Bax suivies de la libération de cytochrome c stimulant à son tour les caspases 9, 6 et 3 (Nykjaer et al., 2005).

Le lien entre les adaptateurs directs de p75^{NTR} et de Rac reste à démontrer. Cependant, certains adaptateurs de p75^{NTR} ont été décrits comme acteurs de l'apoptose dépendante de p75^{NTR}.

- **NRIF** peut se fixer dans la région juxtamembranaire ou le DD de p75^{NTR} (Casademunt et al., 1999) et est capable, coexprimé avec **TRAF6**, d'activer JNK. NRIF est également un répresseur transcriptionnel bloquant le cycle cellulaire (Geetha et al., 2005b). Sa translocation dans le noyau se fait en complexe avec TRAF6 et le p75-ICD libéré dans le cytosol suite au clivage de p75^{NTR} (Kenchappa et al., 2006).
- **NRAGE** se fixe au domaine juxtamembranaire de p75^{NTR} (Salehi et al., 2000) et provoque une forte induction de la kinase JNK, l'accumulation de cytochrome c dans le cytoplasme et une activation de la voie des caspases (Salehi et al., 2000). NRAGE est également connu pour bloquer le cycle cellulaire après activation de p53 (Wen et al., 2004).
- **NADE** se lie au domaine de mort de p75^{NTR} activé exclusivement par le NGF et induirait l'apoptose par activation des caspases (Park et al., 2000) en association avec la protéine 14-3-3ε (Kimura et al., 2001).

INTRODUCTION

- **Sc-1** est, comme NRIF, un répresseur transcriptionnel recruté au domaine juxtamembranaire de p75^{NTR} activé puis transloqué dans le noyau (Kendall et al., 2003). Sc-1 provoque un arrêt du cycle cellulaire par la répression transcriptionnelle du gène promototique de la cycline E (Chittka et al., 2004).

Parallèlement à ces voies, l'apoptose induite par p75^{NTR} peut également passer par la voie dite de « **Synthèse des céramides** » où p75^{NTR} activé stimulerait les sphingomyélinases hydrolysant les sphingomyélines en phosphatidylcholine et céramides (Dobrowsky et al., 1994). Les céramides agissent comme second messenger afin d'induire des effets apoptotiques ou trophiques en fonction de leur niveau intracellulaire (Blochl and Blochl, 2007). Le traitement de neurones de l'hippocampe par du NGF induit une apoptose et est corrélée à une augmentation de l'expression de p75^{NTR}, de la synthèse de céramides, eux-mêmes phosphorylant la kinase JNK (Brann et al., 2002).

Notons ici le cas particulier de l'adaptateur **TRADD** (TNF receptor 1-associated death domain). Cet adaptateur bien connu des récepteurs du TNF, menant à l'activation des caspases, est classiquement décrit comme n'intervenant pas dans la signalisation de p75^{NTR}, passant plutôt par la MAPK JNK pour activer les caspases (Roux and Barker, 2002; Wang et al., 2001).

Cependant, des études menées dans notre laboratoire sur des cellules cancéreuses de sein MCF-7 ont mis en évidence que TRADD serait, après recrutement par p75^{NTR} activé par le NGF, responsable de l'induction de la voie NF- κ B et ainsi de la survie des cellules aux céramides (El Yazidi-Belkoura et al., 2003).

- **Les voies menant à la survie**

Selon le contexte cellulaire, la liaison des neurotrophines au récepteur p75^{NTR} est également capable d'induire la survie cellulaire grâce principalement à l'activation du facteur NF κ B (Hamanoue et al., 1999). D'une part, NF κ B active la transcription de molécules à activité anti-apoptotique, en particulier les protéines de la famille des inhibiteurs cellulaires de l'apoptose cIAP-1 et cIAP-2, et certains membres de la famille de Bcl-2 comme Bcl-XL et Bfl-1/A1

INTRODUCTION

ou Bcl-2 lui-même. D'autre part, NFκB peut également induire la transcription de gènes conduisant à la synthèse de protéines qui vont bloquer la voie JNK induisant l'apoptose (Papa et al., 2004a; Papa et al., 2004b).

L'activation de NFκB par p75^{NTR} peut se faire *via* l'action de la PI3 kinase ou, à l'image de l'apoptose induite par p75^{NTR}, *via* le recrutement de divers ensembles d'adaptateurs.

- **TRAF6** est recruté par le domaine juxtamembranaire p75^{NTR} activé (Khursigara et al., 2001) et forme un complexe avec la kinase **IRAK**, la **PKC iota**, et **p62** (Mamidipudi et al., 2002; Mamidipudi et al., 2004; Wooten et al., 2001). La PKC*ι* va alors recruter son substrat, IκB Kinase-β (IKK-β) qui va être activé par le complexe. Enfin, IKK-β phosphoryle IκB, inhibiteur du facteur de transcription de NFκB qui est alors libéré et va activer des gènes impliqués dans la survie cellulaire.

Une association des protéines **TRAF2** et **TRAF4** avec le récepteur p75^{NTR} a également été mise en évidence par co-immunoprécipitation. Mais alors que TRAF2 active NFκB comme TRAF6, TRAF4 bloque au contraire cette activation (Ye et al., 1999).

- **RIP-2** se fixe au domaine de mort de p75^{NTR} (Khursigara et al., 2001) et active la voie de survie de NFκB. De plus RIP-2 est capable d'interagir avec les TRAF et l'utilisation d'un dominant négatif de TRAF6 inhibe l'activation de NFκB par RIP-2 (Yeiser et al., 2004). Notons que la protéine Bex-1 (brain-expressed X-linked 1) inhibe l'induction de NFκB en réponse au NGF par compétition avec RIP-2 pour la liaison à p75^{NTR} (Vilar et al., 2006).
- **FAP-1** est recruté par le domaine d'interaction PDZ de la queue carboxyle terminale de p75^{NTR} et augmenterait légèrement la survie *via* NFκB. L'implication de FAP-1 dans la survie induite par p75^{NTR} n'est pas totalement clarifiée, cependant, FAP-1 est décrit dans différent tissu comme une « scaffolding » protéine (Ghiran et al., 2008) et pourrait ici aider à l'assemblage de complexe comprenant p75^{NTR}.

INTRODUCTION

- **La voie de signalisation de la PI3-K/Akt** peut également être activée par p75^{NTR} même si celui-ci, contrairement à TrkA, ne possède pas d'activité kinase intrinsèque. En effet, p75^{NTR}, recruterait des kinases, ou bloquerait des mécanismes de déphosphorylation, conduisant à une phosphorylation accrue de p85, sous-unité régulatrice de la PI3-K, et de shc, et ce indépendamment de TrkA (Roux et al., 2001). Cette activation mènerait, *via* PKB, à la phosphorylation de la kinase IKK1 de IκB et ainsi à l'activation de NFκB induisant la survie cellulaire (Bui et al., 2002).

Notons que la PI3K peut également conduire à un signal de survie cellulaire de manière NFκB-indépendante, en stimulant la phosphorylation de la caspase-9, de la protéine pro-apoptotique Bad et des facteurs de transcription de la famille Forkhead, induisant ainsi leur inactivation (Brunet et al., 1999; Cardone et al., 1998; del Peso et al., 1997).

Ainsi, la voie PI3-K/Akt, jouant un rôle majeur dans la voie de survie régulée par TrkA, appartient également à la signalisation de p75^{NTR} menant à la survie, et constitue donc un point de contact important entre la signalisation des deux récepteurs.

- **Les autres voies activées par p75^{NTR} : Rho A et Ras**

La liaison des neurotrophines à p75^{NTR} peut également engager des voies annexes à celles menant à l'apoptose ou la survie cellulaire et impliquant les GTPases Rho A et Ras. Recruté par p75^{NTR}, ces deux protéines G régulent principalement la croissance des neurites (Blochl et al., 2004; Yamashita and Tohyama, 2003; Yamashita et al., 1999). Notons cependant que Ras est un adaptateur connu de TrkA et qu'il est également accompagné d'adaptateurs Shc, Grb2, SOS lorsqu'il se lie à p75^{NTR} (Blochl et al., 2004). Ainsi, p75^{NTR}, associé à TrkA, pourrait potentialiser l'activation de Ras par ce dernier.

II.E.2 Les partenaires de TrkA et p75^{NTR}

Afin de modifier ou réguler leur action, les récepteurs TrkA et p75^{NTR} sont capables de s'associer à divers partenaires.

INTRODUCTION

II.E.2.a Partenaire d'activation de TrkA

Des travaux menés dans les cellules nerveuses PC12 ont révélé un mode d'activation du récepteur TrkA, ainsi que des autres Trk, en l'absence de son ligand. En effet, l'adénosine, un neuromodulateur agissant *via* des récepteurs couplés aux protéines G, est capable de transactiver le récepteur TrkA. L'adénosine est ainsi capable d'engager la voie PI3K/Akt, mais pas la voie des MAP Kinases, *via* une activation de TrkA, pour aboutir, dans ces cellules, à un effet de survie. De plus, cette protection induite par l'adénosine se trouve être de plus longue durée que celle induite par le NGF (Lee and Chao, 2001). Plus récemment, un autre substrat de protéine G associé à des récepteurs (GPCR), la PACAP (adenylate cyclase-activating polypeptide) a également été décrite comme capable de transactiver les Trk (Rajagopal et al., 2004). Ces formes de Trk transactivées sont retrouvées dans les membranes intracellulaires comme celle du golgi et occurrent un mode d'activation alternatif des Trk (Rajagopal et al., 2004).

II.E.2.b Les corécepteurs de p75^{NTR}

➤ La sortiline

Nous l'avons vu, p75^{NTR} est le récepteur commun des neurotrophines et des pro-neurotrophines. Ainsi, alors que le NGF induit la survie et la croissance *via* son association à p75^{NTR} et TrkA, le proNGF induit lui l'apoptose sélectivement par p75^{NTR} dans les cellules neuronales. Cependant, toutes les cellules exprimant p75^{NTR} ne répondent pas au proNGF suggérant qu'une protéine additionnelle est requise pour déclencher la mort cellulaire. La sortiline s'est révélée être le co-récepteur de p75^{NTR} nécessaire à l'action proapoptotique du proNGF. Plus récemment, il a été décrit que le proNGF est capable d'induire la migration de cellules de mélanome bien qu'elles expriment en grande quantité le récepteur p75^{NTR} et la sortiline (Truzzi et al., 2008). De plus, les sites d'interactions de la sortiline permettent la liaison d'autres ligands suggérant de nombreuses possibilités d'interférences et de modulations de la liaison des pro-neurotrophines à la sortiline *in vivo* (Bronfman and Fainzilber, 2004).

INTRODUCTION

D'un point de vue structural, la sortiline est une protéine composée d'un seul domaine transmembranaire et d'une courte queue C-terminale cytoplasmique semblant lui interdire toute signalisation intracellulaire. Son domaine extracellulaire lui permet de fixer la région du prodomaine du proNGF alors que p75^{NTR} fixe sa région dite « mature », commune au NGF mature.

➤ Les récepteurs Nogo-R et LINGO-1

p75^{NTR} est également capable de fixer des ligands MBGI (« derived Myelin-Based Growth Inhibitors ») nommés Nogo, MAG (Myelin-Associated Glycoprotein) et OMgp (Oligodendrocyte myelin GlycoProtein) impliqués dans la régulation de l'élongation des neurites.

Cette fixation active RhoA *via* l'amplification de l'interaction directe de Rho-GDI (Rho GDP dissociation inhibitor) à p75^{NTR} (Yamashita and Tohyama, 2003) et inhibe l'élongation des neurites. Cependant l'inhibition de RhoA nécessite l'association de p75^{NTR} avec son corécepteur Nogo-R (glycolipid-anchored Nogo Receptor) et avec la protéine transmembranaire LINGO-1 (Mi et al., 2004; Wang et al., 2002).

Ainsi, à l'image de la disponibilité des protéines adaptatrices, activant une voie de signalisation plutôt qu'une autre, l'intervention des corécepteurs de TrkA et p75^{NTR} permet de moduler leur action en fonction du contexte cellulaire. Cependant, la majeure interaction récepteur-récepteur qui nous intéresse ici n'est autre que l'interaction entre p75^{NTR} et TrkA.

II.E.3 L'Interaction p75^{NTR}-TrkA

Bien que p75^{NTR} et TrkA puissent être activés seuls et induire des signalisations propres et indépendantes, l'interaction p75^{NTR} et TrkA est néanmoins une composante importante de leur action.

INTRODUCTION

- **L'association p75^{NTR}-TrkA**

Co-exprimés, l'association de TrkA et p75^{NTR} crée un site de haute affinité ($K_d \approx 10^{-11}M$ au lieu d'une affinité de l'ordre de $10^{-9}M$ pour chacun des récepteurs seuls) et améliore la sélectivité des ligands de TrkA puisque le complexe TrkA-p75^{NTR} lie uniquement le NGF et non la NT-3. Cette association permettrait donc une meilleure réponse du récepteur TrkA aux NGF (Hempstead et al., 1991).

Même si la coopération p75^{NTR}-Trk est aujourd'hui établie, une controverse persiste quant à leur association physique. Alors que certains montrent par co-immunoprécipitation une interaction directe de p75^{NTR} avec les récepteurs Trk (Bibel et al., 1999; Donovan et al., 1994; Lad et al., 2003) et des changements de conformation de TrkA induits par les domaines transmembranaire et cytoplasmique de p75^{NTR} participant à la haute affinité (Esposito et al., 2001), d'autres proposent un modèle où p75^{NTR} ne ferait que capter et transmettre le dimère de NGF à TrkA (Barker, 2007; Wehrman et al., 2007). Aussi, Wehrman et ses collaborateurs décrivent un complexe p75^{NTR}/NGF/TrkA 1:2:1 qu'ils considèrent comme possible mais avancent davantage l'existence d'une communication et d'une convergence des voies de signalisation des 2 récepteurs plutôt qu'une interaction directe de leurs domaines extracellulaires.

Enfin, un dernier modèle propose une association p75^{NTR}-Trk impliquée dans l'ubiquitinylation des Trk. L'ubiquitine ligase E2 recrutée au complexe par p75^{NTR} *via* TRAF6 permettrait l'ubiquitinylation, l'internalisation et la signalisation de TrkA (Geetha et al., 2005a). Pour d'autres, la coexpression de TrkA et p75^{NTR} réduirait au contraire l'ubiquitinylation et la dégradation du récepteur Trk, prolongeant ainsi son action (Arevalo et al., 2006; Makkerh et al., 2005). Dans ces deux hypothèses, néanmoins, p75^{NTR} potentialiserait l'action de TrkA.

- **Signalisation du complexe p75^{NTR}-TrkA**

Dans bon nombre de cellules neuronales et non neuronales, l'activation de p75^{NTR}, exprimé seul, initie l'apoptose, alors que, lors de l'expression concomitante de p75^{NTR} et de TrkA, le NGF active des voies de survie des cellules. Ce retournement de situation peut s'expliquer par la formation du site de haute affinité du NGF pour TrkA ainsi qu'aux capacités de la protéine Akt,

INTRODUCTION

activée par TrkA, à réprimer le signal apoptotique pouvant être initié par p75^{NTR} (Teng and Hempstead, 2004).

D'autres protéines ont été répertoriées comme liées à la fois à p75^{NTR} et TrkA lors de leur association physique. Il s'agit de la protéine ARMS (Arevalo et al., 2004; Chang et al., 2004; Roux and Barker, 2002), de la cavéoline qui est impliquée dans la formation d'invaginations de la membrane plasmique servant de plateforme de signalisation (Bilderback et al., 1999; Bilderback et al., 1997; Okamoto et al., 1998) ou de FAIM (Fas Apoptosis Inhibitor Molecule) qui permet la croissance des neurites dépendante du NGF. Le mécanisme d'action de FAIM dans ce contexte n'est pas clair, cependant cette croissance des neurites implique l'activation à la fois de NFκB et de la voie Ras-MAPK (Sole et al., 2004).

Plus récemment, la protéine NRH-2 (« Neurotrophin receptor homolog-2 ») a été indentifiée comme impliquée dans les interactions entre p75^{NTR} et TrkA. Cette protéine ne lie pas directement le NGF mais peut, lorsqu'elle est recrutée par le récepteur p75^{NTR}, interagir avec le récepteur TrkA et contribuer à la formation d'un site de haute affinité pour le NGF (Murray et al., 2004).

De plus les adaptateurs Shc, Grb2 et SOS ainsi que RAS se sont avérés commun à p75^{NTR} et aux récepteurs Trk et pourraient signifier une régulation positive, par p75^{NTR}, de l'activation de RAS induite par Trk (Blochl et al., 2004). Dans ce sens, il a également été montré que l'association entre les deux récepteurs *via* Shc augmente l'activité de la voie MAPK/ERK, conduisant ainsi à une différenciation des cellules PC12 (Diolaiti et al., 2007; Epa et al., 2004).

Enfin, la protéine p62 du complexe p62-TRAF6-IRAK est essentielle pour l'association des 2 récepteurs, TRAF6 assurant la liaison à p75^{NTR} et p62 à TrkA, et ainsi à l'activation de NFκB (Wooten et al., 2001).

En conclusion, malgré leurs différences de structure et de fonctionnement, les récepteurs TrkA et p75^{NTR}, semblent capables, parallèlement à leur action propre, d'interagir tant physiquement qu'à travers leurs voies de signalisation respectives pour moduler l'action du NGF sur les cellules.

CHAPITRE 2: OBJECTIF DE LA THESE

OBJECTIF DE LA THESE

Notre laboratoire fut le premier à démontrer l'effet mitogène du NGF sur les cellules de cancer du sein alors qu'il est sans effet sur les cellules mammaires normales (Descamps et al., 1998). Par la suite, l'effet mitogène du NGF sur les cellules cancéreuses mammaires fut attribué à l'activation de TrkA et de la voie MAP Kinase Erk, tandis qu'une activité anti-apoptotique du NGF sur ces mêmes cellules fut découverte impliquant le récepteur p75^{NTR} et l'induction de la voie NF-κB (Descamps et al., 2001b). De plus, le NGF est synthétisé et sécrété par les cellules de cancer du sein, contrairement aux cellules normales, suggérant une boucle d'action autocrine de ce facteur (Dolle et al., 2003). D'autres travaux ont montré que le NGF coopère avec p185 (erb-B2) pour activer la croissance des cellules de cancer du sein et que le tamoxifen, drogue anti-oestrogénique couramment utilisée en thérapie du cancer du sein, inhibe l'effet mitogène du NGF (Chiarenza et al., 2001; Tagliabue et al., 2000). Ce rôle du NGF a été confirmé *in vivo*, dans des modèles de xéno greffe en souris immunodéficientes, où l'inhibition du NGF par des anticorps bloquants ou des siRNA inhibe fortement la croissance tumorale et la métastase des cellules cancéreuses de sein (Adriaenssens et al., 2008).

D'autre part, il a également été montré que les récepteurs TrkA et p75^{NTR} sont présents dans les tumeurs du sein (Aragona et al., 2001; Descamps et al., 2001a) et que l'activation de TrkA est plus importante dans les effusions pleurales que dans les tumeurs primaires, suggérant une implication de ce récepteur dans la progression tumorale (Davidson et al., 2004).

Cependant, bien que ces différentes études avèrent un rôle du NGF dans la croissance des cellules de cancer du sein, les voies de signalisation et les mécanismes qu'il emprunte pour agir demeurent peu connus. L'espoir de voir émerger une stratégie thérapeutique ciblée contre le NGF dans cette maladie nécessite une connaissance approfondie du mode d'action et de l'influence de ses deux récepteurs TrkA et p75^{NTR}. Or, les lignées de cellules de cancer de sein communément utilisées en laboratoire expriment peu les récepteurs TrkA et p75^{NTR} comparativement aux échantillons tumoraux (Descamps et al., 2001a).

L'objectif de mon travail de thèse fut de déterminer le rôle précis des récepteurs du NGF, TrkA et p75^{NTR}, dans la croissance des cellules de cancer du sein et d'identifier leurs mécanismes

OBJECTIF DE LA THESE

d'action. Pour ce faire, mes travaux présentés ici furent conduits selon trois objectifs successifs :

- L'établissement de modèles de cellules de cancer du sein surexprimant les récepteurs du NGF,
- La recherche systématique des effets biologiques engendrés par ces surexpressions,
- La détermination des mécanismes moléculaires responsables des phénotypes observés lors de la surexpression de TrkA et de p75^{NTR}.

Ces résultats sont présentés sous forme de deux publications intitulées :

« TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells » et
« Involvement of p21^{waf1} in P75^{NTR} overexpression-induced growth inhibition and survival in breast cancer cells »

RESULTATS

CHAPITRE 3: RESULTATS

RESULTATS

Article 1:

TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells

A) Introduction

Ce travail fut entamé au sein de notre laboratoire par Chann Lagadec dans le cadre de son travail de thèse. TrkA est connu pour être impliqué dans la progression de plusieurs cancers non neuronaux comme carcinomes médullaires thyroïdiens (McGregor et al., 1999), les cancers du poumon (Ricci et al., 2001), du pancréas (Zhu et al., 1999), de la prostate (Weeraratna et al., 2000), de l'ovaire (Davidson et al., 2003) et enfin dans le cancer du sein (Descamps et al., 2001b). Etant donné que TrkA est faiblement exprimé dans les lignées de cellules cancéreuses de sein comparées aux biopsies tumorales (Descamps et al., 2001a), des clones de cellules de cancer du sein surexprimant stablement TrkA ont été établies par Chann Lagadec afin de palier à cette perte de surexpression de TrkA et d'en étudier l'impact. Leur caractérisation, déjà avancée à mon arrivée dans le laboratoire se poursuit avec mon étude entre autres des effets de cette surexpression sur la résistance des cellules à l'anoïkis et de la métastase *in vivo*.

B) Résultats

Ce travail commença par la mise en évidence d'un haut niveau de TrkA et phospho-TrkA (la forme activée de TrkA) dans les biopsies tumorales de sein contrairement aux biopsies normales. La caractérisation des clones surexprimant TrkA a permis de déterminer que la seule surexpression du récepteur augmente la croissance, la migration et l'invasion des cellules ainsi que leur survie à l'anoïkis et à l'apoptose induite par TRAIL. De façon surprenante, l'ajout de NGF exogène augmente l'effet de cette surexpression sur l'invasion et la migration mais est sans effet sur la résistance à l'anoïkis. L'analyse en western blot et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ont permis de déterminer que l'activation des voies PI3K-Akt et MEK MAP Kinase

RESULTATS

sont requises pour l'augmentation de la migration et de la croissance sans ancrage induites par la surexpression de TrkA. *In vivo*, par injection subcutanée des cellules en souris immunodéficientes SCID, nous avons montré que la surexpression de TrkA augmente la croissance de la tumeur primaire et ce par une augmentation de la prolifération des cellules révélée par marquage PCNA. L'utilisation de cellules surexprimant à la fois TrkA et la protéine fluorescente GFP m'a permis de déterminer par FACS que la surexpression de TrkA induit également une augmentation de la métastase des cellules dans les poumons, le foie et le cerveau des souris injectées. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse des coupes de ces différents organes révélant la présence de foci métastatiques plus nombreux et plus importants lorsque TrkA est surexprimé. L'obtention de résultats similaires lors d'expérience de métastases provoquées (où les cellules sont directement injectées dans la circulation de la souris), et le fait que les cellules récupérées des métastases pulmonaires se révèlent être plus résistantes encore à l'anoïkis que les cellules initialement injectées, avec un niveau de TrkA et p-TrkA légèrement supérieur, suggèrent un rôle important de la résistance à l'anoïkis induite par TrkA dans la métastase des cellules de cancer du sein. Notons que des résultats similaires sur la tumorigénèse *in vivo* ont été également observés en utilisant une autre lignée de cellules de cancer du sein, les cellules T47-D, moins tumorigènes et non métastatiques.

C) Conclusion

Nous montrons ici pour la première fois que la seule surexpression du récepteur TrkA accroît considérablement le pouvoir oncogénique des cellules de cancer de sein. TrkA augmente ainsi la croissance, la migration, l'invasion, ainsi que la survie à l'apoptose et à l'anoïkis des cellules *in vitro*. Mais surtout, la surexpression de TrkA accroît significativement la tumorigénèse et la métastase des cellules de cancer du sein.

Ces résultats sont présentés dans l'article qui suit, accepté pour publication dans la revue *Oncogene*.

TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells

C Lagadec^{1*}, S Meignan*, E Adriaenssens, B Foveau, E Vanhecke, R Romon, R-A Toillon, B Oxombre², H Hondermarck and X Le Bourhis

INSERM U908 "Growth factor signaling in breast cancer. Functional proteomics" and the University of Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France.

Corresponding author: Xuefen Le Bourhis, INSERM U908, Bâtiment SN3, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Phone: 33 (0)3 20 43 45 81; Fax: 33 (0)3 20 43 40 38; Email: xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr

Footnotes: *The authors contributed equally to this work. ¹Present address: Department of Radiation Oncology, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, USA. ²Present address: Laboratoire d'Immunologie - EA 2686, Faculté de Médecine H. Warembourg, Lille, France.

Running title: TrkA overexpression enhances breast tumor aggressivity

Keywords: neurotrophins, tyrosine kinase receptors, anoikis.

Abstract

The Trk family of neurotrophin tyrosine kinase receptors is emerging as an important player in carcinogenic progression in non neuronal tissues. Here, we show that breast tumors present high levels of TrkA and phospho-TrkA compared to normal breast tissues. To further evaluate the precise roles of TrkA overexpression in breast cancer development, we have performed a series of biological tests using breast cancer cells which stably overexpress TrkA. We show that (a) TrkA overexpression promoted cell growth, migration and invasion *in vitro*; (b) overexpression of TrkA *per se* conferred constitutive activation of its tyrosine kinase activity; (c) signal pathways including PI3K-Akt, and ERK/p38 MAP kinases were activated by TrkA overexpression and were required for the maintenance of a more aggressive cellular phenotype; (d) TrkA overexpression enhanced tumor growth, angiogenesis and metastasis of xenografted breast cancer cells in immunodeficient mice. Moreover, recovered metastatic cells from the lungs exhibited enhanced anoikis resistance which was abolished by the pharmacological inhibitor K252a, suggesting that TrkA-promoted breast tumor metastasis could be mediated at least in part by enhancing anoikis resistance. Together, these results provide the first direct evidence that TrkA overexpression enhances the tumorigenic properties of breast cancer cells, and point to TrkA as a potential target in breast cancer therapy.

Introduction

Breast cancer progression depends not only on primary tumor growth but also on the ability of tumor cells to metastasize to distant sites. Several sets of growth factors and their cognate receptors are known to be significantly involved in the regulation of these processes (Mercurio *et al.*, 2005; Jechlinger *et al.*, 2006; Ursini-Siegel *et al.*, 2007). Thus, disruption of growth factors and receptor signaling is a current strategy for the development of anticancer drugs. So far, several drugs have shown a therapeutic efficiency, such as Herceptin (specific inhibitor of Erb-B2), but its use is limited since only 20-30% of breast cancers overexpress Erb-B2 and less than 30% of patients with Erb-B2 overexpressing metastatic breast cancer respond to Herceptin as a single agent in first-line treatment (Vogel *et al.*, 2002; Sawaki *et al.*, 2004). Identification of other growth factors and their receptors implicated in breast tumor development is therefore essential to improve therapeutic efficiency.

Neurotrophins consist of nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3), and NT-4/5. Neurotrophins bind two classes of receptors, the p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) and the tyrosine kinase receptors of Trk family (TrkA, TrkB, TrkC). p75^{NTR} binds all neurotrophins with similar affinities (Chao, 1994) and regulates cellular processes through interactions between the cytoplasmic domain of p75^{NTR} and effector molecules (Mukai *et al.*, 2003). The Trk tyrosine kinase receptors activate several signaling pathways that regulate survival and differentiation in neuronal cells (Reichardt, 2006). Although neurotrophin-mediated signaling has been extensively studied in PC12 and neuronal cells, their effects on non-neuronal cells are not fully understood. Accumulating data have demonstrated that NGF and its tyrosine kinase receptor TrkA are involved in tumor growth and the progression of non-neuronal cancers including medullary thyroid carcinoma (McGregor *et al.*, 1999), lung (Ricci *et al.*, 2001), pancreatic (Zhu *et al.*, 1999), prostatic (Weeraratna *et al.*, 2000) and ovarian carcinomas (Davidson *et al.*, 2003).

Both p75^{NTR} and TrkA are expressed in breast cancers (Aragona *et al.*, 2001; Descamps *et al.*, 2001a). Moreover, we have shown that NGF acts as an autocrine growth factor to stimulate cell proliferation and survival (Dolle *et al.*, 2003). Interestingly, NGF cooperates with p185 (HER2) to stimulate breast cancer cell growth (Tagliabue *et al.*, 2000), and Tamoxifen, the commonly drug used in hormonotherapy, inhibits the proliferative effects of NGF (Chiarenza *et al.*, 2001). More recently, we

have shown that NGF is expressed in the majority of human breast tumors, especially in epithelial cancer cells. Moreover, anti-NGF antibodies and small interfering RNA against NGF strongly inhibit the tumor growth and metastasis of breast cancer cells xenografted in immunodeficient mice (Adriaenssens *et al.*, 2008). These *in vitro* and *in vivo* results suggest that NGF may actively be involved in mammary tumor development. In agreement with this hypothesis, high levels of activated TrkA (phospho-TrkA) are observed in breast cancer effusions compared to primary cancers (Davidson *et al.*, 2004). Unfortunately, commonly used breast cancer cell lines express relatively low levels of TrkA compared to tumor biopsies (Descamps *et al.*, 2001a). In this study, we first showed that breast tumor biopsies expressed high levels of TrkA and phospho-TrkA compared to normal biopsies, and then stably transfected TrkA in MDA-MB-231 human breast cancer cells to determine the functional importance of TrkA. Our results show that TrkA overexpression promoted cell growth, migration and invasion *in vitro*. Moreover, TrkA overexpression enhanced tumor growth, angiogenesis and metastasis of xenografted breast cancer cells in immunodeficient mice.

Results

Breast tumor biopsies present high levels of TrkA and phospho-TrkA

TrkA expression in breast biopsies was first quantified by real time RT-PCR (Figure 1A). TrkA was expressed in normal biopsies with levels roughly equivalent to those detected in MDA-MB-231 breast cancer cell line. In contrast, the levels of TrkA mRNA in tumor biopsies were about 10 to 140-fold higher than that in normal samples. The high level of TrkA expression in breast tumor biopsies was further confirmed by Western blot analysis (Figure 1B). Moreover, phospho-TrkA (pTrkA) was detected in the majority of cancer biopsies while it was undetectable in normal ones; no strict correlation was observed between the levels of TrkA and pTrkA in these samples. We then extended our analysis by immunohistochemical staining of breast tissue microarrays (Figure 1C). The levels of these proteins were scored from 0 to 3 (Table 1). Normal tissues expressed no or low levels of TrkA (score ≤ 1). In contrast, of 37 cancer biopsies, 28 were found to present high levels of TrkA and pTrkA (score ≥ 2).

TrkA overexpression promotes cell growth, migration, invasion and survival

Commonly used breast cancer cell lines express relatively low levels of TrkA compared to tumor biopsies (Descamps *et al.*, 2001a; Figure 1A and B). Moreover, PCR analysis showed that only the TrkA1 isoform is expressed in breast cancer cell lines (data not shown), so in order to determine the functional importance of TrkA overexpression in breast cancer development, we established TrkA1 overexpressing MDA-MB-231 breast cancer cells as pools or single clones (Figure 1D). Interestingly, an increase in pTrkA was also observed in TrkA overexpressing cells, indicating that TrkA was activated following its overexpression (Figure 1D). We observed similar results in terms of cell behavior in culture for both the pooled cells and the 2 selected clones (C1 and C2). To simplify the presentation, only results with the pooled cells are shown (Figure 2). In standard cell culture conditions, TrkA overexpression resulted in accelerated cell proliferation (Figure 2A). After 6 days of culture, the number of TrkA overexpressing cells is about twice that of mock cells. When cell migration was evaluated using Transwell Boyden chambers, TrkA overexpression induced twice as much cell migration to the bottom chamber than did the empty-vector transfected cells (Figure 2B). Similar results were obtained using the wound healing method (Figure 2C). The invasive capacities of the cells were assessed using Transwells with filters coated with Matrigel and were also found to be enhanced in TrkA overexpressing cells (Figure 2D). Such an increase in migration and invasion was not due to differences in cell proliferation as no difference in cell number was observed after 24 h of culture in the same conditions (data not shown).

We then determined the anoikis resistance of cells on poly-HEMA-coated wells that effectively inhibit cell attachment (Figure 2E and F). TrkA overexpressing cells could survive and proliferate as large spheroid aggregates in suspension, resulting in a 2-fold increase in cell numbers by 36 h of culture. Of note, during different culture times, the viability of TrkA overexpressing cells remained superior or similar to that at the beginning of the experiment while mock cells underwent rapidly cell death. Moreover, TrkA overexpressing cells formed more colonies than did mock cells in soft-agar assay (Figure 2G). This reinforced the fact that TrkA overexpression bypasses the need for anchorage. Finally, TrkA overexpression enhanced the resistance of cells to TRAIL-induced apoptosis (Figure 2H).

Surprisingly, although exogenous NGF further stimulated cell growth in soft agar, migration and invasion, it did not modify anoikis resistance either in mock or in TrkA overexpressing cells. Since we have previously shown that NGF can stimulate the growth of breast cancer cells both *in vitro* and *in vivo* via an autocrine loop (Dolle *et al.*, 2003; Adriaenssens *et al.*, 2008), we then determined whether the effects of TrkA overexpression were due to the activation of the autocrine loop. PCR analysis revealed no modification of NGF expression in TrkA overexpressing MDA-MB-231 cells compared to that of mock cells (data not shown). Neutralizing anti-NGF antibody partially inhibited the migration of TrkA overexpressing MDA-MB-231 cells, but had no effect on anoikis resistance; similar results were obtained in MCF-7 breast cancer cells (Supplementary Figure 1). These data suggest that NGF produced by breast cancer cells is efficient in stimulating TrkA-induced migration but not TrkA-enhanced anoikis resistance. Together, whatever the involvement of NGF, TrkA overexpression increased cell growth, invasion and survival in breast cancer cells.

PI3K-Akt and MEK MAP kinase are required for TrkA overexpression-promoted migration and anchorage-independent growth

Activation of signaling pathways such as PI3K-Akt and MAP kinases in TrkA overexpressing cells was first determined by Western blot analysis. Higher levels of phospho-Akt (pAkt), phospho-ERK (pERK) and phospho-p38 (pp38) MAP kinases were observed in TrkA overexpressing cells than in mock cells (Figure 3A, Supplementary Figure 2A-C). Inhibition of TrkA phosphorylation by K252a strongly reduced the levels of pAkt, pERK and pp38 MAP kinases without modifying the expression of corresponding proteins. Similar results were obtained when cells were cultured in suspension (Supplementary Figure 2D). This implies that overexpressed TrkA was functional in signal transduction by activating PI3K-Akt and ERK/p38 MAP kinases. Furthermore, pharmacological inhibitors of TrkA, PI3K-Akt and ERK MAP kinase more strongly reduced the migration and anoikis resistance of TrkA overexpressing cells than that of mock cells (Figure 3B and C; Supplementary Figure 3A-D). Colony formation of TrkA overexpressing cells was also diminished in the presence of inhibitors of TrkA and ERK/p38 MAP kinases (Figure 3D). However, cells did not survive in soft agar whatever the levels of TrkA in the presence of LY294002

or Akt inhibitor III (Figure 3D), confirming the crucial role of PI3K-Akt I in colony formation in soft agar (Nakanishi *et al.*, 2002).

TrkA overexpression accelerates tumor growth by enhancing cell proliferation and angiogenesis

MDA-MB-231 cells were subcutaneously injected into SCID mice. All animals formed a tumor at the injection site, but the tumor growth rates were quite different: tumors formed by TrkA overexpressing cells were palpable 2 weeks after injection, and attained a size of 2 cm³ at about 5 weeks post-injection. In contrast, empty vector transfected cells formed palpable tumors with a latency of 5 weeks and took 10 weeks to form tumors of similar size (about 2 cm³) (Figure 4A). Primary tumors from MDA-MB-231 TrkA overexpressing cells maintained high levels of TrkA and pTrkA as revealed by immunohistochemical staining (Figure 4B). Similar results were obtained with another xenograft model T47-D human breast cancer cells which are less tumorigenic (Supplementary Figure 4). To determine whether apoptosis, cell proliferation and angiogenesis were modified in tumors formed by TrkA overexpressing cells, we then performed TUNEL assay, immuno-staining of PCNA and vWF which are markers of apoptosis, cell proliferation and angiogenesis, respectively. No significant differences in TUNEL-positive cells were observed between tumors formed by mock and TrkA overexpressing cells. In contrast, about 2-fold increases in the number of PCNA- and vWF-positive cells were found in TrkA overexpressing tumor sections (Figure 4C). These data indicated that accelerated tumor growth was due to the enhanced proliferation of TrkA overexpressing cells and increased angiogenesis.

TrkA overexpression enhances tumor metastasis

In order to evaluate metastasis *in vivo*, we generated MDA-MB-231 cells (overexpressing TrkA or not) stably expressing GFP. The GFP-positive cells exhibited the same levels of TrkA and similar *in vitro* properties (proliferation, migration and survival) as their parental counterparts (Data not shown). Metastatic potentials of the GFP-positive cells were then first evaluated after subcutaneous injection into SCID mice (Figure 5A and B, Supplementary Figure 5). More and

bigger metastatic foci were found in the lung, liver and brain of mice that received TrkA overexpressing cells (Figure 5A). Quantification of GFP-positive cells using FACS showed that TrkA overexpression induced 2- and 3-fold increases in the metastatic burden in lung and liver, respectively (Figure 5B, Table 2). Interestingly, only three animals among eight bearing empty vector transfected cells developed brain metastases with a low tumor burden, as metastatic (GFP-positive) cells were found to be inferior to 0.2%. In contrast, nine out of nine animals receiving TrkA overexpressing cells developed brain metastasis with an average tumor burden 25-fold higher than control animals. To evaluate the abilities of cells to metastasize independently of primary tumor formation and intravasation, we injected cells into the lateral tail veins of SCID mice. Eight weeks later, the mice were sacrificed and the metastatic (GFP-positive) cells in the lungs were quantified. As shown in Figure 5C, a significant increase in metastatic cells was observed in the lungs of mice that received TrkA overexpressing cells, suggesting that TrkA overexpression also affects the later steps of metastasis.

The metastasis-promoting effect of TrkA overexpression was also observed by using another breast cancer cell line T47-D known to be tumorigenic but not metastatic (Supplementary Figure 4C).

TrkA overexpressing cells isolated from lung metastases were more resistant to anoikis

To get insight into the mechanisms of TrkA-driven metastasis, TrkA overexpressing cells derived from the lungs of 9 animals were isolated and cultured separately to evaluate their behavior in terms of growth, migration and resistance to TRAIL-induced apoptosis, as well as resistance to anoikis. As shown in Figure 6A, the levels of TrkA and pTrkA in recovered metastatic TrkA overexpressing cells were slightly higher than those of cells before injection. No modifications in cell growth, migration and resistance to TRAIL-induced apoptosis were observed (Figure 6B-D). In contrast, the recovered metastatic TrkA overexpressing cells exhibited enhanced anoikis resistance compared to parental TrkA overexpressing cells. This enhanced anoikis resistance was specific to metastatic cells as no difference was observed between cells derived from primary tumors and their parental cells before injection (data not shown). More importantly, TrkA inhibition with K252a totally abolished the anoikis

resistance of these metastatic cells (Figure 6E). Taken together, these results suggested that the enhanced anoikis resistance could be at least partially responsible for the increased metastatic capacity of TrkA overexpressing cells.

Discussion

We first showed that TrkA was overexpressed in human breast cancer biopsies compared to normal breast tissues with levels of phospho-TrkA also being higher in breast cancer biopsies. TrkA can be activated following mutation, overexpression or binding to NGF. On one hand, no mutations have been found either in breast cancer biopsies or in breast cancer cell lines including MDA-MB-231 and MCF-7 (unpublished personal data). On the other hand, the majority of breast cancers express NGF (Adriaenssens *et al.*, 2008) which may activate TrkA in an autocrine manner. To determine the incidence of TrkA overexpression in breast cancer biology, we stably transfected MDA-MB-231 breast cancer cells with the full length TrkA isoform cDNA (the only TrkA isoform found in these cells). We showed that TrkA overexpressing cells (pooled and separated clones) exhibited increased cell proliferation, migration, invasion as well as survival. These results were further confirmed using another prototypic breast cancer cell line MCF-7. However, we had previously shown that upon NGF stimulation, endogenous TrkA is only involved in cell proliferation but not in the survival of breast cancer cells (Descamps *et al.*, 2001b), this may be explained by the fact that a relatively low level of endogenous TrkA is not sufficient to activate survival pathways. Accordingly, in TrkA overexpressing cells, tyrosine receptor signaling pathways were found to be constitutively activated, as revealed by the high levels of phospho-Akt, phospho-ERK and phospho-p38. Moreover, both PI3K-Akt pathway and ERK MAP kinase were necessary for TrkA-stimulated biological effects such as migration, anoikis resistance and colony formation in soft agar. p38 MAP kinase only seemed to be implicated in colony formation of TrkA overexpressing cells.

TrkA overexpression not only promoted cell growth *in vitro*, but also accelerated primary tumor growth *in vivo* in SCID mice. The enhanced primary tumor growth was found to be associated with increased cell proliferation and angiogenesis. These data together with our previous findings showing that inhibition of TrkA by the tyrosine inhibitor K252a efficiently inhibits tumor growth and angiogenesis (Adriaenssens *et*

al., 2008) prompted us to suggest a model in which relatively low endogenous TrkA and NGF are sufficient to sustain tumor growth *via* an autocrine loop. However, this loop is probably suboptimal as TrkA overexpression enables stronger signaling, resulting in enhanced tumor growth and angiogenesis. NGF has already been shown to stimulate angiogenesis (Cantarella *et al.*, 2002). In addition, a correlative analysis suggests a role for NGF in ovarian cancer angiogenesis (Davidson *et al.*, 2003). It is not yet known if NGF can exert a direct and/or indirect action, as NGF can also induce the expression of pro-angiogenic factors such as VEGF (Campos *et al.*, 2007). Clearly, it needs to be clarified how TrkA overexpressing tumor cells can stimulate tumor angiogenesis, but our present findings show that TrkA impact in breast carcinogenesis may also encompass angiogenesis.

Another important finding of our work is the increased metastatic ability of TrkA overexpressing cells. Metastasis is a complex process consisting of multiple steps. These steps include growth of the primary tumor, growth of vessels (blood vessels and lymphatics) in and around the tumor, intravasation, transport, arrest of tumor cells and formation of secondary tumors at distant sites. Acquisition of resistance to anoikis may allow the survival of cancer cells during systemic circulation and facilitate tumor dormancy or metastasis in distant organs (Frisch and Screatton, 2001; Rennebeck *et al.*, 2005). In support of this concept, it has been reported that overexpression of TrkB renders normal intestinal epithelial cells anoikis resistant and highly tumorigenic (Douma *et al.*, 2004; Geiger and Peeper, 2007). Here, we showed overexpression of TrkA rendered breast cancer cells more resistant to anoikis. In addition, TrkA overexpressing cells derived from lung metastases were more resistant to anoikis than their parental TrkA overexpressing cells. These correlations strongly suggested that the increased metastatic capacity of TrkA overexpressing cells could be at least in part due to the enhanced anoikis resistance. It is also reasonable to presume that the increase in lung metastasis due to TrkA overexpression after tail vein injection was relevant with increased capacity of anchorage-independent growth. To our knowledge, this is the first report of TrkA being involved in anoikis resistance, which extends our understanding of the role of TrkA in breast tumor development. Surprisingly, we found that anoikis resistance was independent of NGF action, as neither exogenous NGF nor neutralizing anti-NGF could modify anoikis resistance in both control and TrkA overexpressing cells. It is unclear whether overexpressed TrkA can act in an intracrine manner or through a

direct interaction with other proteins such as adhesion molecules. Indeed, it has been reported that E-cadherin-mediated suppression of anoikis is associated with ligand-independent activation of ErbB1 (Shen and Kramer, 2004). Studies to address these questions are now under way.

However, given the complexity of metastatic process, cancer cells must acquire a series of traits that enable them to overcome the multiple barriers erected by normal tissues. Apart from the enhanced anoikis resistance, the increased abilities of proliferation, migration and invasion may also potentiate metastasis of TrkA overexpressing cells. Therefore, more detailed quantitative analysis *in vivo* as recently reported (Hedley *et al.*, 2008) is required to see the exact impact of TrkA overexpression in the numerous steps of metastatic process. Nevertheless, our findings provide primary explanations for the observation that pleural effusions of breast cancers present high levels of pTrkA compared to corresponding primary tumors (Davidson *et al.*, 2004). These results are not in agreement with our previous report in which TrkA mRNA expression predicted improved overall survival (Descamps *et al.*, 2001a). This difference may be attributed to the fact that the levels of TrkA protein especially in its activated form cannot be compared with the levels of mRNA. Another explanation may relate to the cohort studied. Indeed, we analyzed tumors from patients who presented variable disease stages, with highly variable clinical outcomes, whereas the cohort used by Davidson *et al.* (2004) was uniformly composed of patients who developed stage IV disease at some point along the clinical course, and who, despite long disease-free periods in some cases, all suffered tumor-related death.

In conclusion, we show that TrkA is overexpressed in breast carcinoma. We also provide the first direct evidence that TrkA overexpression in breast cancer cells enhances their tumorigenic properties. Our findings imply that the targeting of TrkA signaling in breast cancers is of potential interest. Given the correlation of anoikis resistance and metastatic potential, suppression of anoikis resistance would contribute to limiting metastasis and could be useful in combination with treatments that directly target primary tumor growth.

Materials and Methods

Human breast biopsies and animals

Normal breast tissues were obtained from individuals treated by mastectomy at the Hospital of Lille (France), breast carcinoma specimens were obtained from the Clinique du Croisé Laroche (Lille, France). All these samples were collected with institutional safety review board approval. Breast cancer tissue microarrays (Cliniscience) included 10 normal breast samples and 37 tumoral breast samples (3 infiltrating lobular carcinomas, 2 *in situ* ductal carcinomas, 32 infiltrating ductal carcinomas). Animal studies were performed in accordance with the Animal Care and Use Committee procedures and guidelines of the Institut Pasteur de Lille (Lille, France).

Cell culture, transfection and generation of TrkA overexpressing cancer cells

The MDA-MB-231 breast cancer cell line was obtained from the American Type Culture Collection. Cells were maintained in EMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). The TrkA expression vector (pcDNA3.1-hygro/TrkA) was prepared by inserting TrkA cDNA from MDA-MB-231 cells into the pcDNA3.1-hygro vector (Invitrogen). Cell transfections were done using LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells were selected with 800 µg/ml hygromycin (Invitrogen), the resulting hygromycin resistant pools or clones were stored as frozen stocks and used for all the experiments within 20 passages. Expression of TrkA was not modified with passages *in vitro* or after primary tumor formation *in vivo*, as revealed by western blot analysis. For metastasis assay, MDA-MB-231 cells (empty vector transfected and TrkA overexpressing cells) were stably transfected with a pGFP-C1 expression vector (Invitrogen) and selected with 1000 µg/ml G418 (Invitrogen). GFP-positive cells were selected by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The selected cells expressed similar levels of GFP, and presented the same properties as their parental cells in terms of TrkA expression, cell morphology, migration and growth.

Quantitative real-time PCR

Total RNAs were isolated with the Nucleospin RNAII isolation kit (Macherey-Nagel). Reverse transcription was performed with 1 µg of RNAs, 0.5 µg of random hexamers, 20 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen life technologies) for 10 min at 25°C, 50 min at 37°C and 15 min at 70°C in a final volume of 20 µl. This reaction was followed by RNase H treatment for 1 h at 37°C. TrkA RT-PCR was performed using Hs_NTRK1_SG_1 QuantiTect® Primer Assays (Qiagen). RPLP0 (human acidic ribosomal phosphoprotein P0) was used as a reference gene. The subsequent PCR conditions were 40 cycles, carried out in the following manner: 95°C for 15 sec, 55°C for 20 sec, and 72°C for 30 sec. Data were analyzed using the MX4000 PCR system software (Stratagene). Levels of TrkA mRNA were expressed as relative quantities compared to that expressed by mock MDA-MB-231 breast cancer cells. TrkA isoforms were determined by RT-PCR using specific primers as described (Tacconelli *et al.*, 2004).

Western blot analysis

The proteins were separated by SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes (Whatman). Blots were blocked and then probed with antibodies against TrkA (1:500 dilution, Cell Signaling), phospho-TrkA (Tyr490, 1:1,000 dilution, Sigma), Akt (1:1,000 dilution; Cell Signaling), phospho-Akt (Ser473; 1:400 dilution; Cell Signaling), extracellular signal-regulated kinase (ERK; 1:1,000 dilution; Cell Signaling), phospho-ERK (Tyr204; 1:1000 dilution; Cell Signaling), p38 (1:1,000 dilution, Cell Signaling), phospho-p38 (1:1,000 dilution, Cell Signaling) and β-actin (1:5,000 dilution; Sigma). After washing, the blots were incubated with horseradish peroxidase–conjugated secondary antibodies and visualized by Western pico signal reagent (Pierce).

Assays of cell behavior in culture

Protocols were detailed in the supplementary data (cell growth, migration, matrigel chemoinvasion, wound-healing assay, anoikis assay, soft agar assay for colony formation, apoptosis analysis). Specific inhibition with pharmacological inhibitors was performed with 10 nM K252a, 15 µM LY294002, 15 µM Akt inhibitor III, 10 µM U0126, or 10 µM p38 inhibitor II, all from Calbiochem. Control cells were treated with DMSO at a 1:1000 dilution. The concentrations used were based upon the absence

of toxicity in the MDA-MB-231 cells, which was determined by cell proliferation assay in serum-free medium for 48 h.

Tumor growth in SCID mice

Six-week-old female SCID mice were purchased from the Charles River Laboratories (France), and acclimatized for at least 2 weeks. MDA-MB-231 mock and TrkA overexpressing cells were harvested and resuspended in PBS before subcutaneous injection into the flanks (2×10^6 cells/flank) of 8 week-old SCID mice. The tumor volume was determined every week by measuring the length (l) and width (w) and then calculating the volume as $\frac{\pi}{6}lw\frac{(l+w)}{2}$.

Immunohistochemistry and TUNEL staining

TrkA and phospho-TrkA staining was performed using tissue microarrays according to the manufacturer's instructions (Cliniscience). Rabbit monoclonal antibody anti-TrkA (Cell Signaling) was used at a 1:200 dilution, Rabbit monoclonal antibody anti-phosphoTrkA (pTyr 490, Sigma) was used at a 1:50 dilution. Results were analysed by two people in a blind manner. The expression score was determined by combining staining intensity and the percentage of immunoreactive cells. Tissues with no staining were rated as 0, with a faint, or moderate or strong staining in less than 25% of cells as 1, with moderate or strong staining in 25-50% of cells as 2, with strong staining in more than 50% of cells as 3.

Xenograft tumor samples were fixed in 10% neutral formalin buffer, embedded in paraffin, sectioned at 5 μ m, dewaxed by methylcyclohexane (3x10 min) and rehydrated through a graded series of ethanol and water. For immunohistochemical analysis, tissue sections were incubated with a tris sodium citrate buffer 10 mM (pH 6) for 40 min at 100°C. Mouse monoclonal antibody against PCNA (1:80 dilution) from Calbiochem and rat monoclonal antibody against vWF (1:50 dilution) from Novus Biological were used. These primary antibodies were incubated for 1 h at 37°C. Biotinylated goat anti-mouse or anti-rat antibodies (Sigma-Aldrich) were used as the secondary antibodies (1:200 dilution, 1 h at room temperature). The slides were treated with the Renaissance TSA Biotin System kit (Perkin Elmer) according to manufacturer's instructions. The signals were visualized with SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets (Sigma-Aldrich) for 5 min. The sections were then

counterstained with hematoxylin (Sigma-Aldrich) and mounted with Dako Glycergel (Dakocytomation). All sections were washed (3x5 min) with washing buffer (pH 7.6) after each step. Substitution of the primary antibody with PBS was used as a negative control.

For terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) assay, tissue sections were rehydrated and then incubated with proteinase K for 30 min at 37°C. Apoptotic cells were detected by the TUNEL assay *in situ* cell death detection kit (Roche Molecular Biochemicals) according to the manufacturer's instructions. Positive TUNEL staining was visualized using SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets (Sigma-Aldrich).

Spontaneous and experimental metastasis assays

To measure spontaneous metastasis, GFP-positive cells were subcutaneously injected into the flanks (2×10^6 cells/flank) of 8-week-old SCID mice as described above. Once the average tumor size approached 2 cm^3 , the mice were sacrificed and their lungs, liver and brain were removed for further analysis. The organs were cut to 2 parts: one half for histological analysis, the other half was digested with enzymes (2.5 mg/ml trypsin, 0.5 mg/ml collagenase XI, 0.5 mg/ml hyaluronidase) for 1 h at 37°C before quantification of the metastatic cells (GFP-positive) by FACS analysis. Cultured GFP-positive MDA-MB-231 cells were used as a positive control. Cells derived from the lungs, liver and brain of a mouse injected with GFP-negative MDA-MB-231 cells were used as a negative control. To recultivate cancer cells derived from primary tumors and lungs, enzymatic digests were washed once in 10 ml EMEM 10% FCS and seeded in cell culture dishes in EMEM 10% FCS with 800 µg/ml hygromycin for 2-3 weeks. Selected tumor cells were confirmed after examination of GFP expression under fluorescent microscopy.

To measure experimental metastasis, 5×10^5 GFP-positive cells were injected into the lateral tail veins of 8-week-old SCID mice. Eight weeks after injection, the mice were sacrificed and metastatic cells in their lungs were quantified as described above.

Statistical analysis

Statistical differences were determined with two-tailed Student's *t* tests. All *p* values were two-sided. $p < 0.01$ was considered as statistically significant.

Acknowledgements

We acknowledge the excellent technical assistance of Isabelle Lefebvre. Grant support: Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée 2009), INSERM, le Ministère de l'Éducation Nationale and la Région Nord/Pas-de-Calais plus the FEDER.

References

- Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, Mougel A, Page A, Romon R et al. (2008). Nerve Growth Factor is a Potential Molecular Target in Breast Cancer. *Cancer Res* **68**:346-351.
- Aragona M, Panetta S, Silipigni AM, Romeo DL, Pastura G, Mesiti M et al. (2001). Nerve growth factor receptor immunoreactivity in breast cancer patients. *Cancer Invest* **19**:692-697.
- Campos X, Munoz Y, Selman A, Yazigi R, Moyano L, Weinstein-Oppenheimer C et al. (2007). Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **104**:168-175.
- Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P et al. (2002). Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *Faseb J* **16**:1307-1309.
- Chao MV. (1994). The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* **25**:1373-1385.
- Chopin V, Slomianny C, Hondermarck H, Le Bourhis X. (2004). Synergistic induction of apoptosis in breast cancer cells by cotreatment with butyrate and TNF-alpha, TRAIL, or anti-Fas agonist antibody involves enhancement of death receptors' signaling and requires P21(waf1). *Exp Cell Res* **298**:560-573.
- Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, Cantarella G, Bianchi A, Bernardini R. (2001). Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* **61**:3002-3008.
- Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Ann Florenes V, Nielsen S, Nesland JM. (2004). Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* **83**:119-128.
- Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Nesland JM, Skrede M, Risberg B et al. (2003). Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**:2248-2259.
- Descamps S, Pawlowski V, Revillion F, Hornez L, Hebbar M, Boilly B et al. (2001a). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res* **61**:4337-4340.

- Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V et al. (2001b). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* **276**:17864-17870.
- Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V, Hondermarck H. (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* **22**:5592-5601.
- Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, Peeper DS. (2004). Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* **430**:1034-1039.
- Frisch SM, Screaton RA. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **13**:555-562.
- Geiger TR, Peeper DS. (2007). Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis. *Cancer Res* **67**:6221-6229.
- Hedley BD, Vaidya KS, Phadke P, MacKenzie L, Dales DW, Postenka CO et al. (2008). BRMS1 suppresses breast cancer metastasis in multiple experimental models of metastasis by reducing solitary cell survival and inhibiting growth initiation. *Clin Exp Metastasis* **25**:727-740.
- Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P et al. (2006). Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* **116**:1561-1570.
- McGregor LM, McCune BK, Graff JR, McDowell PR, Romans KE, Yancopoulos GD et al. (1999). Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:4540-4545.
- Mercurio AM, Lipscomb EA, Bachelder RE. (2005). Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**:283-290.
- Mukai J, Suvant P, Sato TA. (2003). Nerve growth factor-dependent regulation of NADE-induced apoptosis. *Vitam Horm* **66**:385-402.
- Nakanishi K, Sakamoto M, Yasuda J, Takamura M, Fujita N, Tsuruo T et al. (2002). Critical involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in anchorage-independent growth and hematogeneous intrahepatic metastasis of liver cancer. *Cancer Res* **62**:2971-2975.

- Rennebeck G, Martelli M, Kyprianou N. (2005). Anoikis and survival connections in the tumor microenvironment: is there a role in prostate cancer metastasis? *Cancer Res* **65**:11230-11235.
- Reichardt LF. (2006). Neurotrophin-regulated signaling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**:1545-1564.
- Ricci A, Greco S, Mariotta S, Felici L, Bronzetti E, Cavazzana A et al. (2001). Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**:439-446.
- Sawaki M, Ito Y, Tada K, Mizunuma N, Takahashi S, Horikoshi N et al. (2004). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in heavily pretreated patients with HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Tumori* **90**:40-43.
- Shen X, Kramer RH. (2004). Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor. *Am J Pathol* **165**:1315-1329.
- Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Desantis G, Tessitore A, Vetuschi A et al. (2004). TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* **6**:347-360.
- Tagliabue E, Castiglioni F, Ghirelli C, Modugno M, Asnaghi L, Somenzi G et al. (2000). Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* **275**:5388-5394.
- Toillon RA, Magne N, Laios I, Castadot P, Kinnaert E, Van Houtte P et al. (2007). Estrogens decrease gamma-ray-induced senescence and maintain cell cycle progression in breast cancer cells independently of p53. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **67**:1187-1200.
- Ursini-Siegel J, Schade B, Cardiff RD, Muller WJ. (2007). Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nat Rev Cancer* **7**:389-397.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L et al. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **20**:719-726.
- Weeraratna AT, Arnold JT, George DJ, DeMarzo A, Isaacs JT. (2000). Rational basis for Trk inhibition therapy for prostate cancer. *Prostate* **45**:140-148.
- Zhu Z, Friess H, diMola FF, Zimmermann A, Graber HU, Korc M et al. (1999). Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol* **17**:2419-2428.

Table1 Relative quantification of immunostaining of TrkA and pTrkA in breast tissue arrays

Breast samples	TrkA						pTrkA							
	Score				Mean	SD	P-value	Score				Mean	SD	P-value
	0	1	2	3				0	1	2	3			
Normal tissues (n=10)	6	4	0	0	0.40	0.48		5	5	0	0	0.50	0.50	
Tumoral tissues (n=37)	1	8	14	14	2.11	0.67	1.9 10 ⁻⁸	1	8	17	11	2.03	0.58	3.7 10 ⁻⁷

Immunohistological staining of breast tissues was estimated from 0 (no staining) to 3 (intense staining) as described in materials and methods.

Table 2 Effect of TrkA overexpression on incidence and severity of metastasis

% of GFP positive cells	Mock				TrkA			
	<0.2	0.2-0.5	0.5-1	>1	<0.2	0.2-0.5	0.5-1	>1
Liver	2/8	4/8	1/8	1/8	0/9	3/9	5/9	1/9
Lung	6/8	2/8	0/8	0/8	4/9	4/9	1/9	0/9
Brain	3/8	0/8	0/8	0/8	1/9	5/9	2/9	1/9

Mice injected with mock cells (8 animals) or with TrkA overexpressing cells (9 animals) were sacrificed when the average volume of primary tumors approached 2 cm³. The liver, lung and brain of each mouse were recovered and digested with trypsin, collagenase XI and hyaluronidase for 1 h at 37°C to obtain individual cells. The percentage of GFP-positive cells was then analysed by FACS.

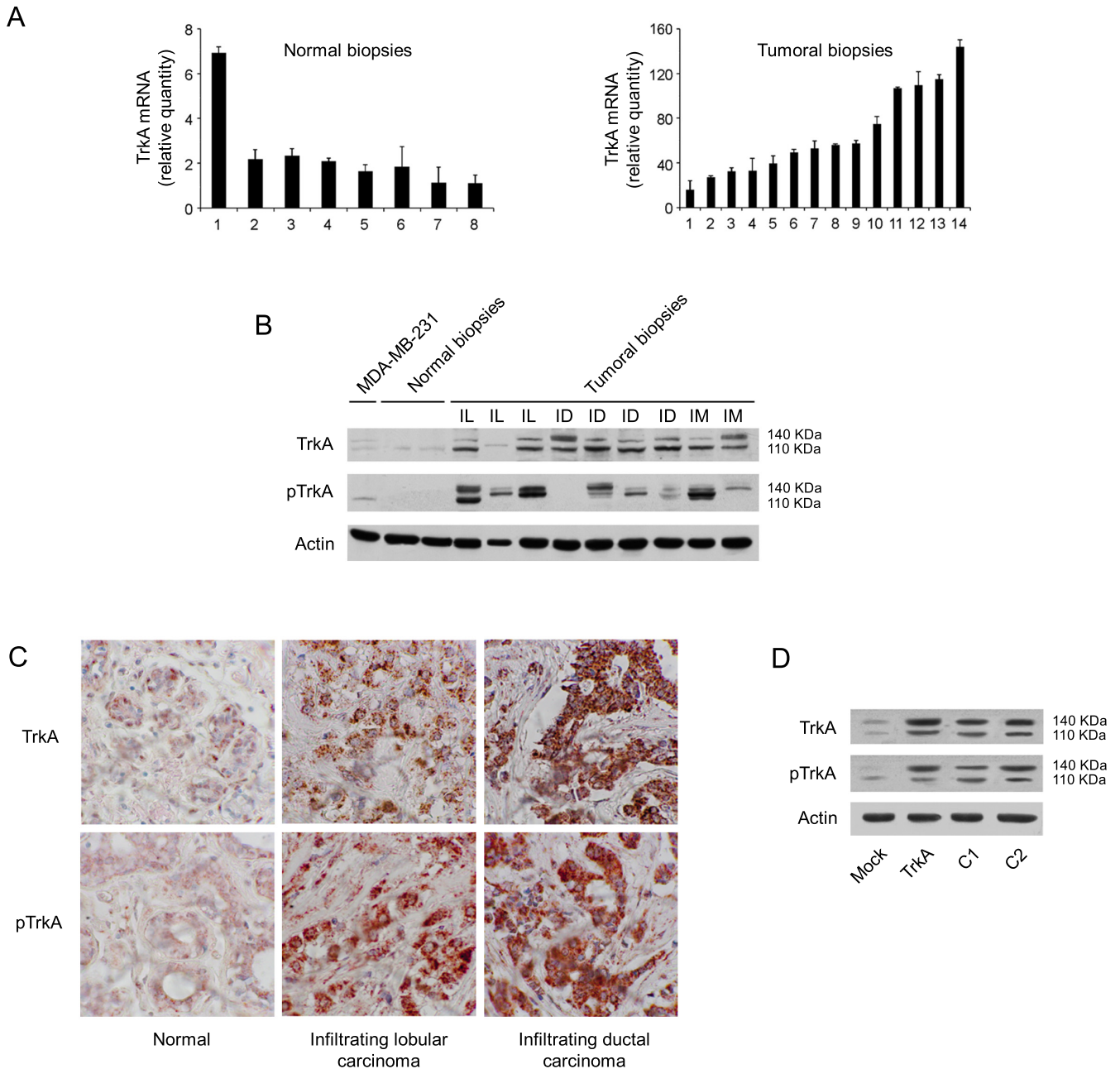


Figure 1

Detection of TrkA and phospho-TrkA (pTrkA) in breast biopsies and MDA-MB-231 breast cancer cells. **(A)** Quantitative PCR detection of TrkA mRNA in breast biopsies. Eight normal breast tissues and 14 tumor biopsies (mainly infiltrating ductal carcinomas) were used. Levels of TrkA mRNA in individual samples are expressed as relative quantity compared to that expressed by MDA-MB-231 breast cancer cells (considered as 1). **(B)** Western blot analysis of TrkA and pTrkA. Cancer biopsies used are infiltrating lobular carcinomas (IL), infiltrating ductal carcinomas (ID) and infiltrating mixed carcinomas (IM). **(C)** TrkA and pTrkA immunostaining of breast tissue microarrays. Representative staining in normal (scored as 1) and tumoral tissues (scored as 3) are shown. Immunostaining was essentially localized in epithelial cells. **(D)** Western analysis of TrkA and pTrkA in MDA-MB-231 cells. Cells were stably transfected with the full length sequence of TrkA cDNA and selected as pools and/or single clones. Mock, pools of empty vector-transfected cells; TrkA, pool of cells overexpressing TrkA; C1, TrkA overexpressing clone 1; C2, TrkA overexpressing clone 2

Figure 1

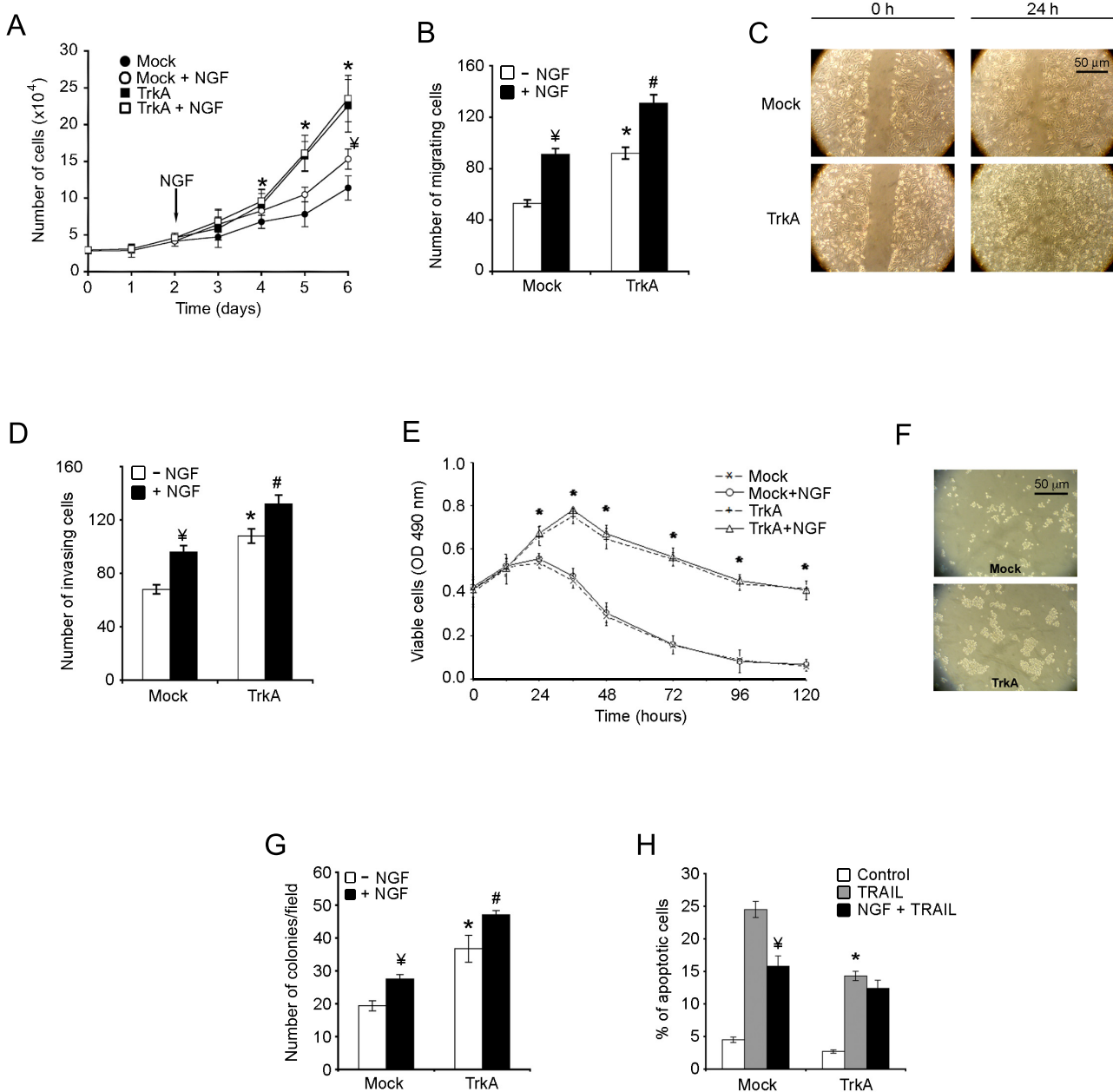


Figure 2

Pleiotropic in vitro effects of TrkA overexpression. **(A)** Growth assay on standard culture plastic was performed for various periods of time. **(B)** Migration assay (6 h) using Transwells. **(C)** Representative photographs of wound-healing assay in the presence of NGF. **(D)** Matrigel invasion (16 h) assay using Transwells. **(E)** Resistance to anoikis assay. Cells were cultured in poly-HEMA-coated-96 wells for various periods of time. Cell viability was determined by MTS. **(F)** Representative photographs of cells cultured in poly-HEMA-coated wells for 3 days in the absence of NGF. **(G)** Colony formation in soft agar. Colonies of more than 50 cells were counted after 3 weeks of culture. **(H)** Resistance to apoptosis induction by TRAIL. All results are the mean of at least 3 independent experiments each in triplicate. *, $p < 0.01$, TrkA overexpressing versus mock cells; ¥, $p < 0.01$, NGF-treated versus NGF-non treated mock cells; #, $p < 0.01$, NGF-treated versus NGF-non treated TrkA overexpressing cells.

Figure 2

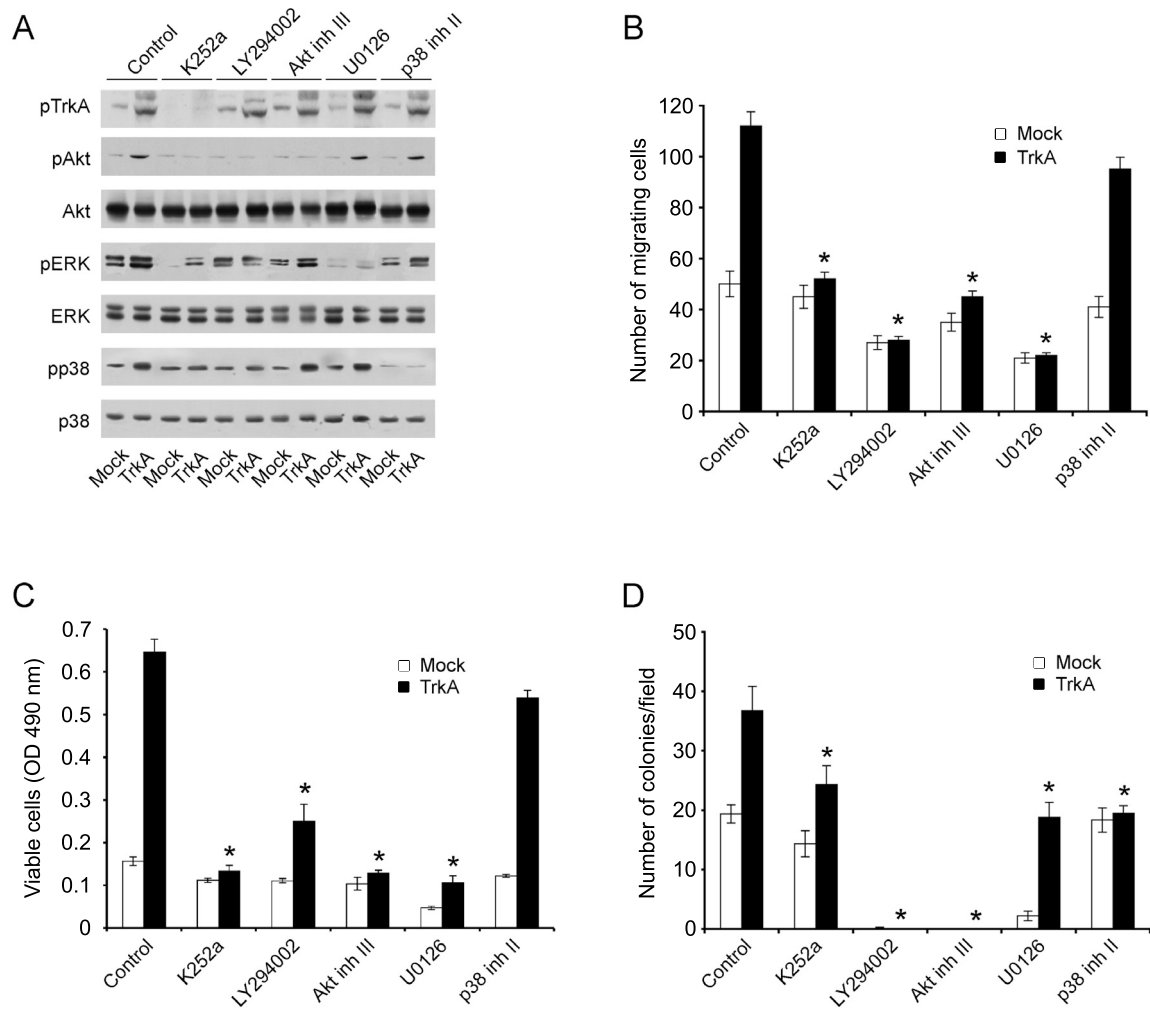


Figure 3

Involvement of PI3K-Akt and ERK/p38 MAP Kinases in TrkA-mediated biological effects. **(A)** Cells were treated in EMEM serum free-medium for 30 min with specific pharmacologic inhibitors. Lysates were made and subjected to immunoblot using the antibodies indicated. Quantification of western blots from 3 experiments is shown in Supplementary Figure 2A-C. **(B)** Migration assay using Transwells in the presence of different inhibitors for 6 h. **(C)** Anoikis assay in the presence of different inhibitors for 72 h. Anoikis resistance was quantified by MTS. **(D)** Colony formation in soft agar in the presence of different inhibitors for 3 weeks. For B-D, results are the mean of 3 independent experiments. *, $p < 0.01$, inhibitors-treated versus untreated TrkA overexpressing cells.

Figure 3

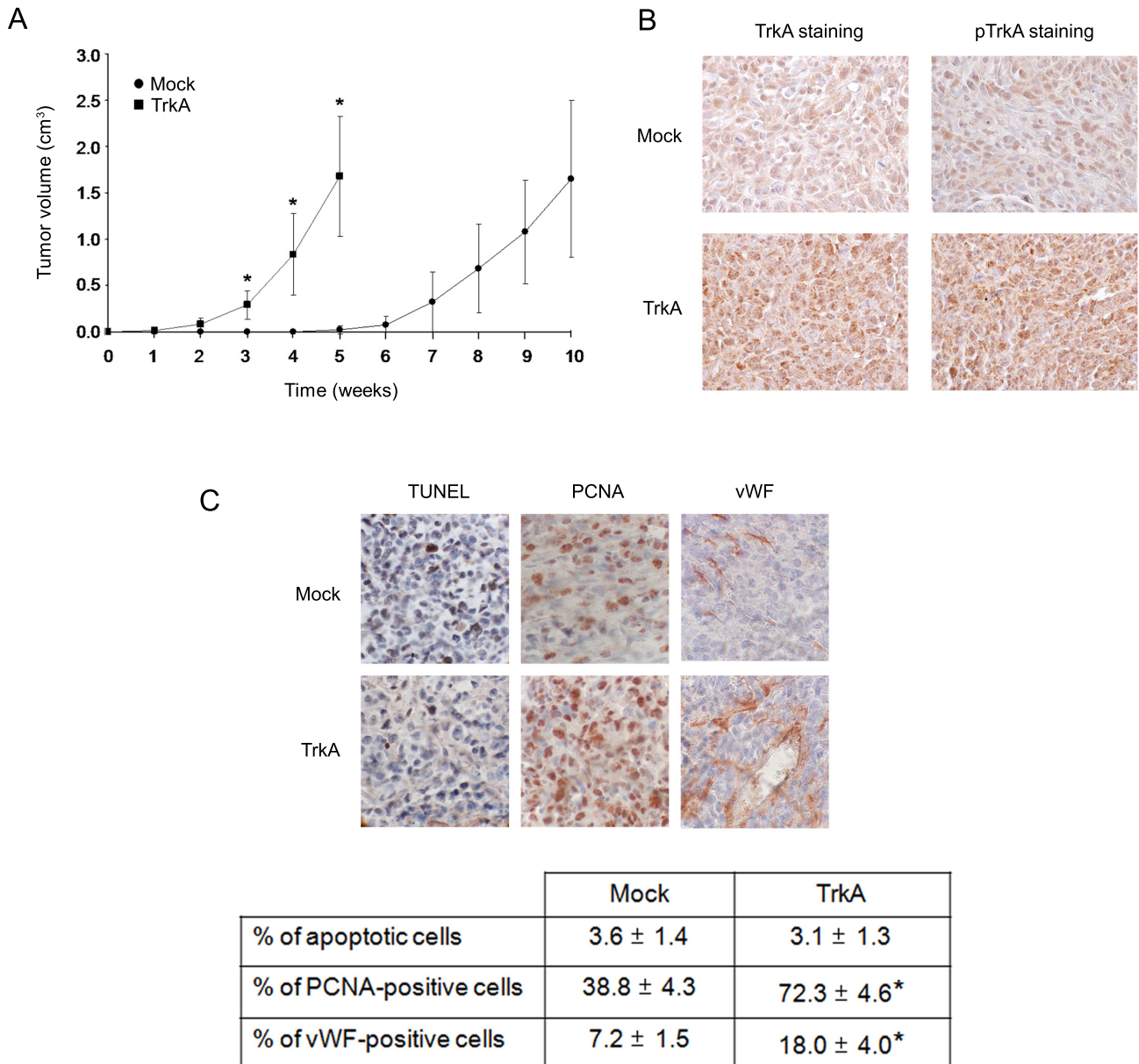


Figure 4

Xenograft tumor growth in SCID mice. Cells (2×10^6) were subcutaneously injected into mice (9 mice per group). Tumor growth was monitored weekly until mean tumor volume approached 2 cm³ (10 weeks for mock cells, 5 weeks for TrkA overexpressing cells). Xenografted tumors were then sectioned for further analysis. (A) Growth curve of tumors. Data are representative of 3 independent experiments. *, $p < 0.01$, TrkA overexpressing versus mock cells. (B) Immunostaining of TrkA and pTrkA of xenografted tumor sections. (C) TUNEL reaction, immunostaining of PCNA and vWF of xenografted tumor sections. Results are representative of 2 independent experiments. * $p < 0.01$, TrkA overexpressing versus mock cells.

Figure 4

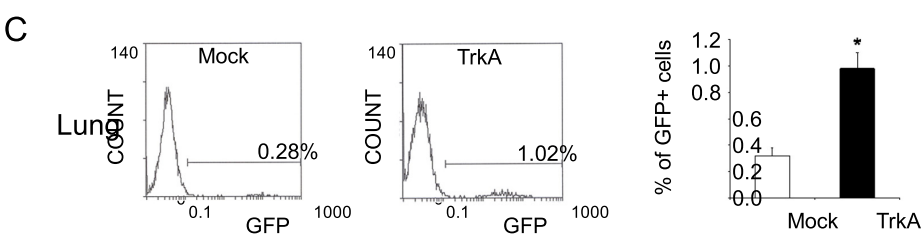
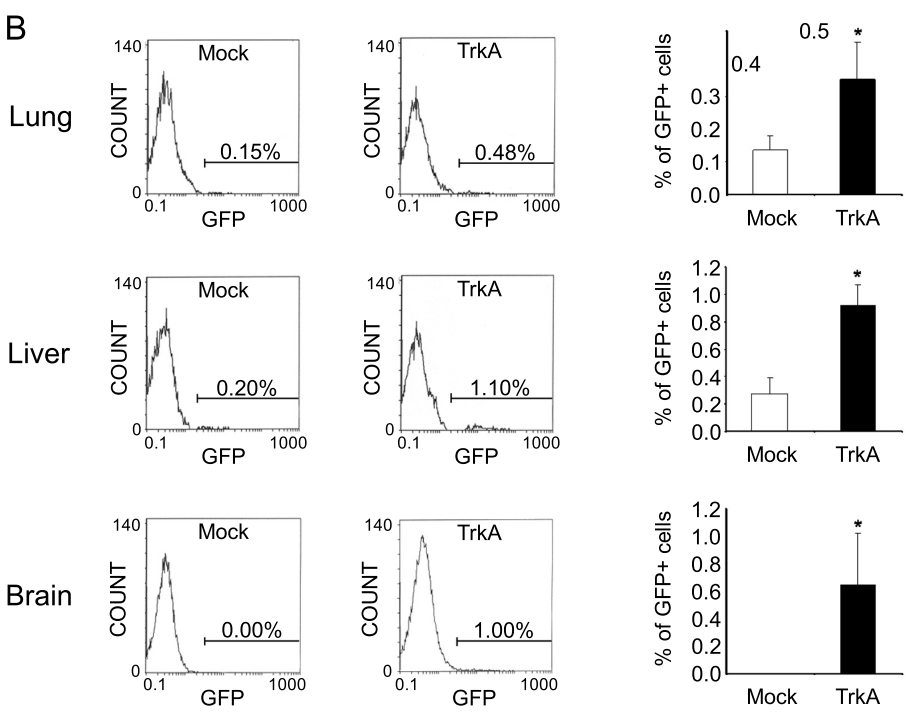
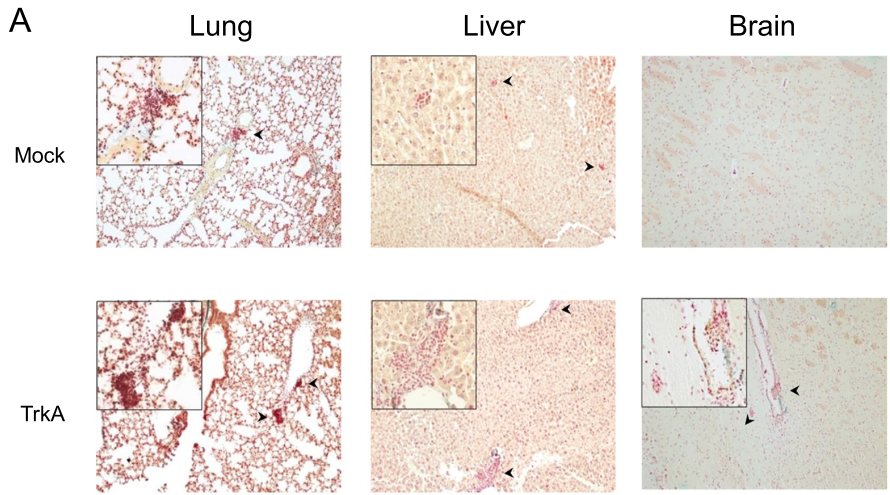


Figure 5
 Metastasis assessment. GFP-mock or GFP-TrkA overexpressing cells were subcutaneously injected into SCID mice (A and B). Mice were sacrificed when tumor volume approached 2 cm³. Lungs, liver and brain were removed and processed for the detection of metastatic cells. **(A)** Paraffin sections of lungs, liver and brain were stained with nuclear red and picroindigo carmine. Arrows indicate metastatic foci (insets: higher magnification of the metastatic foci). **(B)** Quantification of GFP-positive cells by FACS analysis. Histograms represent the mean of results from 8 mice injected with mock cells and 9 mice injected with TrkA overexpressing cells. *, p<0.01, TrkA overexpressing versus mock cells. **(C)** GFP-mock or GFP-TrkA overexpressing cells were injected into the lateral tail veins of SCID mice (9 mice per group). Eight weeks later, the mice were sacrificed and GFP-positive cells in their lungs were quantified by FACS. *, p<0.01, TrkA overexpressing versus mock cells.

Figure 5

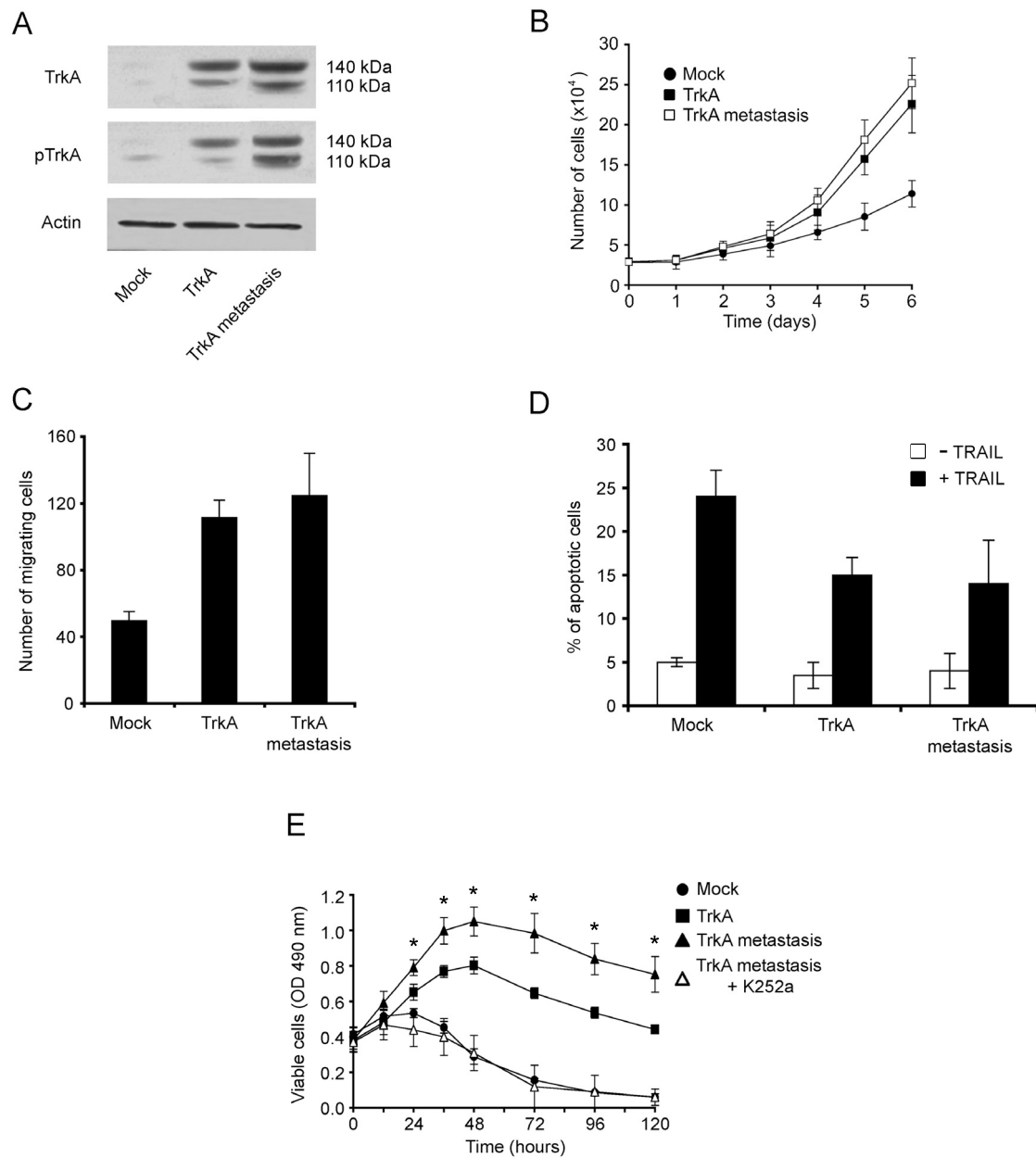


Figure 6

Properties of lung metastatic TrkA overexpressing cells. Lung metastatic TrkA overexpressing cells were recultured (9 cultures) from the lungs of 9 mice subcutaneously injected with TrkA overexpressing cells. **(A)** Immunoblots of TrkA and pTrkA from pooled metastatic cells. **(B)** Growth assay on standard culture plastic. **(C)** Migration assay using Transwells. **(D)** Resistance to TRAIL-induced apoptosis. **(E)** Anoikis resistance of cells treated or not with K252a. *, $p < 0.01$, metastatic TrkA overexpressing cells versus parental TrkA overexpressing cells.

Figure 6

Supplementary data

Assays of cell behaviour in culture

Cell growth. Cells (3×10^4) were plated in EMEM 10% FCS. Twenty-four hours later, cells were starved in EMEM serum-free medium for 24 h and then treated with NGF (200 ng/ml) in EMEM 0.1% FCS. Cell numbers were evaluated every day using Malassez's cell.

Migration and Matrigel chemoinvasion. For cell migration assay, 5×10^4 cells were seeded on polycarbonate membrane insert (6.5 mm in diameter with 8 μ m pores) in Transwell apparatus (BD Bioscience), NGF (200 ng/ml at final concentration) was added in EMEM containing 0.1% FCS in the bottom well. Cells were then cultured for 6 h. For the Matrigel chemoinvasion assay, a procedure similar to cell migration assay was used, except that the Transwell membrane was coated with GFR (Growth Factor Reduced)-Matrigel (BD Biosciences), and the cells were incubated for 16 h. The insert was washed with PBS, and cells on the top surface of the insert were removed by wiping with a cotton swab. Cells that migrated to the bottom surface of the insert were fixed with methanol and stained by Hoechst 33258 and then subjected to fluorescent microscopic inspection. Cells were counted on 10 random fields at 200 magnification.

Wound-healing assay. Cells were plated onto a 35 mm culture dish and allowed to form a confluent monolayer then wounded using a pipette tip. Cells were then treated with 200 ng/ml NGF for a further 24 h in EMEM containing 0.1% FCS. Wounded cultures were photographed at the beginning and at the end of the experiment.

Anoikis assay. Cells were seeded on poly-HEMA (0.6 mg/cm², Sigma)-coated 96 wells plates (1×10^5 cells/well) in EMEM 1% FCS and cultured in the presence or absence of NGF (200 ng/ml) for varying periods of time. Cell viability was analyzed by MTS assay (Promega) according to the users' manual.

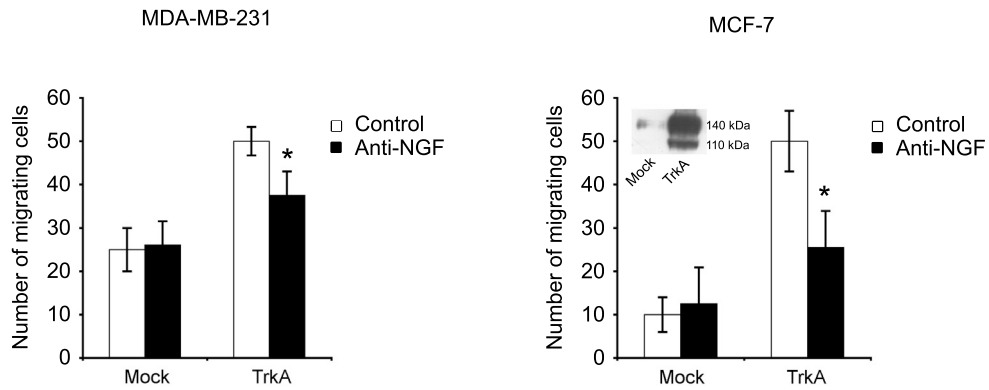
Soft agar assay for colony formation. Experiments were performed as previously described (Toillon *et al.*, 2007). Briefly, MDA-MB-231 cells were plated in six-well plates at a density of 25 000 per well and treated with 200 ng/ml NGF. After 3 weeks of culture, colonies of more than 50 cells were counted. Three independent wells were examined for each experiment.

Apoptosis analysis. Cells were starved in serum-free medium (12 h) and then pretreated with 200 ng/ml NGF (1 h) before treatment with 5 ng/ml TRAIL in the

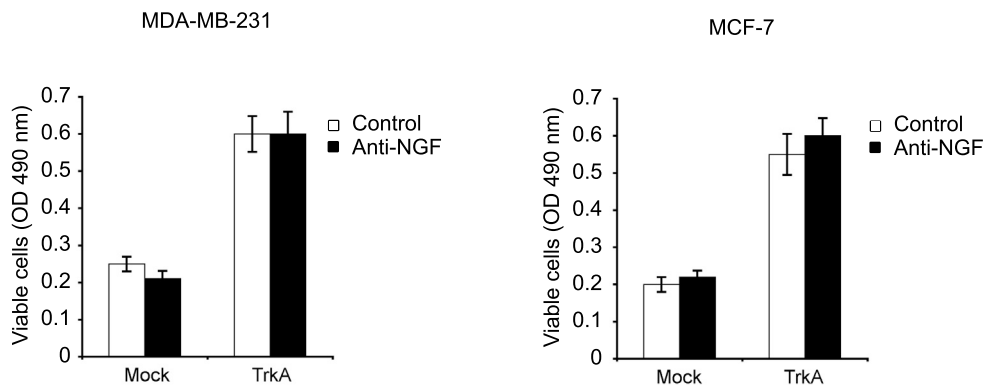
presence of NGF for 6 h. Apoptosis was determined by morphological analysis as previously described (Chopin *et al.*, 2004).

Pharmacological inhibition. Specific inhibition was performed with 10 nM K252a, 15 μ M LY294002, 15 μ M Akt inhibitor III, 10 μ M U0126, or 10 μ M p38 inhibitor II, all from Calbiochem. Control cells were treated with DMSO at a 1:1000 dilution. The concentrations used were based upon the absence of toxicity in the MDA-MB-231 cells, which was determined by cell proliferation assay in serum-free medium for 48 h.

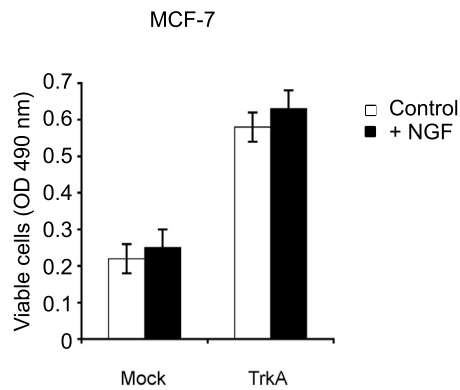
A



B



C

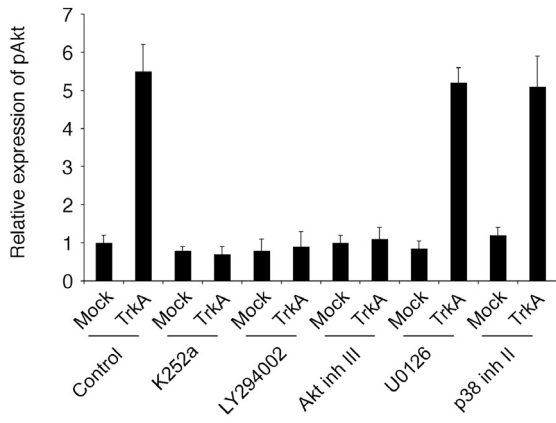
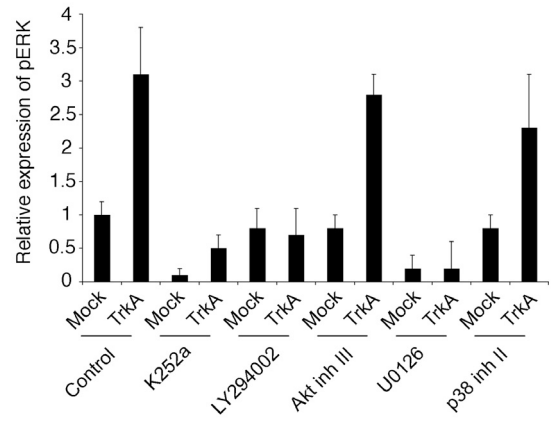
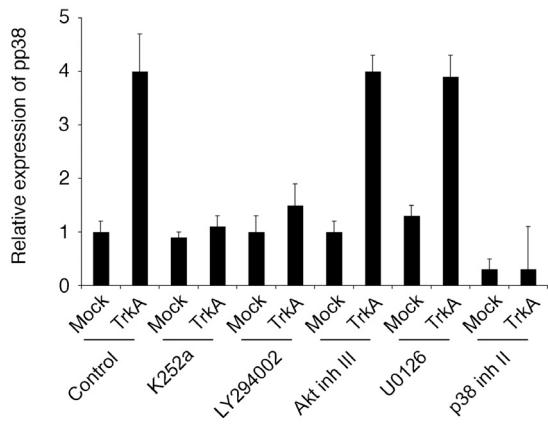
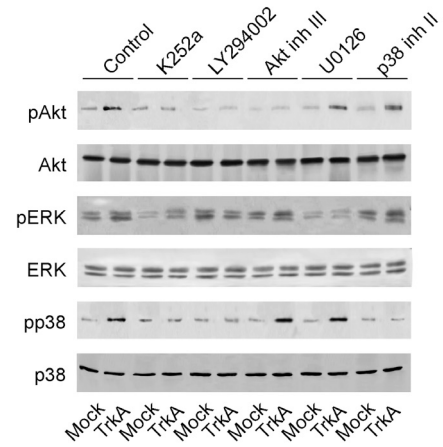


Supplementary Figure 1

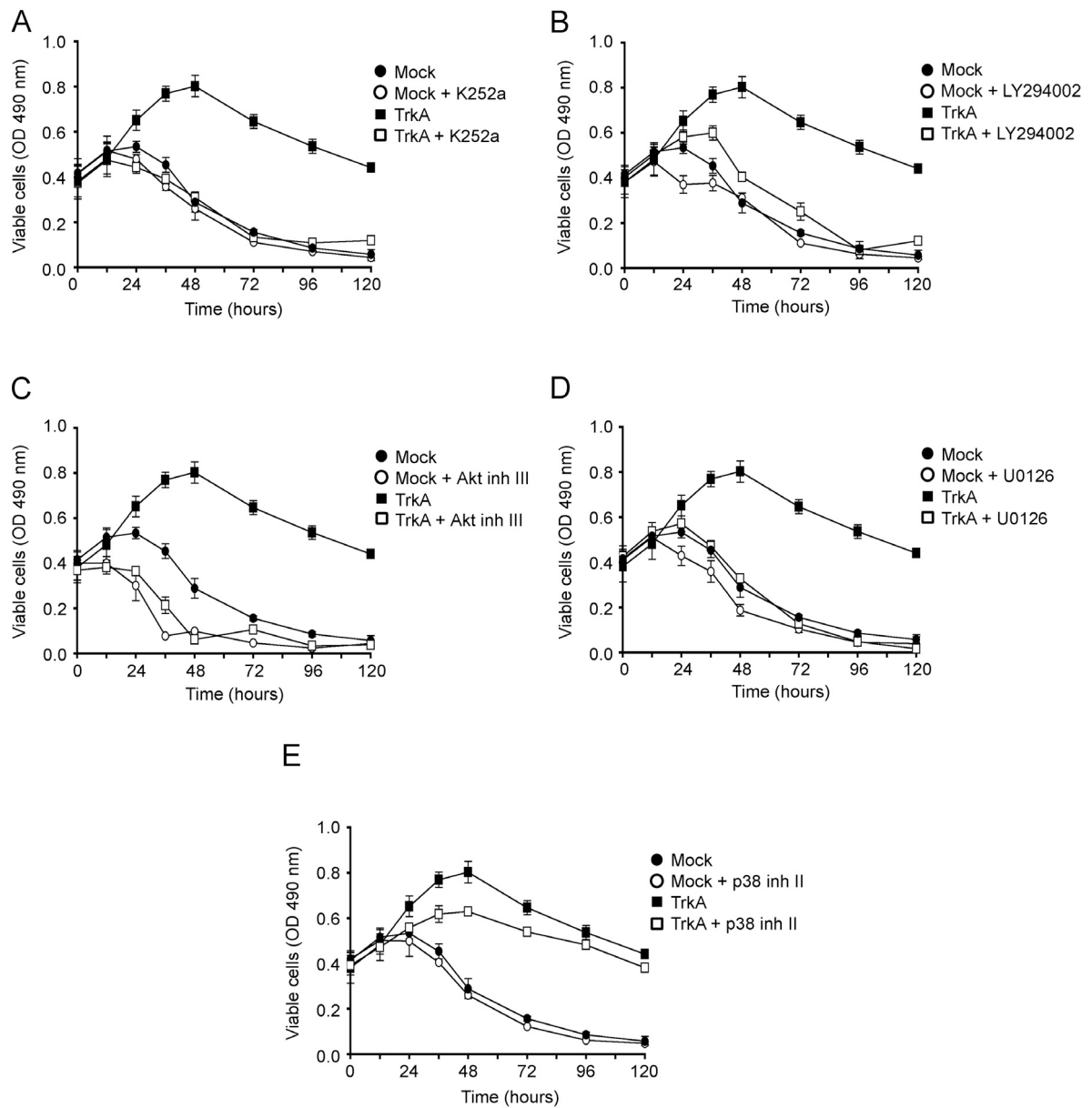
Migration and anoikis of breast cancer cells treated with neutralizing antibody anti-NGF or with NGF. MCF-7 cells were transiently transfected with the TrkA expression vector, TrkA overexpression was then confirmed by Western blot. (A) Migration assay using Transwells. Cells were treated with neutralizing anti-NGF antibody or non-relevant antibody (control) for 6 h. (B and C) Anoikis assay. Cells were seeded in poly-HEMA-coated 96-wells plates and cultured for 72 h in the presence of neutralizing anti-NGF antibody (B) or NGF (C). All results are the mean of 3 independent experiments. *, $p < 0.01$, anti-NGF-treated versus untreated TrkA overexpressing cells.

Supplementary Figure 1

Lagadec *et al.*

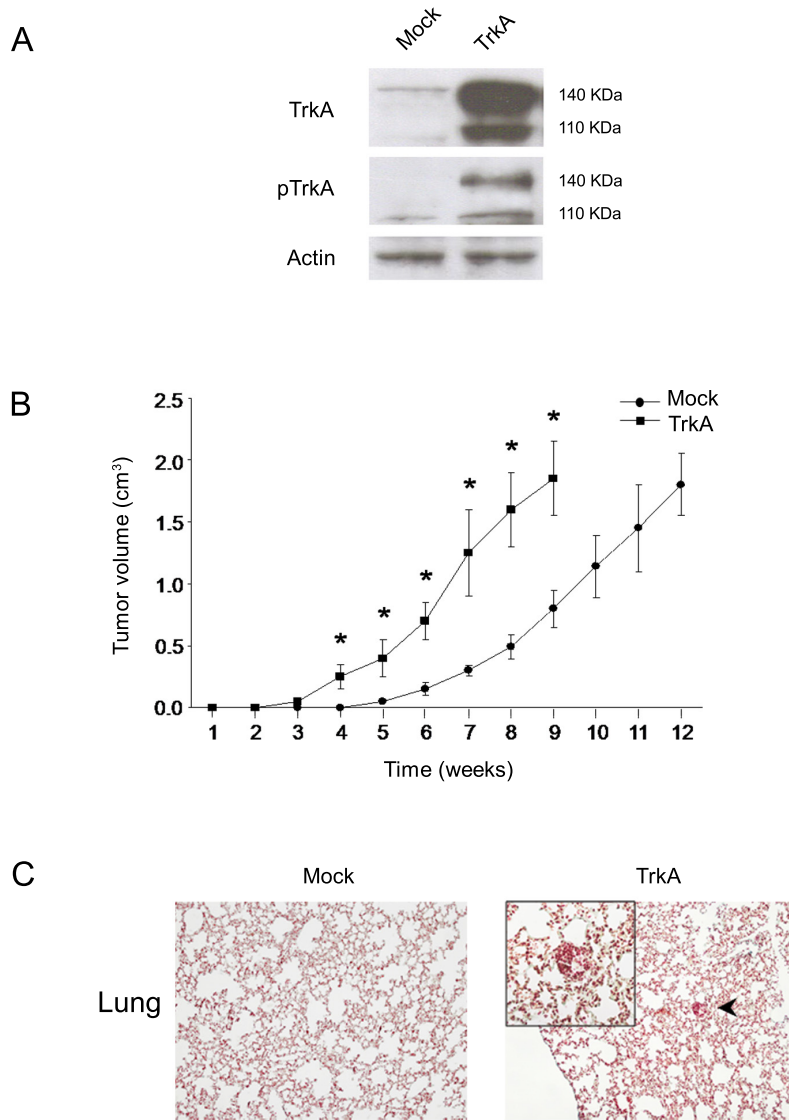
A**B****C****D****Supplementary Figure 2**

A-C, levels of pAkt (**A**), pERK (**B**) and pp38 (**C**) by Western blot analysis (Figure 3A) were quantified by densitometry. Values were normalised with the respective total proteins TrkA, Akt and p38. Results are the mean of 3 independent experiments. **D**, Western blot analysis of pAkt and pERK/pp38 MAP Kinases in cells cultured in suspension in the presence of different inhibitors.



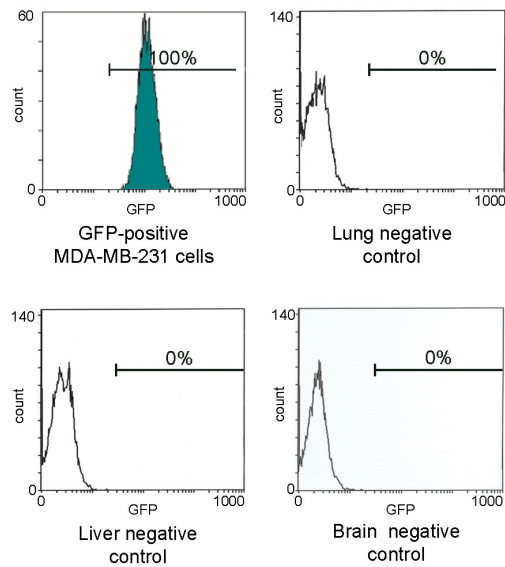
Supplementary Figure 3

Effects of TrkA overexpression on anoikis resistance. Cells were cultured in poly-HEMA-coated 96-well plates in the presence of different inhibitors. Cell viability was determined by MTS after various periods of time.



Supplementary Figure 4

(A) Western analysis of TrkA and pTrkA in T47-D cells. Cells were stably transfected with the full length sequence of TrkA1 cDNA and selected as pools. Mock, cells transfected with empty vector; TrkA, cells transfected with TrkA1 cDNA. (B) Growth curve of tumors. T47-D mock or TrkA overexpressing cells (1×10^7) were subcutaneously injected into mice (10 mice per group). Tumor growth was monitored weekly until mean tumor volume approached 2 cm³ (12 weeks for mock cells, 9 weeks for TrkA overexpressing cells). (C) Histological analysis of lung metastases. Mice were sacrificed when primary tumor size approached 2 cm³. The lungs were then removed, fixed in formalin, and stained with nuclear red and picroindigo carmine. Metastatic foci were quantified by counting metastatic lesions in 50 sections (about 0.2 mm apart). No metastases were found in the 10 mice that had been transplanted with mock cells. However, 6 out of 10 mice that had received TrkA overexpressing cells exhibited lung micrometastases with the average number of metastatic foci from 50 sections being 7. *, $p < 0.01$, TrkA overexpressing versus mock cells.



Supplementary Figure 5

FACS analysis GFP-positive and -negative controls. GFP-positive MDA-MB-231 cells were used as a positive control. The liver and brain of a mouse receiving a subcutaneous injection of GFP-negative MDA-MB-231 cells were used as negative controls.

Supplementary Figure 5

RESULTATS

Article 2:

Involvement of p21^{waf1} in p75^{NTR} overexpression-induced growth inhibition and survival in breast cancer cells

A) Introduction

p75^{NTR}, second récepteur du NGF, mais également des autres neurotrophines et pro-neurotrophines, est lui aussi impliqué dans de nombreux cancers tels que les mélanomes (Marchetti et al., 2004), les cancers hépatiques (Yuanlong et al., 2008), gastriques (Jin et al., 2007) et prostatiques (Khwaja et al., 2006), où son action est cependant plus variée et complexe que celle de TrkA. Dans le cancer du sein, tout comme TrkA, p75^{NTR} se trouve moins exprimé dans les lignées cellulaires que dans les échantillons tumoraux. J'ai entrepris alors une étude similaire à celle de TrkA sur l'impact de la surexpression de p75^{NTR} sur la croissance des cellules de cancer du sein. Forts de l'expérience acquise avec le précédent modèle, nous avons choisi ici d'établir et de caractériser un modèle de cellules de cancer de sein surexprimant p75^{NTR} à l'aide d'un système d'expression du récepteur inducible par la Ponastérone A (PA). Ce système permet une surexpression dosée du récepteur et permet de s'affranchir de l'effet clonal dû à la transfection, et donc de la multiplication des clones, puisque les cellules contrôle et les cellules surexprimant sont un seul et même clone induit ou non.

B) Résultats

La caractérisation du clone inducible surexprimant p75^{NTR} a permis de déterminer que la seule surexpression du récepteur entraîne une baisse importante de la croissance des cellules *in vitro*. L'analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux révèle que les cellules surexprimant le récepteur sont partiellement bloquées en phase G0-G1. Par analyse en western blot, nous montrons que ce blocage s'accompagne d'une baisse de la phosphorylation de la protéine Rb sans en affecter son niveau d'expression total ni l'expression des cyclines D1, D3, E et de E2F. En

RESULTATS

revanche, la surexpression de p75^{NTR} conduit à une importante augmentation du niveau protéique de l'inhibiteur du cycle p21^{waf1}, contrairement aux inhibiteurs p15^{INK4B}, p16^{INK4A} et p27^{Kip1}. L'analyse par PCR en temps réel montre que l'augmentation de p21^{waf1} se fait au niveau de son ARNm. D'autre part, la seule surexpression de p75^{NTR} augmente également la survie des cellules à l'apoptose induite par TRAIL ou par la doxorubicine. Cet effet de survie passe par une inhibition de la voie apoptotique intrinsèque visualisée par une augmentation du niveau de C-IAP1 et l'inhibition du clivage de la caspase 9, en plus de l'inhibition de la caspase 3 et de PARP. De façon intéressante, le retour au niveau initial de p21^{waf1} par l'utilisation de siRNA rétablit la prolifération cellulaire et mais également la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL faisant de p21^{waf1} un acteur central des effets induits par la surexpression de p75^{NTR}. De façon importante, la surexpression de p75^{NTR} induit une augmentation de la croissance des tumeurs primaires en souris SCID.

C) Conclusion

Nous montrons ici que la seule surexpression du récepteur p75^{NTR} entraîne une augmentation du niveau protéique de p21^{waf} responsable d'une inhibition de la croissance cellulaire par blocage du cycle en G0/G1, mais également d'une survie accrue des cellules à l'apoptose. Bien que d'apparence contradictoire, ces effets observés *in vitro* se traduisent *in vivo*, en souris SCID, par une augmentation de la croissance des tumeurs primaires. Ainsi, p75^{NTR} pourrait contribuer à la croissance tumorale dans le cancer du sein.

Ces résultats sont présentés dans l'article qui suit et sera prochainement soumis.

Involvement of p21^{waf1} in p75^{NTR}-induced growth inhibition and survival in breast cancer cells

S Meignan, S Verbeke, C Lagadec¹, H Hondermarck, E Adriaenssens², and X Le Bourhis

INSERM U908 "Signalisation des facteurs de croissance dans le cancer du sein. Protéomique fonctionnelle" and Université de Lille, Villeneuve d'Ascq, France.

²UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, CNRS Université de Lille, Institut Pasteur de Lille, France.

Corresponding author: Xuefen Le Bourhis, INSERM U908, Bâtiment SN3, Université de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Phone: 33 (0)3 20 43 45 81; Fax: 33 (0)3 20 43 40 38; Email: xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr

Footnotes: ¹Present address: Department of Radiation Oncology, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, USA.

Running title: Involvement of p21^{waf1} in p75^{NTR}-mediated biological effects

Keywords: p75^{NTR}, breast cancer, cell cycle, apoptosis, p21^{waf1}.

Abbreviations: MTS: tetrazolium salt of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)

FBS: Foetal Bovine Serum, TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, FITC: Fluoresceine Iso Thio Cyanate.

Abstract

The p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) plays a critical role in various neuronal and non-neuronal cell types by regulating cell survival, differentiation and proliferation. To evaluate the influence of p75^{NTR} in breast cancer development, we have established and characterized breast cancer cells which inducibly overexpress p75^{NTR}. We showed that p75^{NTR} overexpression inhibited cell growth in culture through a blockage of cells in G0/G1 phase. Meanwhile, p75^{NTR} overexpression *per se* promoted cell resistance to apoptogens such as TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) and doxorubicine. The increased survival was associated with an increase of c-IAP1 (Cellular inhibitor of apoptosis protein 1) and a decrease of TRAIL-induced cleavage of pro-caspase 9, pro-caspase 3 and PARP (Poly ADP-ribose polymerase). Importantly, p21^{waf1} was found to be up-regulated in p75^{NTR} overexpressing cells in different culture conditions and its inhibition using siRNA largely rescued cells from p75^{NTR} overexpression-induced growth inhibition and survival. Together, these results pointed to a dual p21^{waf1} dependent anti-proliferative and pro-survival function of p75^{NTR} in breast cancer cells. However, in an immunodeficient mice xenograft model, p75^{NTR} overexpression increased primary tumour growth. Therefore, despite the opposite roles of p75^{NTR} *in vitro*, its overexpression could contribute to breast tumor growth *in vivo*.

Introduction

The p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) was the first identified receptor for nerve growth factor (NGF) but it binds also all the other neurotrophins including brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3), and NT-4/5 as well as pro-neurotrophins (Hempstead, 2006). Significantly, p75^{NTR} is a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily (Liepinsh et al., 1997), which exerts diverse functions during neuronal development such as apoptosis, survival and proliferation (Nykjaer et al., 2005). p75^{NTR} is expressed not only in nervous tissues but also in non neuronal normal and cancerous tissues. Particularly, p75^{NTR} has been reported to be overexpressed in some cancers such as thyroid carcinoma (Rocha et al., 2006) and melanoma (Truzzi et al., 2008), while it is down-regulated in cancers of other tissues including bladder (Khwaja and Djakiew, 2003), prostate (Khwaja et al., 2006), stomach (Jin et al., 2007) and liver (Jin et al., 2007; Khwaja and Djakiew, 2003; Khwaja et al., 2006; He et al., 2008). p75^{NTR} seems to have opposite functions according to the type of tumors. For example, it has been described to exert a tumor-promoting function in melanoma by favoring survival and metastasis of cancer cells (Marchetti et al., 2004; Menter et al., 1994), while it has been proposed as a potential tumor suppressor in other carcinomas such as prostate (Khwaja et al., 2004), bladder ((Jin et al., 2007; Khwaja et al., 2004; Tabassum et al., 2003; Yuanlong et al., 2008), stomach (Jin et al., 2007) and liver cancers (He et al., 2008). In breast cancer, we have previously shown that NGF acts as an autocrine growth factor to stimulate cell proliferation and survival (Dolle et al., 2003). Interestingly, NGF cooperates with p185 (HER2) to stimulate breast cancer cell growth (Tagliabue et al., 2000), and Tamoxifen, the commonly used drug in hormonotherapy, inhibits the proliferative effects of NGF (Chiarenza et al., 2001). More recently, we have shown that NGF is expressed in the majority of human breast tumors, especially in epithelial cancer cells. Moreover, anti-NGF antibodies and small interfering RNA against NGF strongly inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer cells xenografted in immunodeficient mice (Adriaenssens et al., 2008). These *in vitro* and *in vivo* results suggest that NGF is actively involved in mammary tumor development. NGF binds two classes of receptors, the tyrosine kinase receptor TrkA and the p75^{NTR}. We

have shown that TrkA overexpression in breast cancer cells enhances cell growth and tumorigenesis (Lagadec et al., 2009). However, the role of p75^{NTR} in breast cancer development and its mechanism of action remain to be determined. Unfortunately, commonly used breast cancer cell lines express relatively low levels of p75^{NTR} compared to tumor biopsies (Descamps et al., 2001a). Here, we showed that overexpression of p75^{NTR} in MDA-MB-231 breast cancer cells decreased cell proliferation by accumulating cells in G0/G1 phase and increased survival by inhibiting intrinsic apoptosis pathway. Moreover, p75^{NTR} increased the expression of p21^{waf1} which was largely responsible for p75^{NTR}-induced growth inhibition and survival. Finally, in a SCID mice xenograft model, p75^{NTR} overexpression increased tumour growth. Therefore, despite the opposite roles of p75^{NTR} *in vitro*, its overexpression could contribute to breast tumor growth *in vivo*.

Materiel & methods

Plasmids

The Ecdysone inducible system (Invitrogen) includes 2 plasmids: pVgRXR and pIND. Plasmid pVgRXR contains the coding sequences for the modified subunits of ecdysone receptor, RXR and VgEcR, under the control of constitutive Rous sarcoma virus and cytomegalovirus promoters. Plasmid pIND contains five repeats of a modified ecdysone response element upstream from a minimal promoter. In the presence of ecdysone, an insect steroid, or synthetic analogs such as ponasterone A (PA), the VgEcR and RXR receptors dimerize to form a functional modified ecdysone receptor that bind the modified ecdysone response element on pIND and induces the downstream gene transcription. Complementary DNA of p75^{NTR} from MDA-MB-231 breast cancer cells was placed into the multiple cloning site of pIND and the obtained plasmid is named as pIND-p75^{NTR}. The plasmid pIND-βGal contains the β-Galactosidase gene placed into the multiple cloning site of pIND.

Cell culture, transfection and generation of p75^{NTR} overexpressing cancer cells

The MDA-MB-231 breast cancer cell line was obtained from the American Type Culture Collection. Cells were routinely maintained in monolayer cultures in EMEM medium (Cambrex) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Perbio). To establish the p75^{NTR} overexpressing model, MDA-MB-231 cells were first transfected with pVgRXR using Fugen (Roche) according to the manufacturer's instructions. Stably transfected clones were selected with 300 µg/ml Zeocin (Sigma Aldrich). The selected clones were tested for inducibility by transient transfection with pIND-βGal; the clone presenting the highest β-Galactosidase activity after treatment with ponasterone A (PA; Sigma Aldrich) was chosen for the secondary stable transfection with pIND-p75^{NTR}. Secondary clones were established in the same manner as the primary clones except the cells transfected with pIND-p75^{NTR} were cultured in the presence of 300 µg/ml Zeocin and 1 mg/ml G418. Levels of p75^{NTR} mRNA in the selected secondary clones were then analyzed by real-time PCR after PA induction. The clone presenting the highest level of p75^{NTR} mRNA was chosen for further study.

Real time RT-PCR

Total RNA from cells were isolated with tri reagent (Euromedex) and treated with DNase. Reverse transcription was performed with 1 µg of RNAs, 0.5 µg of random hexamers, 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen life technologies) for 10 min at 25°C, 50 min at 37°C and 15 min at 70°C in a final volume of 20 µl. Real time PCR amplifications were performed using a Quantitect SYBR®Green PCR kit (Qiagen) with 2 µl of 1:20 cDNA and 500 nM of primers. The primers used were as follows: for p75^{NTR} transcript 5'-ACGGCTACTACCAGGATGAG-3' and 5'-TGGCCTCGTCGGAATACGTG-3'; for p21^{waf1} 5'-CACTCCAAACGCCGGCTGATCC-3' and 5'-TGTAGAGCGGGCCTTTGAGGCCCTC-3' and for RPLP0 (human acidic ribosomal phosphoprotein P0), which was used as a reference gene: 5'-GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT-3' and 5'-GATGACCAGCCCAAAGGAGA-3'. The subsequent PCR conditions were carried out in the following manner: 95°C for 15s, 60°C for 20 s, and 72°C for 30 s. Data were analyzed using the MX4000 PCR system software (Stratagene) with the SYBRGreen option (with dissociation curves). p75^{NTR} and p21^{waf1} mRNA levels were expressed as relative quantity compared to that expressed by control cells.

Western blot analysis

Protein extraction of subconfluent cells was performed in lysis buffer (150 mM NaCl (Carlo Erba), 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Nonidet 40, 1 mM permethylsulfonate, 1 mM orthovanadate, 1% SDS, 1% protease inhibitors) at 4 °C. After boiling at 95°C for 5 min, insoluble material was removed by centrifugation at 4°C for 15 min at 10 000 g. Total protein concentration was determined using BCA assay (Sigma). Lysates (25 µg) were separated on SDS-polyacrylamide gels, transferred onto a nitrocellulose membrane (Scheilcher & Shuell) in transfer buffer (48 mM Tris-Base, 39 mM glycine, 1% SDS, 20% (v/v) methanol) and blocked for 1h at room temperature in Tris-buffered saline with Tween-20 (TBS-T) (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20) and 5% BSA or milk. Incubation with primary antibodies was performed in blocking buffer overnight at 4°C. Blots were probed with antibodies against p75^{NTR} (1:2000 dilution; Promega), cyclin D1 (1:500), cyclin D3 (1:500), cyclin E (1:500), E2F(1:500), phosphor-

Rb Ser795 (1:500), Rb (1:500), p15^{INK4B} (1:500), p16^{INK4A} (1:500), p21^{waf1} (1:500), p27^{Kip1} (1:500), caspase 3 (1:1000) and caspase 8 (1:1000) from Cell signaling, antibodies against caspase 9 (1:200) and PARP (1:200) from Santa Cruz Biotechnology, antibodies against c-IAP (1:500) and Bid (1:500) from R&D System, anti-XIAP (1:500; BD Transduction) and anti- β -actin (1:5000; Sigma). After washing with TBS-T, the membranes were incubated with anti-rabbit IgG peroxidase antibody (1:10 000 dilution, Jackson laboratories) or with anti-mouse IgG peroxidase antibody (1:5000 dilution, Sigma Aldrich) for 1 h at room temperature. The reaction was revealed using the chemiluminescence kit West Pico chemiluminescent substrate (Pierce) and HyperfilmTM (Amersham Biosciences).

Immunocytochemistry

Cells (1×10^4) were grown on cover slips and treated with 5 μ M PA for 24 h in culture medium containing 10% FBS. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min (4°C) and after two washes, cells were permeabilized and blocked in PBS containing 1% BSA and 100 mM Glycine for 45 min at room temperature. Cover slips were incubated with FITC coupled anti-p75 antibody (1:25, Cedarlane) overnight at 4°C in PBS-1% BSA. After several washes in PBS, cover slips were mounted in Mowiol. Observation was performed on a Zeiss LSM 510 confocal microscope (488 nm excitation for FITC).

Cell migration assays and Matrigel chemoinvasion

For cell migration assay, 5×10^4 cells were seeded on polycarbonate membrane insert (6.5 mm in diameter with 8 μ m pores) in a Transwell apparatus (BD Bioscience) and maintained in EMEM containing 0.1% FCS. For the Matrigel chemoinvasion assay, procedure similar to cell migration assay was used, except that the Transwell membrane was coated with GFR (Growth Factor Reduced)-Matrigel (BD Biosciences), and the cells were incubated for 16 h. The insert was washed with PBS, and cells on the top surface of the insert were removed by wiping with a cotton swab. Cells that migrated to the bottom surface of the insert were fixed with methanol and stained by Hoechst 33258 and

then subjected to fluorescence microscopic inspection. Cells were counted on 10 random fields at 200x magnification.

Cell adhesion assay

Cells were plated on fibronectin-, collagen I-, collagen IV- or Matrigel-coated 96-well plates (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (5×10^4 cells/well) and cultured for 30, 60 and 90 min. Non attached cells were removed by three washings with PBS. Attached cells were analyzed by MTS assay according to the user manual (Promega).

Cell growth and cell cycle analysis

For cell growth analysis, cells (5×10^4) were plated in 35 mm dish and cultured in EMEM containing 0.1% or 10% FBS. Cell numbers were evaluated every day using a cell counter (Beckman).

For cell cycle analysis, cells were trypsinized and washed twice with PBS. They were subsequently stained by Cell Cycle Coulter reagent (Beckman Coulter, Co., Fullerton, CA). Briefly, pelleted cells (1×10^6) were mixed with 50 μl of reagent A (15 s, 20 °C, under vortex agitation) and 950 μl of reagent B. After incubation for 2 h at 4°C in the dark, cell cycle was analyzed with a Beckman FACS analyzer.

Apoptosis detection and cell survival assay

Cells were stained with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 for 15 min at room temperature in the dark before fixation with cold methanol (-20°C) during 20 min. The apoptotic cells, exhibiting condensed and fragmented nuclei, were counted under a Leica fluorescence microscope in randomly selected fields. A minimum of 500-1000 cells was examined for each condition, and results were expressed as a ratio of the total number of counted cells. Cell viability was determined by MTS assay (Promega) according to the users' manual.

siRNA inhibition

siRNA oligonucleotides targeting p21^{waf1} 5'-GGACCUGUCACUGUCUUGUACCC-3' and 3'-GGGUACAAGACAGUGACAGGUCC-5', or negative control siRNA 5'-

GCUGACCCUGAAGUUCAUCTT-3' and 3'-TTCGACUGGGACUUCAAGUAG-5' were used for cell transfection by electroporation (Amaxa) according to manufacturer's instructions. Cells were then cultured for 12 h before PA induction.

Tumor xenograft growth in immunodeficient mice

Six-week-old female severe combined immunodeficient (SCID) mice were from Institut Pasteur de Lille, France. Mice were maintained under a 12 h light/dark cycle at a temperature of 20 to 22°C. Food and water were available ad libitum. Mice were maintained in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee procedures and guidelines. MDA-MB-231 cells were harvested and resuspended in PBS with 10 μ M PA or DMSO vehicle as control before subcutaneous injection into flanks (4 \times 10⁶ cells per flank) of the animals. Injection of 100 μ l PBS containing 100 μ M PA or DMSO vehicle was performed as close as possible to the tumor. The tumor volume was determined every week by measuring the length (l) and width (w) and then calculating the volume as $\pi/6 \times l \times w \times (l+w)/2$. Eight animals were used in each group.

Statistical analysis

Statistical differences were determined with two-tailed Student's t tests. All p values were two-sided. p<0.05 was considered as statistically significant.

Results

Generation of inducible p75^{NTR} overexpressing cells

To determine the functional importance of p75^{NTR} overexpression in breast cancer development, we established inducible p75^{NTR} overexpressing cells by transfecting MDA-MB-231 breast cancer cells with pVgRXR and pIND-p75^{NTR} vectors. The most responsive clone was chosen as described in materials and methods. As shown in Figure 1A and B, the levels of p75^{NTR} mRNA and protein increased in a dose-dependent manner upon ponasterone A (PA) induction. Cells induced with 10 μ M PA expressed 50-fold of p75^{NTR} compared to control. This condition was used in further experiments with

p75^{NTR} overexpression signified by “p75^{NTR+}” in the legends of the Figures. Importantly, we also showed that the overexpressed p75^{NTR} protein was successfully addressed to the cytoplasmic membrane as revealed by immunocytochemical analysis (Figure 1 C).

p75^{NTR} overexpression inhibits cell growth

The incidence of p75^{NTR} overexpression on cell behaviors was investigated in different culture conditions. No significant difference was observed between p75^{NTR} overexpressing cells and controls in terms of migration, invasion and adhesion (data not shown). When cells were cultured in serum free medium or in the presence of 1% or 10% FBS, p75^{NTR} overexpressing cells exhibited reduced growth compared to control cells (Figure 2A). However, strongest growth inhibition was observed in medium containing 1% FBS. After 4 days of culture, p75^{NTR} overexpression led to a decrease of cell growth by 50% when cells were cultured in the presence of 1% FBS (Figure 2A).

p75^{NTR} overexpression inhibits cell growth through G0/G1 blockage

In order to determine the mechanism by which p75^{NTR} inhibited breast cancer cell growth, we analyzed the distribution in cell cycle by flow cytometry. Cells were first synchronized by serum starvation for 48 h and then cultured in medium containing 10% serum (Figure 2B). Up to 12 hours after the release of synchronized cultures, the percentage of p75^{NTR} overexpressing cells in G0/G1 phase (about 85%) remained constant, while that of control cells decreased rapidly with a concomitant increase in S-G2/M phases. Twenty-four hours after the release of synchronized cultures, the percentages of cells in G0/G1 and S-G2/M phases were equivalent in both control and p75^{NTR} overexpressing cells, indicating the progression of synchronized cells in cell cycle. Of note, in both serum starvation condition (time 0 h after starvation) and 10% FBS containing medium (“FBS” column), higher percentages of cells in G0/G1 phase were observed when p75^{NTR} was overexpressed. To further verify the involvement of p75^{NTR} in the accumulation of cells in G0/G1, cells were treated with various concentrations of PA in serum-free medium for 48 h. As shown in Figure 2C, the percentages of cells in G0/G1 increased with levels of p75^{NTR}. Finally, when cells were

cultured in medium containing 1% FBS, an increase of p75^{NTR} overexpressing cells in G0/G1 phase was observed when compared to control cells (Figure 2D).

We then determined the expression of principal proteins implicated in G1-S transition by Western blot analysis. After serum starvation for 48 h, cells were cultured in medium containing 10% FBS and proteins were prepared at different times after the release of synchronized cultures. As shown in Figure 3A, p75^{NTR} overexpression was associated with a reduction of phospho-Rb, while no variation was detected for the proteins such as cyclin D1, cyclin D3, cyclin E, E2F and Rb. An important increase of p21^{waf1} protein was also found in these conditions. The up regulation of P21^{waf1} in P75^{NTR} overexpressing cells was further observed when cells were cultured in medium containing 1% FBS, while other cyclin inhibitors such as p15^{INK4B}, p16^{INK4A} and p27^{Kip1} were not modified in the same conditions (Figure 3B). Analysis by real time RT-PCR showed that after 48 h of culture in medium containing 1% FBS, p75^{NTR} overexpressing cells expressed more than 2-fold p21^{waf1} mRNA compared to control cells (Figure 3C).

p75^{NTR} overexpression promotes cell survival by inhibiting intrinsic apoptosis pathway

We have previously shown that NGF can stimulate the survival of MCF-7 breast cancer cells through p75^{NTR} (Descamps et al., 2001b; El Yazidi-Belkoura et al., 2003). Here we evaluated the role of p75^{NTR} in resistance to apoptosis induced by TRAIL after Hoechst staining (Figure 4A). For this, the number of characteristic condensed and fragmented nuclei (Figure 4B) was determined in cells expressing various levels of p75^{NTR}. As shown in Figure 4A, p75^{NTR} inhibited TRAIL-induced apoptosis in a dose-dependent manner, indicating the increased survival ability of p75^{NTR} overexpressing cells. This was further consolidated in MTS assay, as p75^{NTR} overexpression increased the survival of cells treated with TRAIL, doxorubicin and ceramide (Figure 4C). To determine the mechanism by which p75^{NTR} overexpression was able to inhibit apoptosis, we studied the expression of principal proteins implicated in apoptosis pathways by Western blot. As shown in Figure 5, p75^{NTR} overexpression inhibited TRAIL-induced cleavage of procaspase-9, pro-caspase 3, and PARP but had no effect on the cleavage of procaspase-8 and Bid induced by TRAIL. Furthermore, P75^{NTR} overexpression increased

the level of c-IAP1 protein (Figure 5). These results suggested that the enhanced survival by p75^{NTR} overexpression in MDA-MB-231 breast cancer cells implicated essentially the inhibition of intrinsic apoptotic pathway. Interestingly, a strong increase of p21^{waf1} protein was found in p75^{NTR} overexpressing cells whatever TRAIL treatment.

p21^{waf1} is involved in p75^{NTR}-induced cell growth inhibition and survival

To determine the eventual involvement of p21^{waf1} in p75^{NTR}-mediated cell growth inhibition and survival, we used p21^{waf1} siRNAs to knock down its expression in p75^{NTR} overexpressing cells (Figure 6). Western blot analysis showed that transfection with p21^{waf1} siRNA decreased the level of p21^{waf1} to that of control cells (Figure 6A and B). Cell growth inhibition by p75^{NTR} overexpression was partially restored after transfection with p21^{waf1} siRNA (Figure 6B). Moreover, p21^{waf1} siRNA abolished the reduction of TRAIL-induced apoptosis in p75^{NTR} overexpressing cells. These results indicated that p21^{waf1} was a key element in mediating the biological effects of p75^{NTR}.

p75^{NTR} overexpression results in an increased tumor growth in SCID mice

To investigate whether p75^{NTR} expression could alter the growth of breast tumors *in vivo*, we first determined the stability of p75^{NTR} after PA induction. As shown in Figure 7A, the levels of p75^{NTR} decreased with the time but still remained high 3 days after PA induction when compared to control cells. We then subcutaneously injected MDA-MB-231 cells into SCID mice and performed p75^{NTR} induction every 3 days as described in materials and methods. Tumors formed by p75^{NTR} overexpressing cells exhibited significantly higher rate of growth than tumors formed from control cells (Figure 7B).

Discussion

We have previously shown that NGF can enhance the survival of breast cancer cells *via* p75^{NTR} (Adriaenssens et al., 2008; Dolle et al., 2003). However, as in many other models, the exact implication of p75^{NTR} in breast cancer development and its mechanism of action were not clearly established. The commonly used breast cancer cell lines express relatively low levels of p75^{NTR} compared to tumor biopsies (Descamps et al., 2001a), to further investigate the role of p75^{NTR} in breast cancer cell growth, we established a model of inducible expression of p75^{NTR} in MDA-MB-231 breast cancer cells. We first showed that p75^{NTR} overexpression did not affect cell adhesion, migration or invasion but significantly reduced cell growth *in vitro*. Moreover, the growth inhibition was due to cell arrest in G0/G1 phase with an increase of p21^{waf1} and a decrease of Rb phosphorylation. In contrast, either cyclin proteins or other cyclin inhibitors such as p15^{INK4B}, p16^{INK4A} and p27^{Kip1} were modified after p75^{NTR} overexpression. The p21^{waf1} protein is a well known cyclin/CDK inhibitor; it inhibits cell progression from G1 to S phase by inhibiting cyclin/CDK activities and thereby maintains the hypophosphorylated repressor state of Rb. Moreover, P21^{waf1} can also associate with transcription factors such as E2F or c-Myc to suppress cell cycle progression (Delavaine and La Thangue, 1999; Gartel and Shchors, 2003).

The anti-proliferative effect of p75^{NTR} has been described in several types of cancer cells such as that of prostate (Khwaja et al., 2004), bladder ((Jin et al., 2007; Khwaja et al., 2004; Tabassum et al., 2003; Yuanlong et al., 2008), stomach (Jin et al., 2007) and liver (He et al., 2008). In these cancers, p75^{NTR} is often absent or significantly decreased compared with their normal counterparts. Overexpression of p75^{NTR} induces a blockage of cells in G0/G1 phase with a concomitant decrease of cyclins, cyclin-dependent kinase 2, phospho-Rb and an increase of CDK inhibitors such as p27^{Kip1} or p16^{ink4}, depending on cell types. One explanation of the differences observed by us and others in the modification of cell cycle control molecules may be the specific cell context.

In accordance with our previous work showing that p75^{NTR} enhances the survival of MCF-7 breast cancer cells upon NGF stimulation (Descamps et al., 2001b; El Yazidi-Belkoura et al., 2003), we found here that p75^{NTR} overexpression *per se* enhanced the survival of MDA-MB-231 breast cancer cells. This pro-survival effect was associated

with an increase of p21^{waf1} and c-IAP1, and a decrease of TRAIL-induced cleavage of PARP, pro-caspase 3 and pro-caspase 9. No modification was observed on the cleavage of pro-caspase 8 or Bid induced by TRAIL. These results suggested that p75^{NTR}-enhanced survival was principally mediated by the inhibition of the intrinsic mitochondrial pathway. This inhibition could be mediated by p21^{waf1} protein as it is largely described that p21^{waf1} not only inhibits cell cycle progression but can also regulate apoptosis according to cell context (Coqueret, 2003). For example, cytoplasmic p21^{waf1} can complex and inhibit apoptosis signal-regulated kinase 1 (ASK1) (Asada et al., 1999) which is known to activate mitochondrial apoptotic pathway (Zu et al., 2005). p21^{waf1} is also reported to interact with pro-caspase 3 to prevent its activation and Fas-induced apoptosis (Suzuki et al., 1999). Moreover, p21^{waf1} can also prevent apoptosis by binding and inhibition of p34cdc-2/CDK-1, which plays an important role in apoptosis induced by Taxol or docetaxel in breast and prostate cancer cells (Shen et al., 1998).

We then decided to determine the potential role of p21^{waf1} in the dual anti-proliferative and pro-survival function of p75^{NTR} in breast cancer cells using siRNA against p21^{waf1}. We observed that the reduction of p21^{waf1} level in p75^{NTR} overexpressing cells to that of control cells largely rescued the formers from p75^{NTR} overexpression-induced cell growth inhibition and survival. This indicated that p21^{waf1} up-regulation was a key element in mediating the both biological effects of p75^{NTR}. Further studies are required to determine the precise mechanism by which p21^{waf1} expression is increased upon p75^{NTR} overexpression. Moreover, the involvement of other proteins is not excluded as siRNA against p21^{waf1} did not totally restore cell growth compared to control cells. Consistent with our findings, it has been reported that the expression of unliganded ER-alpha inhibits MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell growth through up-regulation of p21^{waf1} (Maynadier et al., 2008). Similarly, Fortino et al. have shown that phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) can enhance the survival but reduce the proliferation of MCF-7 breast cancer cells *via* p21^{waf1} (Fortino et al., 2008).

Significantly, in spite of the dual anti-proliferative and pro-survival effects *in vitro*, we observed that p75^{NTR} overexpression enhanced tumor growth in SCID mice. This indicated that in the *in vivo* context, the pro-survival effect of p75^{NTR} might dominate the anti-proliferative action. This is not surprising since it has been found that p21^{waf1}-

deficient colon tumor cells were more sensitive to radiation in a xenograft model, while no differences in the clonogenic survival were observed *in vitro* (Wouters et al., 1997). In support of the tumor-promoting role of p21^{waf1}, increased p21^{waf1} expression has been linked to poorer prognosis in breast cancer (Winters et al., 2003; Yang et al., 2003). Moreover, p21^{waf1} overexpression has been reported to be an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia (Biankin et al., 2001).

In conclusion, we have shown for the first time that a dual function of p75^{NTR} co-exists in the same cell type, *i.e.* inhibition of cell growth and stimulation of cell survival. The both effects are under the control of p21^{waf1}. However, more basic studies are needed to understand the mechanism linking p75^{NTR} and p21^{waf1} upregulation. Our results showing that p75^{NTR} overexpression increased breast tumour growth together, with our previous data (Adriaenssens et al., 2008; Lagadec et al., 2009), emphasize the role of NGF and its two receptors p75^{NTR} and TrkA in breast tumor development.

Acknowledgements

Grant support: INSERM, la "Ligue Nationale Contre le Cancer" (Equipe labellisée 2009), le Ministère de l'Education Nationale.

References

Adriaenssens, E., Vanhecke, E., Saule, P., Mougel, A., Page, A., Romon, R., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., and Hondermarck, H. (2008). Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 68, 346-351.

Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K., and Mizutani, S. (1999). Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *Embo J* 18, 1223-1234.

Biankin, A. V., Kench, J. G., Morey, A. L., Lee, C. S., Biankin, S. A., Head, D. R., Hugh, T. B., Henshall, S. M., and Sutherland, R. L. (2001). Overexpression of p21(WAF1/CIP1) is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* 61, 8830-8837.

Chiarenza, A., Lazarovici, P., Lempereur, L., Cantarella, G., Bianchi, A., and Bernardini, R. (2001). Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* 61, 3002-3008.

Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 13, 65-70.

Delavaine, L., and La Thangue, N. B. (1999). Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene* 18, 5381-5392.

Descamps, S., Pawlowski, V., Revillion, F., Hornez, L., Hebbar, M., Boilly, B., Hondermarck, H., and Peyrat, J. P. (2001a). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res* 61, 4337-4340.

Descamps, S., Toillon, R. A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S. M., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J. P., and Hondermarck, H. (2001b). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 276, 17864-17870.

Dolle, L., El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Nurcombe, V., and Hondermarck, H. (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 22, 5592-5601.

El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Dolle, L., Descamps, S., and Hondermarck, H. (2003). Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells. *J Biol Chem* 278, 16952-16956.

Fortino, V., Torricelli, C., Capurro, E., Sacchi, G., Valacchi, G., and Maioli, E. (2008). Antiproliferative and survival properties of PMA in MCF-7 breast cancer cell. *Cancer Invest* 26, 13-21.

Gartel, A. L., and Shchors, K. (2003). Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* 283, 17-21.

Hempstead, B. L. (2006). Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. *Curr Alzheimer Res* 3, 19-24.

He Y., Jin H., Zhang X., Song J., Liu J., Yan L., Xie H., Song J., Pan Y., Wu K., Ding J., and Fan D. (2008). The inhibitory effect of p75 neurotrophin receptor on growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 268, 110-119.

Jin, H., Pan, Y., Zhao, L., Zhai, H., Li, X., Sun, L., He, L., Chen, Y., Hong, L., Du, Y., and Fan, D. (2007). p75 neurotrophin receptor suppresses the proliferation of human gastric cancer cells. *Neoplasia* 9, 471-478.

Khwaja, F., Allen, J., Lynch, J., Andrews, P., and Djakiew, D. (2004). Ibuprofen inhibits survival of bladder cancer cells by induced expression of the p75NTR tumor suppressor protein. *Cancer Res* 64, 6207-6213.

Khwaja, F., and Djakiew, D. (2003). Inhibition of cell-cycle effectors of proliferation in bladder tumor epithelial cells by the p75NTR tumor suppressor. *Mol Carcinog* 36, 153-160.

Khwaja, F., Tabassum, A., Allen, J., and Djakiew, D. (2006). The p75(NTR) tumor suppressor induces cell cycle arrest facilitating caspase mediated apoptosis in prostate tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 1184-1192.

Lagadec C., Meignan S., Adriaenssens E., Foveau B., Vanhecke E., Romon R., Toillon R-A., Oxombre B., Hondermarck H., Le Bourhis X. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene*

Liepinsh, E., Ilag, L. L., Otting, G., and Ibanez, C. F. (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *Embo J* 16, 4999-5005.

Marchetti, D., Aucoin, R., Blust, J., Murry, B., and Greiter-Wilke, A. (2004). p75 neurotrophin receptor functions as a survival receptor in brain-metastatic melanoma cells. *J Cell Biochem* 91, 206-215.

Maynadier, M., Ramirez, J. M., Cathiard, A. M., Platet, N., Gras, D., Gleizes, M., Sheikh, M. S., Nirde, P., and Garcia, M. (2008). Unliganded estrogen receptor alpha inhibits breast cancer cell growth through interaction with a cyclin-dependent kinase inhibitor (p21(WAF1)). *Faseb J* 22, 671-681.

Menter, D. G., Herrmann, J. L., Marchetti, D., and Nicolson, G. L. (1994). Involvement of neurotrophins and growth factors in brain metastasis formation. *Invasion Metastasis* 14, 372-384.

Nykjaer, A., Willnow, T. E., and Petersen, C. M. (2005). p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 15, 49-57.

Rocha, A. S., Risberg, B., Magalhaes, J., Trovisco, V., de Castro, I. V., Lazarovici, P., Soares, P., Davidson, B., and Sobrinho-Simoes, M. (2006). The p75 neurotrophin receptor is widely expressed in conventional papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 37, 562-568.

Shen, S. C., Huang, T. S., Jee, S. H., and Kuo, M. L. (1998). Taxol-induced p34cdc2 kinase activation and apoptosis inhibited by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human breast MCF-7 carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 9, 23-29.

Suzuki, A., Tsutomi, Y., Yamamoto, N., Shibutani, T., and Akahane, K. (1999). Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. *Mol Cell Biol* 19, 3842-3847.

Tabassum, A., Khwaja, F., and Djakiew, D. (2003). The p75(NTR) tumor suppressor induces caspase-mediated apoptosis in bladder tumor cells. *Int J Cancer* 105, 47-52.

Tagliabue, E., Castiglioni, F., Ghirelli, C., Modugno, M., Asnaghi, L., Somenzi, G., Melani, C., and Menard, S. (2000). Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 275, 5388-5394.

Truzzi, F., Marconi, A., Lotti, R., Dallaglio, K., French, L. E., Hempstead, B. L., and Pincelli, C. (2008). Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* 128, 2031-2040.

Winters, Z. E., Leek, R. D., Bradburn, M. J., Norbury, C. J., and Harris, A. L. (2003). Cytoplasmic p21WAF1/CIP1 expression is correlated with HER-2/ neu in breast cancer and is an independent predictor of prognosis. *Breast Cancer Res* 5, R242-249.

Wouters, B. G., Giaccia, A. J., Denko, N. C., and Brown, J. M. (1997). Loss of p21Waf1/Cip1 sensitizes tumors to radiation by an apoptosis-independent mechanism. *Cancer Res* 57, 4703-4706.

Yang, W., Klos, K. S., Zhou, X., Yao, J., Yang, Y., Smith, T. L., Shi, D., and Yu, D. (2003). ErbB2 overexpression in human breast carcinoma is correlated with p21Cip1 up-regulation and tyrosine-15 hyperphosphorylation of p34Cdc2: poor responsiveness to chemotherapy with cyclophosphamide methotrexate, and 5-fluorouracil is associated with Erb2 overexpression and with p21Cip1 overexpression. *Cancer* 98, 1123-1130.

Zu, K., Hawthorn, L., and Ip, C. (2005). Up-regulation of c-Jun-NH2-kinase pathway contributes to the induction of mitochondria-mediated apoptosis by alpha-tocopheryl succinate in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 4, 43-50.

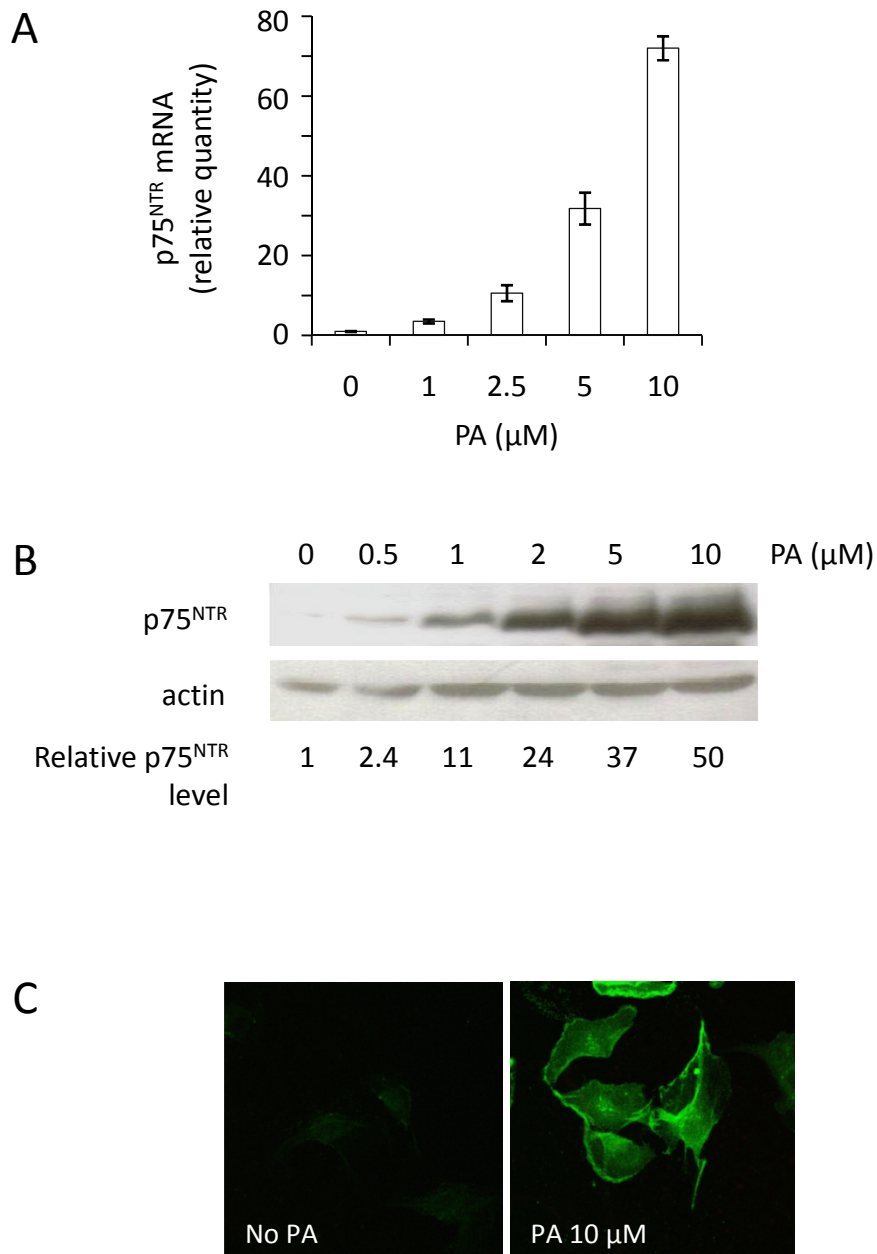


Figure 1 Establishment of inducible p75^{NTR} overexpressing clone. MDA-MB-231 breast cancer cells were first transfected with pVGRXR and then with pIND containing the full length sequence of p75^{NTR} cDNA as described in materials and methods. The clone presenting the highest responsiveness to ponasteron A (PA) was chosen for further study. **(A)** Real time RT-PCR quantification of p75^{NTR} mRNA. Total RNA from the selected clone treated with various concentrations of PA was isolated and reverse-transcribed. Levels of p75^{NTR} mRNA were expressed as relative quantities compared to that expressed by cells not treated with PA (considered as 1). **(B)** Western blot analysis of p75^{NTR} protein. Cells were cultured with or without 10 μM PA for 24 h. The relative p75^{NTR} protein levels were quantified using NIS-Elements BR software (Nikon). **(C)** p75^{NTR} immunostaining of cells treated or not with 10 μM PA for 24 h.

A

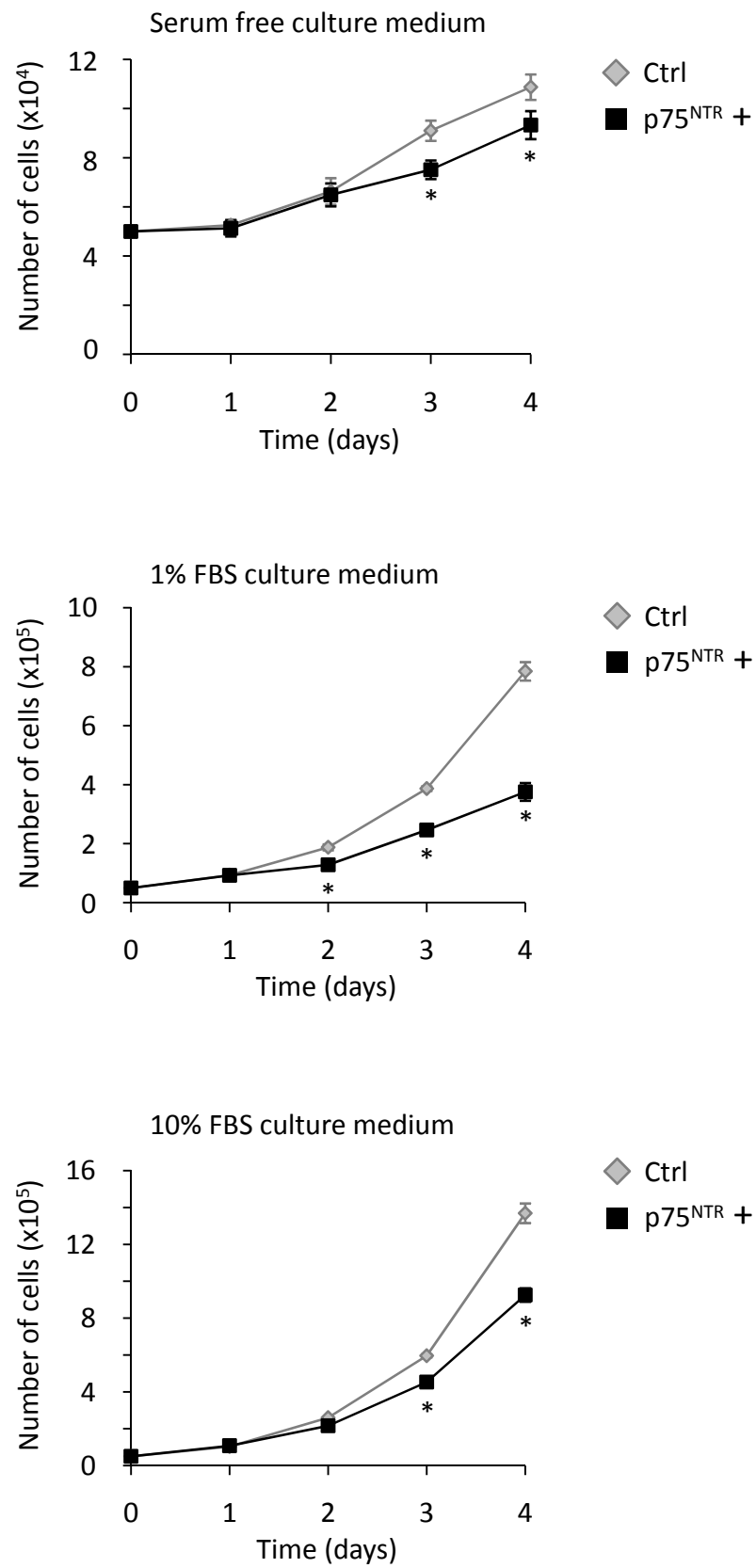


Figure 2

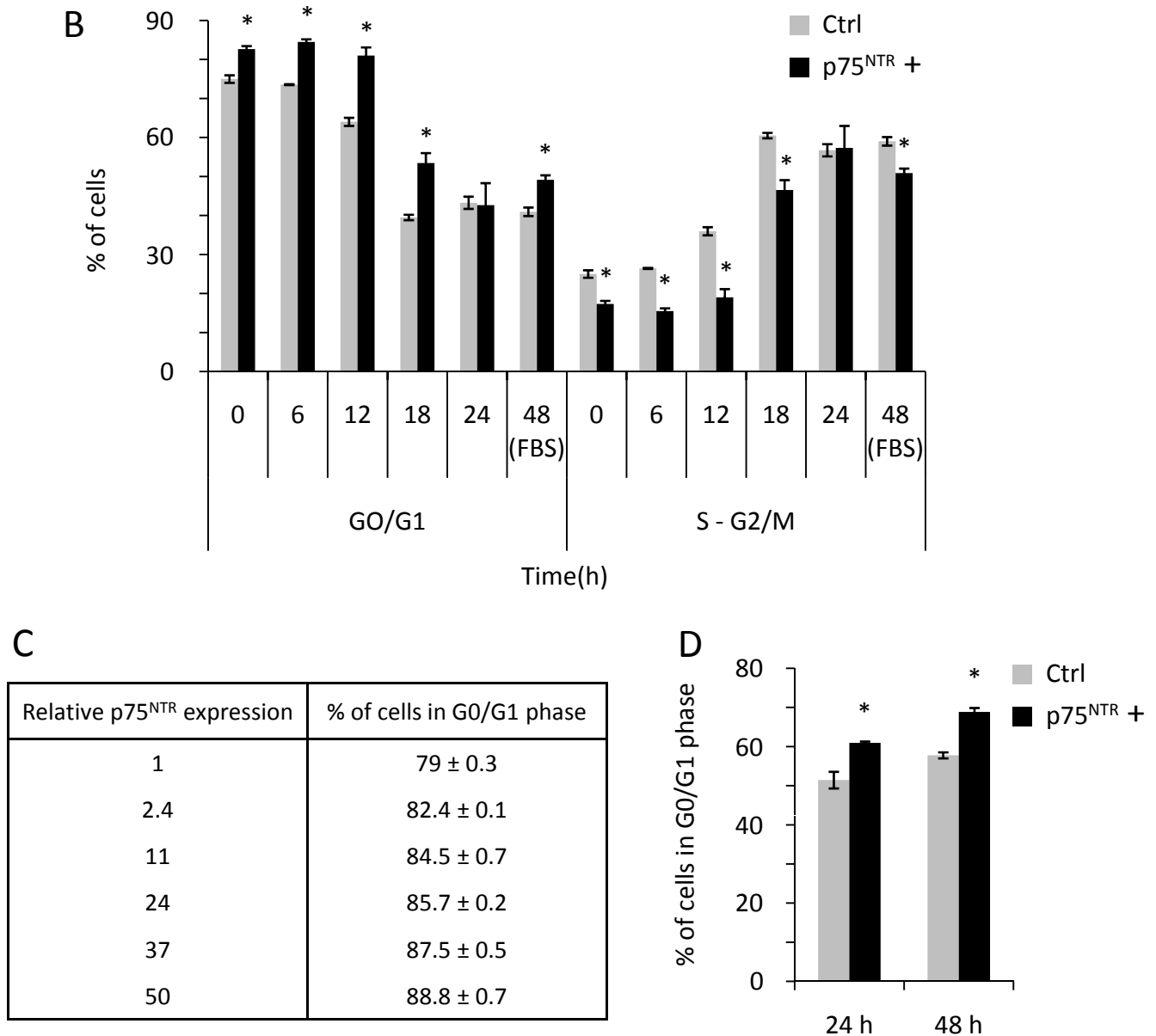


Figure 2 Effects of p75^{NTR} overexpression on cell growth in vitro. (A) Effect of p75^{NTR} overexpression on cell growth. Cells were cultured in medium containing 0, 1 or 10% of FBS. p75^{NTR} overexpression (p75^{NTR+}) was realized after induction with 10 μ M PA. Cell number was determined by cell counting. Results were the mean of 3 independent experiments each in triplicate. *p<0.01, p75^{NTR+} versus control cells. (B) Effect of p75^{NTR} overexpression on cell cycle progression. Cells were first cultured with or without 10 μ M PA for 24 h in complete medium which was then replaced by free serum medium with or without PA for another 48 h. Starvation medium was then replaced by a 10% FBS medium and cells were cultured for further 24 h. The percentage of cells in cell cycle phases was determined by flow cytometry analysis. The condition “FBS” was used as a control without step of serum starvation. Results were representative of 3 independent experiments. *p<0.01, p75^{NTR+} versus control cells. (C) G0/G1 phase arrest of cells overexpressing various levels of p75^{NTR}. Cells were cultured in serum free medium with or without 10 μ M PA for 48 h. (D) G0/G1 phase arrest of cells cultured in medium containing 1% FBS. Cells were cultured in 1% FBS medium with (Ctrl) or without 10 μ M PA (p75^{NTR+}) for 24 or 48 h. Results were the mean of 3 independent experiments each in triplicate. *p<0.01, p75^{NTR+} versus control cells.

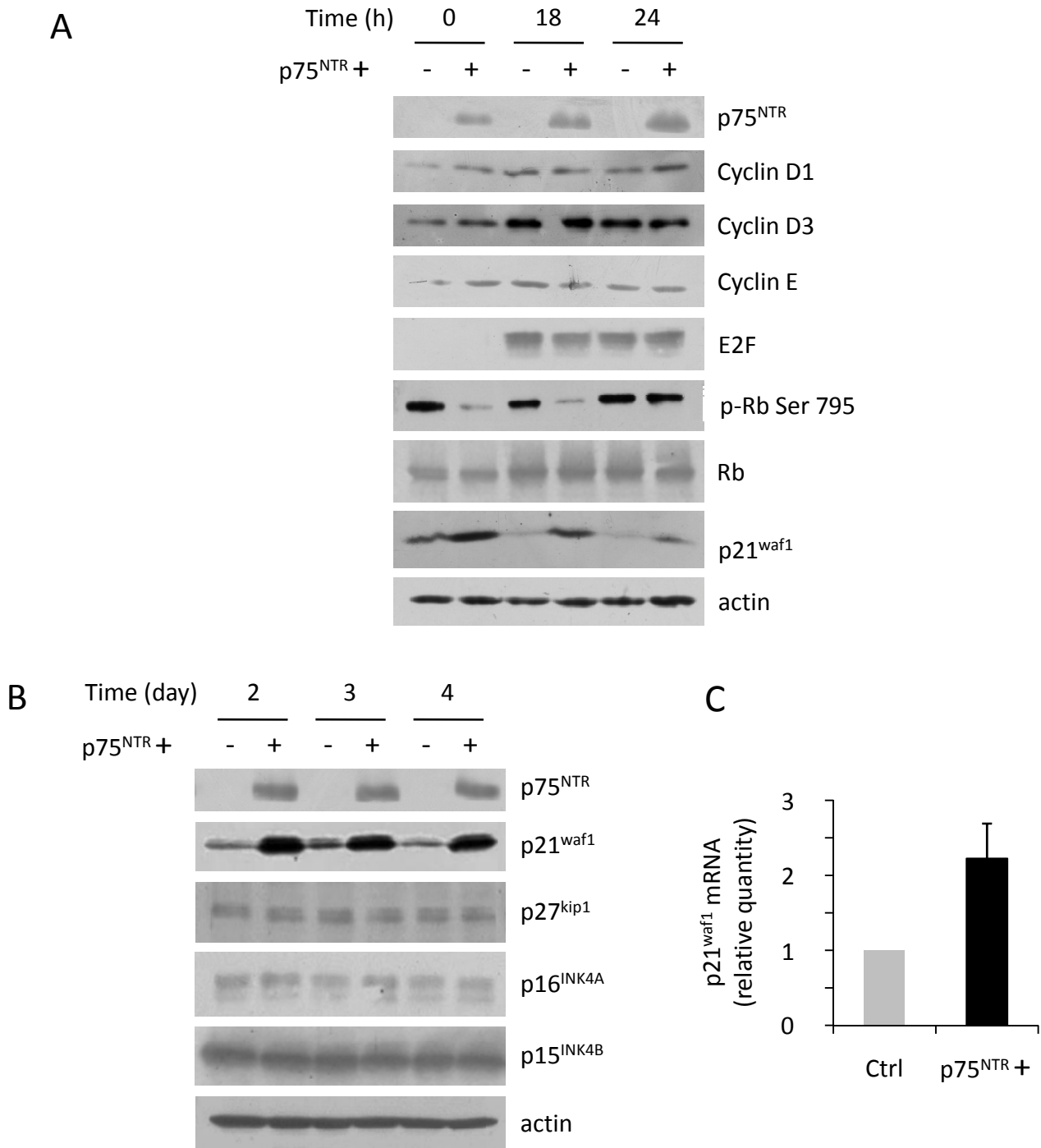


Figure 3. Effects of p75^{NTR} overexpression on cell cycle regulators. (A) Western blot analysis of proteins from cells cultured after the release of synchronized cultures. Cells were treated with 10 μ M PA for 24 h (p75^{NTR}+) in complete medium containing 10% FBS and then cultured serum-free medium for the synchronization with or without PA. Forty-eight hours later, the serum-free medium was replaced by the complete medium for 18 h or 24 h. Results were from one experiment representative of three independent experiments. (B) Western blot analysis of proteins from cells cultured in medium containing 1% FBS. Cells were cultured in medium containing 1% FBS with or without 10 μ M PA (p75^{NTR}+) for 2 to 4 days. Results were from one experiment representative of two independent experiments. (C) Real time RT-PCR quantification of p21^{waf1} mRNA. Cells were cultured in medium containing 1% FBS with or without 10 μ M PA (p75^{NTR}+) for 48 h. The results were expressed as relative quantities compared to the control cells (considered as 1). Results were from one experiment representative of three independent experiments.

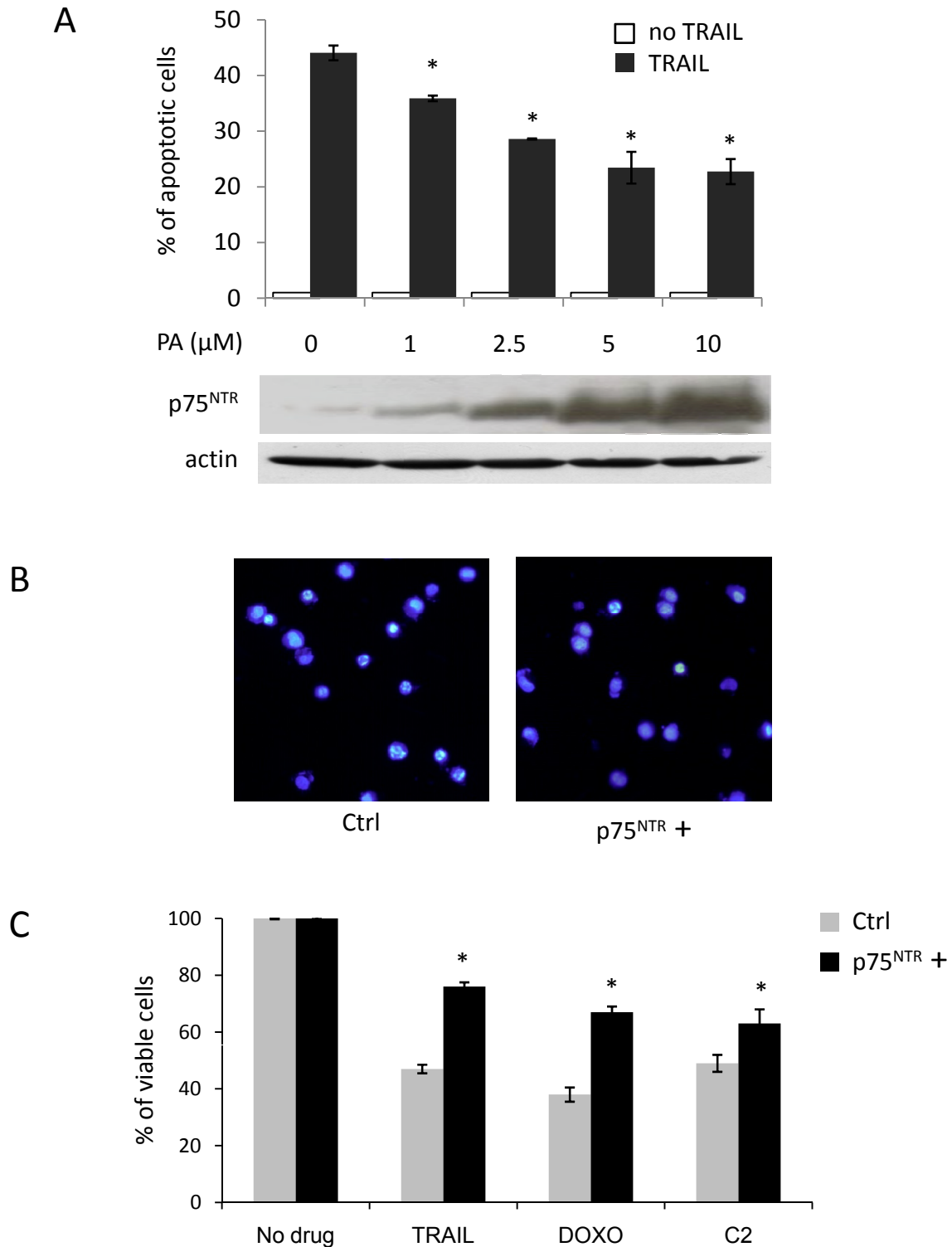


Figure 4. Effect of $p75^{NTR}$ overexpression on apoptosis induced by TRAIL. (A) $p75^{NTR}$ inhibited TRAIL-induced apoptosis in a dose-dependent manner. Cells were induced with various concentrations of PA for 24 h and then treated with 5 ng/ml TRAIL for 6 h. Apoptotic nuclei were counted after Hoechst staining under a fluorescence microscope. Results were the mean of at least 3 independent experiments each in triplicate. (B) Hoechst staining of cells treated as described above. Apoptotic nuclei appear condensed or fragmented. (C) $p75^{NTR}$ overexpression increased the survival of cells to different apoptogens. Cells were induced with 10 μ M PA for 24 h and then treated with 1 ng/ml TRAIL, 10 μ M Doxorubicin (Doxo), or 20 μ M Ceramide 2 (C2) for another 24 h. Cell survival was determined by MTT assay (8 wells per condition). Results were from one experiment representative of 2 independent experiments.

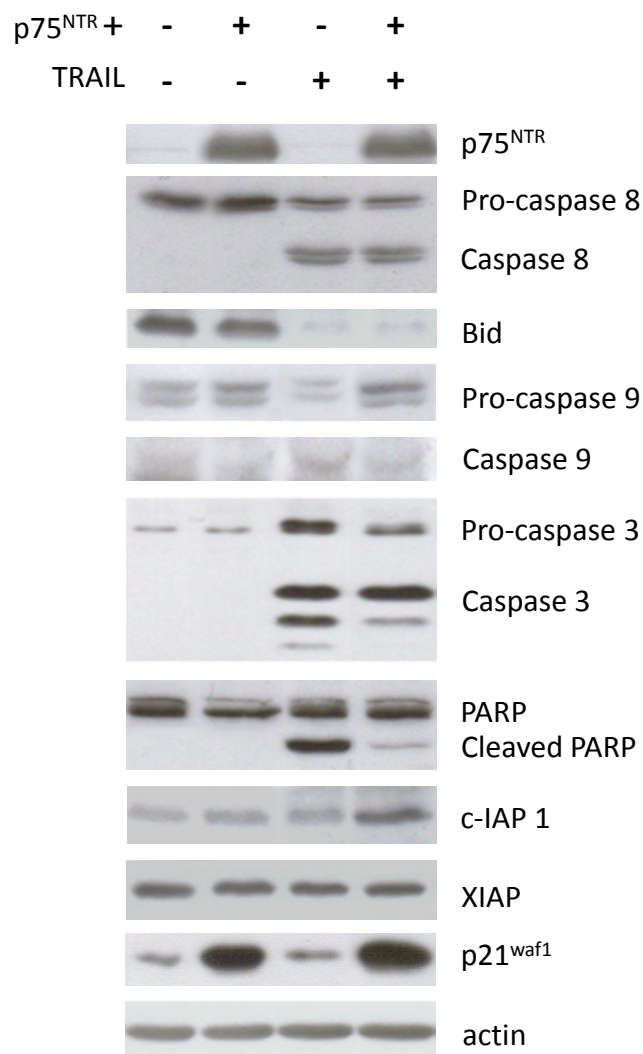


Figure 5. Effects of p75^{NTR} overexpression on apoptosis regulators. Cells were induced with PA for 24 h (p75^{NTR}+). Cells were then treated with 5 ng/ml TRAIL for another 6 h before the extraction of proteins. The levels of different molecules involved in apoptosis induction were analyzed by Western blot. Results were from one experiment representative of two independent experiments.

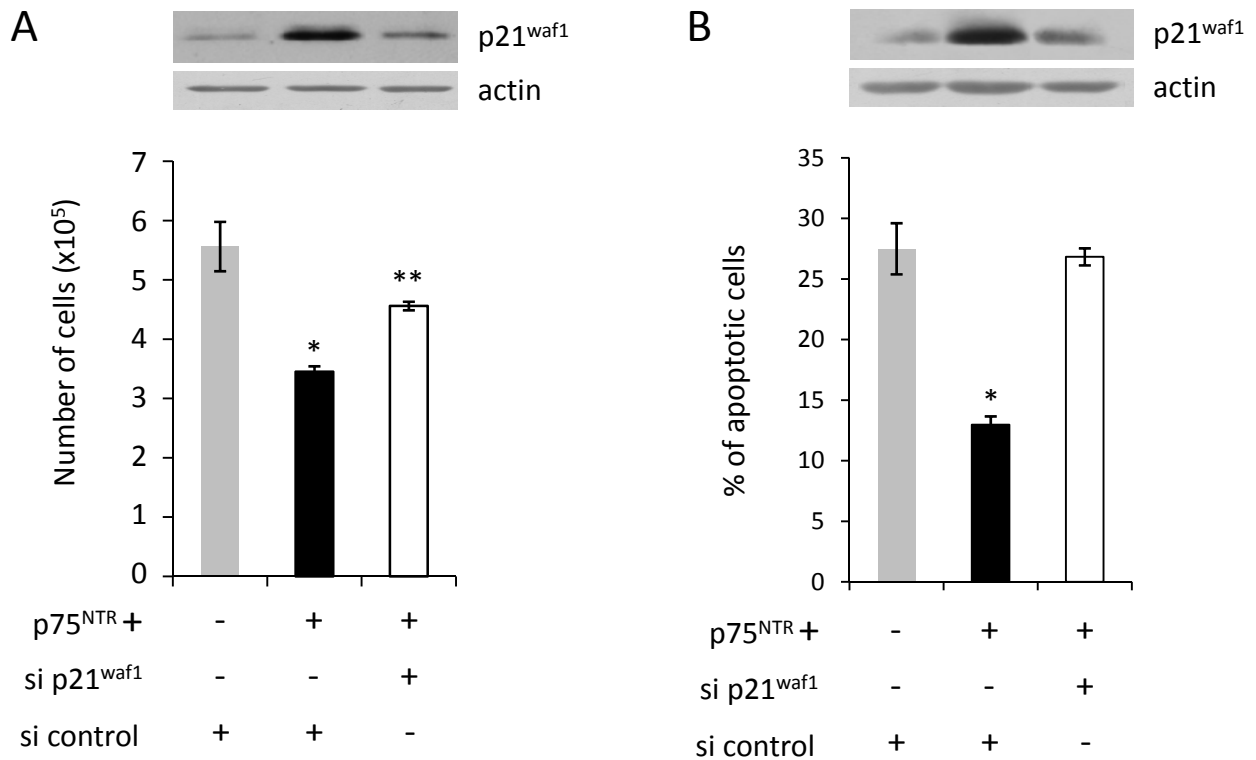


Figure 6. Effects of sip21^{waf1} on p75^{NTR}-induced cell growth inhibition and survival. (A) Cell growth assay. Cells were transfected with 3 μ M siRNA p21^{waf1} or with siRNA control and cultured in medium containing 10% FBS for 24 h, cells were then rinsed and cultured in medium containing 1% of FBS with or without 10 μ M PA (p75^{NTR}) for another 3 days. *p<0.01, **p<0.05, p75^{NTR}+ versus control. (B) Cell survival assay. Cells were transfected with 3 μ M siRNA p21^{waf1} or with siRNA control and cultured in medium containing 10% FBS for 24 h, cells were then cultured with or without 10 μ M PA for another 24 h in serum-free medium and further treated with 5 ng/ml TRAIL for 6 h. TRAIL-induced apoptotic nuclei are counted after Hoechst staining under a fluorescence microscope. *p<0.01, p75^{NTR}+ versus control.

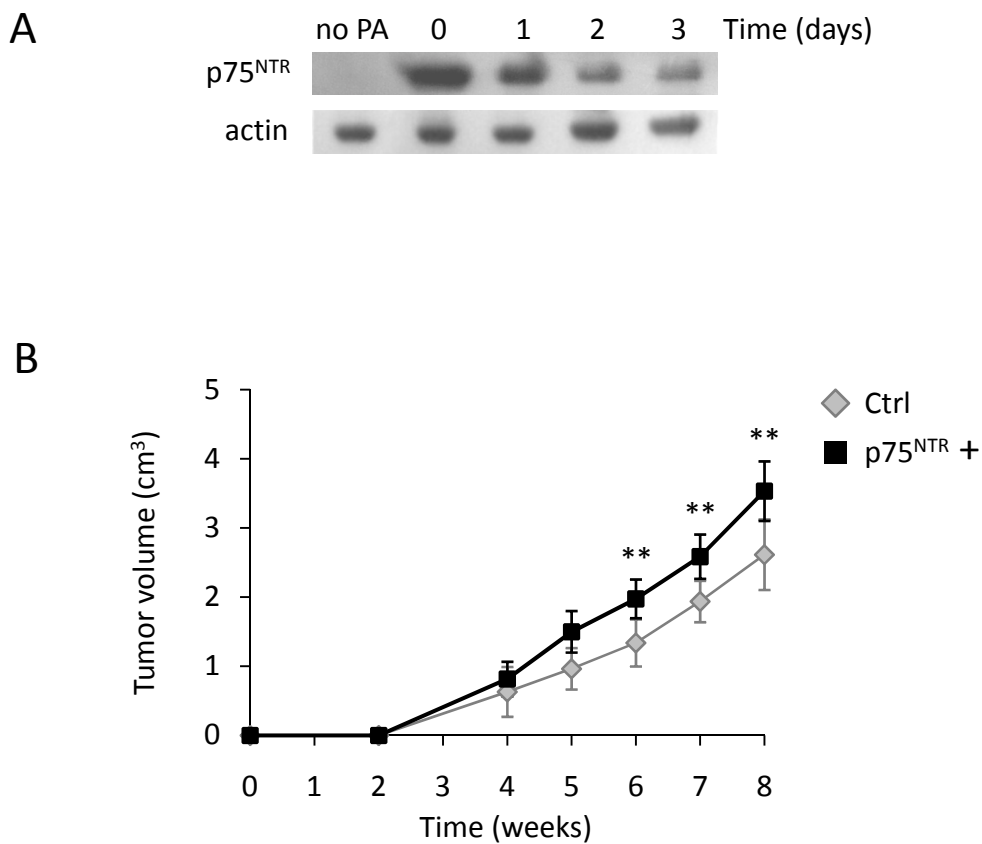


Figure 7. Effects of p75^{NTR} overexpression on tumor growth in SCID mice.

(A) Evaluation of overexpressed p75^{NTR} protein stability. Cells were treated with 10 μ M PA for 24 h and then cultured without PA for 0 to 3 days. The “no PA” condition shows the endogenous p75^{NTR} protein level. The levels of 75^{NTR} protein were evaluated by Western blot. (B) Three days after subcutaneous injection of p75^{NTR} inducible MDA-MB-231 cells, PA (suspended in 100 μ l of PBS with a final concentration of 10 μ M) or DMSO vehicle were injected as close as possible to the tumor site. Treatments were repeated every 3 days until animal sacrifice at week 8. Eight animals were used for each group and student’s t test was performed between control group and PA group. **p<0.05, p75^{NTR}+ versus control.

CHAPITRE 4: DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Au-delà de l'effet global du NGF précédemment décrit sur les cellules de cancer du sein, je me suis appliqué, à travers mes travaux de thèse, à préciser le rôle de chacun de ces récepteurs et l'impact de leur surexpression dans le cancer du sein. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur le modèle de cellules de cancer du sein MDA-MB-231 largement caractérisé et utilisé dans divers travaux. Ces cellules, issues d'une effusion pleurale, présentent en outre l'avantage d'exprimer un phénotype cancéreux fort et étendu tel qu'une grande capacité à proliférer, à résister à certains apoptogènes et à migrer (Cailleau et al., 1974a; Cailleau et al., 1974b; Garcia et al., 1992). De plus, injectées à des souris immunodéficientes nude, ces cellules sont capables de former des adénocarcinomes peu différenciés de grade III. Les MDA-MB-231, sont à ce titre considérées comme des cellules prototypiques hormono-insensibles de la maladie (Price et al., 1990). Or, ces cellules, bien qu'agressives, n'expriment que faiblement, comparativement aux échantillons tumoraux, les récepteurs du NGF pourtant tumorigènes dans le cancer du sein (Adriaenssens et al., 2008). Ce modèle de choix nous a ainsi permis d'étudier le rôle de TrkA et p75^{NTR} par une stratégie de surexpression de chacun des récepteurs et l'analyse systématique des effets produits.

I. Pouvoir pro-tumoral de TrkA et de p75^{NTR} dans le cancer du sein

Les travaux entamés au sein du laboratoire ont permis d'établir que malgré l'agressivité pré-existante des MDA-MB-231, la surexpression de TrkA augmente encore davantage le phénotype agressif de ces cellules. Ainsi, les cellules surexprimant TrkA présentent une croissance accrue tout comme leur migration et leur invasion, elles sont également plus résistantes à l'induction de l'apoptose par des agents chimiothérapeutiques (C2, doxorubicine, 5-Fluorouracile) ou des cytokines telles que TRAIL. De plus, nos études *in vivo* chez les souris SCID montrent que les cellules surexprimant TrkA forment des tumeurs plus rapidement. La croissance accrue des tumeurs primaires est associée à une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses et à une augmentation de l'angiogenèse tumorale. Ces effets de TrkA, bien qu'observés dans d'autres cancers (tels que les mélanomes, les cancers thyroïdiens et pancréatiques), sont ici décrits pour la première fois dans le cancer du sein où TrkA représente ainsi un facteur tumorigène potentiel important.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

De manière intéressante, la surexpression de TrkA dans le cancer du sein provoque un effet plus rarement observé qui est une survie importante des cellules à l'anoïkis. Cette forme d'apoptose par perte d'adhérence est un cap important à surmonter pour permettre à la cellule de métastaser *via* la circulation sanguine et lymphatique. En ce sens, mes investigations *in vivo* montrent que les cellules surexprimant TrkA développent des sites de métastases plus nombreuses au niveau des poumons, du foie et du cerveau. Bien que la surexpression de TrkA active aussi la migration et l'invasion des cellules, phénomènes également importants dans le processus métastatique, la corrélation entre la résistance à l'anoïkis et le pouvoir métastatique des cellules est soutenue par le fait que les cellules issues de métastases pulmonaires soient plus résistantes à l'anoïkis que celles initialement injectées. De plus, les expériences de métastase provoquée, par injection des cellules directement dans la veine de la queue de souris, mimant les étapes finales du processus métastatique, confirme l'effet de la surexpression de TrkA sur la métastase *via* la survie des cellules dans la circulation sanguine.

Ensemble, nos résultats montrent clairement que TrkA est impliqué dans l'augmentation de l'agressivité des cellules tumorales de sein, et ce en accord avec les observations de Davidson et ses collaborateurs (Davidson et al. 2004). Leurs résultats montrent la présence plus fréquente de la forme active de TrkA (Phospho-TrkA) dans les effusions et les récurrences locorégionales que dans les sites primaires, suggérant que l'activation de TrkA est associée à un caractère tumoral plus agressif. Ici, nous montrons également pour la première fois l'effet pro-métastatique du récepteur TrkA dans le cancer du sein.

De façon complémentaire, nous avons mené une stratégie comparable de surexpression de p75^{NTR} qui a montré que celle-ci n'induit pas d'effet sur la migration et l'invasion des cellules de cancer du sein, contrairement à TrkA. Par contre, en accord avec les travaux précédemment réalisés dans notre laboratoire sur la lignée MCF-7 et attribuant à p75^{NTR} l'effet de survie induit par le NGF (Descamps et al., 2001b), j'ai observé que la surexpression de ce récepteur augmente considérablement la résistance des cellules aux apoptogènes (doxorubicine, TRAIL). Cette résistance des cellules passe par une inhibition du clivage de PARP et des caspases 3 et 9 et par

DISCUSSION & PERSPECTIVES

une augmentation du niveau de c-IAP1, sans influencer sur le clivage de la caspase 8 ni le niveau de Bid, suggérant une inhibition de la voie intrinsèque (ou mitochondriale) de l'apoptose.

De façon surprenante, la surexpression de p75^{NTR} s'accompagne également d'une réduction significative de la croissance des cellules *in vitro*. Cet effet, observé dans de nombreuses autres lignées cellulaires de cancer, diffère avec l'effet prolifératif du NGF décrit dans le cancer du sein, même si celui-ci est attribué à l'activation de TrkA (Descamps et al., 2001b). Ainsi, la surexpression de p75^{NTR} provoque un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 comme observé dans les cancers gastriques, hépatiques, prostatiques et les cancers de la vessie. Dans ces cancers, la surexpression de p75^{NTR} se traduit généralement par la régulation négative du niveau des cyclines A, D1 et E, et une augmentation du niveau de Rb et d'inhibiteurs du cycle comme p16^{INK4A} et p27^{kip1} (Jin et al., 2007; Khwaja and Djakiew, 2003; Khwaja et al., 2006; Yuanlong et al., 2008). Dans le cancer du sein, nous montrons que la surexpression de p75^{NTR} ne modifie pas l'expression des cyclines ni de Rb. Dans notre modèle, nous observons une augmentation du niveau de la protéine p21^{waf1} accompagnée d'une baisse de la phosphorylation de Rb en accord avec le ralentissement du cycle induit par la surexpression de p75^{NTR}. P21^{waf1} est un inhibiteur connu du cycle cellulaire et il a été décrit dans le système nerveux que la stimulation par le NGF induit une augmentation du niveau protéique de p21^{waf1} (Diolaiti et al., 2007). Nos travaux montrent que l'inhibition de p21^{waf1} abolit le retard de croissance induit par la surexpression de p75^{NTR}, prouvant ainsi le rôle clef de p21^{waf1} dans ce phénomène. De façon intéressante, l'inhibition de p21^{waf1} provoque également la perte de l'effet de survie induit par p75^{NTR} liant ainsi les effets de survie et d'arrêt du cycle en apparence opposés. Bien que surtout connu comme inhibiteur du cycle cellulaire, p21^{waf1} peut également agir comme un modulateur de l'apoptose selon le contexte (Gartel and Tyner, 2002) et sa compartimentation cellulaire (Coqueret, 2003). Dans le cytoplasme, p21^{waf1} peut se complexer à, et inhiber ASK1 (apoptosis signal-regulated kinase 1) (Asada et al., 1999) qui mène à la voie apoptotique mitochondriale. En outre, sur la mitochondrie, p21^{waf1} interagit avec la pro-caspase 3 et empêche ainsi son activation et l'apoptose induite par Fas (Suzuki et al., 1999). Enfin, p21^{waf1} peut également empêcher l'apoptose en se liant et en inhibant la p34cdc-2/CDK-1, qui

DISCUSSION & PERSPECTIVES

joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose par le Taxol dans le cancer du sein (Shen et al., 1998) ou par le docétaxel dans le cancer de la prostate (Canfield et al., 2006).

Ainsi, p21^{waf1} est capable d'induire à la fois la survie des cellules et la diminution de leur croissance par blocage du cycle, et pourrait donc être l'effecteur « clef » des effets de la surexpression de p75^{NTR}. Cette hypothèse est compatible avec une étude récente menée dans les cellules de cancer du sein MCF-7 où l'augmentation du niveau de p21^{waf1} est associée à une augmentation de la survie cellulaire et une diminution de la croissance (Fortino et al., 2008). Cependant, la voie de signalisation liant p75^{NTR} à la régulation transcriptionnelle de p21^{waf1} reste inconnue puisque des expériences d'inhibition menées au laboratoire ont montré que la voie NFκB, classiquement activée par ce récepteur n'est pas nécessaire à l'action de la surexpression de p75^{NTR}.

II. Mécanismes moléculaires mis en jeu

A/ Activation constitutive des récepteurs surexprimés

Au cours de ces travaux, que ce soit dans le cas de la surexpression de TrkA ou de celle de p75^{NTR}, nous avons pu observer des effets biologiques forts et ce en l'absence de traitement avec du NGF exogène suggérant une activation « spontanée » des récepteurs surexprimés. En effet, la surexpression de TrkA induit une augmentation de phospho-TrkA et une activation constitutive des voies de signalisation PI3K/Akt, ERK/p38 MAPK. Cette activation de TrkA peut s'expliquer par la présence de NGF sécrété par les cellules elles-mêmes, mais aussi par le simple fait de la surexpression du récepteur. En effet, il a été montré qu'il existe une boucle d'activation autocrine du NGF dans les lignées de cancer du sein (MDA-MB-231, MCF-7, T47-D...)(Dollé et al. 2003). De plus, il a été décrit que la seule surexpression de TrkA dans des cellules PC12 entraîne une auto-activation du récepteur (Leoni and Valtorta, 2002).

De façon plus surprenante, la sensibilité des cellules au NGF exogène varie selon les phénotypes considérés. Ainsi, alors que le NGF accroît la migration et l'invasion des cellules surexprimant TrkA, il est sans effet sur la prolifération et la résistance à l'apoptose. L'explication la plus logique semble être la saturation de certaines cibles en aval des voies de signalisation

DISCUSSION & PERSPECTIVES

responsables de ces effets biologiques. Ainsi, la prolifération et la résistance à l'apoptose induites par TrkA seraient déjà à leur niveau maximum en l'absence de NGF exogène.

A l'image de la surexpression de TrkA, la seule surexpression de p75^{NTR} suffit à l'obtention des effets biologiques observés. Cette activation constitutive de p75^{NTR} surexprimé peut, de la même façon que pour TrkA, être attribuée à la boucle autocrine du NGF, mais pas seulement. En effet, p75^{NTR} est le récepteur commun des neurotrophines et pro-neurotrophines. Or, de récents travaux (article en annexe) indiquent que les cellules de cancer du sein expriment et secrètent la NT-4/5 et le BDNF. De plus, ces deux neurotrophines se sont montrées, à l'image du NGF, capables d'induire la survie des cellules de cancer du sein *via* p75^{NTR}, formant ainsi deux boucles autocrines supplémentaires empruntant ce récepteur.

Notons que, à l'inverse de TrkA, les cellules surexprimant p75^{NTR} ne sont plus sensibles à l'ajout de NGF exogène et ce quelque soit l'effet biologique considéré. Ainsi, cette activation constitutive de p75^{NTR} surexprimé semble être à son niveau maximum.

Outre ces différentes boucles autocrines possibles, l'autoactivation de p75^{NTR} peut trouver d'autres explications. On ne peut exclure des phénomènes de multimérisation spontanée due à l'augmentation de la population du récepteur à la surface cellulaire et sa concentration probable au niveau des rafts lipidiques. Il a également été décrit dans les cellules HEK 293T que le monomère de p75^{NTR} serait capable d'activer une signalisation ligand-indépendante menant à l'induction de l'apoptose alors que l'activation du dimère par le NGF inhiberait l'apoptose FkB (Ye et al., 1999). Cependant, nos expériences n'ont montré aucune modification ou réversion de l'effet de p75^{NTR} surexprimé après ajout de NGF exogène, écartant ici l'hypothèse de p75^{NTR} comme récepteur à dépendance dans notre modèle.

Les résultats d'expériences préliminaires menées au laboratoire, concernant le clivage de p75^{NTR} surexprimé, montrent l'apparition des formes clivées du récepteur (P75-ICD et -CTF) accompagnant sa surexpression. L'inhibition de la protéolyse de p75^{NTR} nous indique que ces formes clivées participeraient à l'effet de survie observé. Comme décrit dans la littérature, le P75-ICD pourrait agir ici avec TRAF6 et NRIF comme régulateur transcriptionnel et pourrait être le lien entre la surexpression de p75^{NTR} et l'augmentation d'expression de p21^{waf1}. On peut

DISCUSSION & PERSPECTIVES

imaginer que l'apparition des formes clivées de p75^{NTR} serait liée à l'augmentation du nombre de récepteur et de la probabilité de clivages spontanés par les protéases. Cependant, ce clivage de p75^{NTR} pourrait ne pas être la cause, mais la conséquence de son activation.

B/ Interactions possibles des deux récepteurs surexprimés

Nous l'avons vu en introduction, même si p75^{NTR} et TrkA sont parfaitement capables d'agir indépendamment, leur interaction n'en est pas moins un aspect important de leur fonctionnement. Si nos approches de surexpression des récepteurs du NGF nous ont permis d'appréhender efficacement le rôle individuel de chacun, la question des interactions intervenant au sein du couple TrkA-p75^{NTR} surexprimés reste en suspend. Dans le cancer de la prostate, il a été décrit des actions opposées de TrkA et p75^{NTR}, respectivement pro- et anti-tumorales (Papatsoris et al., 2007). Au contraire dans le cancer du sein, les précédentes publications de notre laboratoire décrivent un rôle pro-tumoral de TrkA et p75^{NTR}. Au vu de mes récents résultats, il serait cependant intéressant de connaître la part d'interactions entre ces deux récepteurs surexprimés et la somme de leurs effets dans le cancer du sein.

Comme précédemment décrit, TrkA et p75^{NTR} sont potentiellement capables d'interagir tant physiquement qu'au niveau de leurs voies de signalisation respectives.

Physiquement, TrkA et p75^{NTR} surexprimés pourraient s'hétérodimériser afin, entre autre, de créer un site de haute affinité pour le NGF et potentialiseraient l'effet déjà observé de TrkA. Cependant, cette union interdirait alors la fixation des neurotrophines et proneurotrophines, autres que le NGF, à p75^{NTR}. Ainsi, ne connaissant pas la nature exacte de l'activation de p75^{NTR} surexprimé (boucles autocrines, auto-multimérisation, signalisation monomérique indépendante du ligand...), ni la proportion d'hétérodimérisation qui se produirait, il serait intéressant d'étudier le comportement de p75^{NTR} co-surexprimé avec TrkA.

Néanmoins, il apparaît que l'hétérodimérisation, de p75^{NTR} et de TrkA mènerait à une activation accrue de chacun des récepteurs. D'une part, l'ubiquitinylation de TrkA suivie de son internalisation et de sa signalisation est décrite comme dépendante de TRAF6 recruté par p75^{NTR} (Geetha et al., 2005a) ; d'autre part, l'activation de TrkA par le NGF stimule le clivage de

DISCUSSION & PERSPECTIVES

p75^{NTR} par la γ -sécrétase et la libération du P75-ICD (Urta et al., 2007), une forme du récepteur qui semble nécessaire aux effets de la surexpression de p75^{NTR} observés dans notre modèle.

De plus, le regroupement des récepteurs se traduirait également par le rapprochement de leurs signalisations respectives. Ainsi, la protéine G RAS, élément important de la signalisation de TrkA, peut également être recrutée par p75^{NTR} (Blochl et al., 2004). Le pool ainsi accru de la protéine RAS à disposition du récepteur TrkA pourrait alors amplifier l'activation des voies de signalisation dépendantes d'elle. Or, ces voies ne sont autres que les voies PI3K/Akt et MEK MAPK qui se trouvent être activement impliquées, entre autre, dans la survie à l'anoïkis induite par la surexpression de TrkA. Notons que RAS a été trouvé activé dans la majorité des lignées de cellules de cancer du sein où il inhibe l'anoïkis (Eckert et al., 2004) et que l'expression de son adaptateur Shc, capable de lier TrkA et p75^{NTR}, augmente dans les tumeurs primaires de sein associées à une atteinte des ganglions lymphatiques auxiliaires (Jackson et al., 2000). D'autre part, une autre protéine G partenaire de p75^{NTR}, RhoA, est également impliquée dans l'induction de l'anoïkis (Ma et al., 2007) et son activation se trouve inhibée par la liaison de neurotrophines au récepteur (Yamashita and Tohyama, 2003). Enfin, bien qu'aucun effet sur la survie à l'anoïkis n'ait été observé dans les cellules surexprimant p75^{NTR}, l'augmentation de p21^{waf1} qu'elle induit pourrait, dans un contexte où certaines voies de survie à l'anoïkis seraient activées, favoriser cette résistance. En effet, il a été montré dans les cellules de cancer de sein MCF-10A, qu'un arrêt du cycle en G1-S induit par la surexpression de p21^{waf1} provoque une résistance des cellules à l'anoïkis (Collins et al., 2005).

Ces différentes pistes suggèrent que l'association de p75^{NTR} surexprimé avec TrkA pourrait mener, *via* une survie à l'anoïkis encore accrue, à une amplification de l'effet pro-métastatique de la surexpression de TrkA.

III. Limites de nos approches expérimentales

A/ Les clones surexprimants

Les travaux entamés sur TrkA nécessitaient, pour certaines expérimentations, (notamment *in vivo*) une surexpression prolongée du récepteur et donc l'établissement de clones stablement transfectés. La lignée cellulaire choisie pour la mise en place de ce modèle fut la lignée

DISCUSSION & PERSPECTIVES

MDA-MB-231 qui présente, entre autres, l'avantage de moins dériver en culture par rapport au MCF-7. L'obtention de clones MDA-MB-231 surexprimant TrkA fut néanmoins un travail de longue haleine nécessitant l'isolement et la caractérisation de 60 clones pour seulement 2 clones finalement utilisables. Afin de pallier aux potentiels effets clonaux provoqués par la transfection, l'étude de ces 2 clones a été couplée, en parallèle, à celle d'une population totale de cellules surexprimant TrkA. Ce type de modèle de surexpression stable pose cependant un certain nombre de problèmes. En effet, la surexpression d'une protéine pose le problème de la relevance du niveau d'expression par rapport au niveau physiologique dans les tumeurs. Cependant, les MDA-MB-231 exprimant initialement moins la protéine TrkA que les échantillons tumoraux (Descamps et al., 2001a), sa surexpression rétablit globalement le récepteur à son niveau d'expression dans les tumeurs. Ainsi le niveau de TrkA dans ce modèle de surexpression demeure relevant. Cependant, l'utilisation de la surexpression stable entraîne la multiplication des expériences par le nombre de clones ou de populations utilisés.

Forts de cette expérience nous avons opté pour un modèle de surexpression inducible pour l'étude du récepteur p75^{NTR}. En effet, ce modèle permet une surexpression dosée du récepteur. De plus, l'effet clonal dû à la transfection n'est pas pris en compte puisque les cellules contrôle et les cellules surexprimant sont un seul et même clone induit ou non, permettant ainsi de s'affranchir de l'obligation d'établir et d'étudier plusieurs clones. Néanmoins, le système inducible par l'ecdysone, que nous avons choisi pour ces nombreuses qualités (innocuité, dose réponse, faible fuite), nécessite la transfection stable des cellules par deux plasmides soit deux fois plus de clones à isoler par sélection avant d'acquérir le clone efficace que nous avons retenu. Enfin, débarrassé de l'effet clonal dû à la transfection, notre modèle n'est cependant pas à l'abri d'un effet clonal dû à la sélection d'un clone unique, même si dans notre cas celui-ci n'a pas présenté de différences morphologiques ou phénotypiques majeures avec les MDA-MB-231 natives. Le système inducible apparaît ainsi être un modèle de choix pour l'analyse des récepteurs et pourrait nous permettre, par transfection de TrkA dans notre modèle p75IND, d'étudier le fruit des interactions entre les deux récepteurs en faisant varier la balance d'expression TrkA/p75^{NTR}.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

B/ Méthodes d'analyse globale

Afin d'identifier les modifications cellulaires induites par la surexpression de p75^{NTR}, j'ai utilisé différentes techniques d'analyse globale des variations d'expression. D'une part, l'électrophorèse bidimensionnelle ou 2D, une technique permettant d'étudier de manière naïve les modifications du protéome suite à un traitement ou, dans notre cas, suite à la surexpression d'une protéine. Elle permet de visualiser sans à priori les modifications de très nombreuses protéines. Néanmoins, l'obtention des gels et surtout leur analyse informatique se sont montrées être très longues et laborieuses. En effet, cette analyse informatique des gels est une étape cruciale qui nécessite de longues heures de nettoyage manuel et de vérification de détection et d'appariement des spots.

Malheureusement, malgré les modifications de comportement observées dans les cellules de cancer du sein surexprimant p75^{NTR}, l'analyse en électrophorèse 2D ne nous a permis de mettre en évidence aucune modification d'expression ou de modification post-traductionnelle suite à la surexpression de p75^{NTR}, et ce dans diverses situations telles que le stress des cellules avec une drogue apoptogène. En effet, l'analyse en 2D comporte certaines limites pour la recherche des modifications sur l'ensemble du protéome. D'une part, la coloration à l'argent, bien que sensible ne permet pas de visualiser les protéines faiblement exprimées. D'autre part, les protéines de haut poids moléculaire, les protéines hydrophobes, les protéines acides ainsi que les protéines membranaires, telles que p75^{NTR}, sont très difficilement analysables. Aussi, de nouvelles méthodes tendant à pallier à ces défauts sont depuis peu à l'étude dans notre laboratoire. C'est le cas du SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture) qui permet une quantification stricte qui se fait à l'aide d'une incorporation d'acides aminés marqués par des isotopes stables (Mann, 2006) suivie d'une analyse systématique des pistes d'un gel 1D. La quantification se fait alors par spectrométrie de masse (Strande et al., 2008).

Parallèlement à cette étude des modifications du protéome suite à la surexpression de p75^{NTR}, je me suis attaché à l'étude des modifications d'expression en ARNm cette fois-ci, par l'utilisation de microarray. Basées sur le principe d'une PCR en temps réel à grandes échelles, ces « puces » contiennent près d'une centaine de couples d'amorces spécifiques de gènes

DISCUSSION & PERSPECTIVES

impliqués dans la régulation de l'apoptose. Là encore, en dépit de l'effet de survie important induit par la surexpression de p75^{NTR}, cette méthode n'a permis de mettre en lumière aucun nouvel acteur impliqué dans cet effet. L'explication de cet échec peut trouver diverses réponses. D'une part, dans le fait que « seulement » une centaine de gènes sont à l'étude et que l'effet observé pourrait emprunter d'autres chemins que ceux sondés avec cette technique. Ensuite, cette méthode s'appuie sur des modifications transcriptionnelles, or les voies de signalisation sont composées de diverses modifications post-traductionnelles, telles que les phosphorylations, ainsi que de mécanismes de recrutement d'adaptateurs en cascade bien entendu indétectables par cette technique. D'autre part, ces mécanismes sont majoritairement transitoires, les rendant difficilement appréhendables dans le temps.

Si les méthodes d'analyses globales de modifications, que ce soit en protéines ou en ARNm, présentent l'avantage d'une étude large et sans à priori, elles présentent également des limites qui n'ont pas permis ici d'en tirer des résultats. Leur sensibilité et leur champ d'action sont bien sûr en cause, mais il semble également que la signalisation de p75^{NTR} surexprimé se fasse par des régulations fines, notamment *via* celle de p21^{waf1}, protéine capable de réguler à elle seule de nombreux phénomènes.

IV. Conclusion et perspectives

Au cours de ma thèse, j'ai d'une part, montré l'implication de TrkA dans le pouvoir métastatique des cellules de cancer du sein *via* une résistance accrue à l'anoïkis. D'autre part, j'ai montré que la surexpression de p75^{NTR} induit une augmentation de la survie des cellules à l'apoptose et une réduction de leur prolifération. Il apparaît donc important de poursuivre les études sur les mécanismes moléculaires des voies de signalisation de TrkA et de p75^{NTR} mais aussi d'explorer les interactions qu'il existe entre ces deux récepteurs et leurs signalisations dans les cellules de cancer du sein.

En effet, TrkA seul ayant un effet mitogène et p75^{NTR} seul un effet antiprolifératif, quel sera alors l'effet global de ces deux récepteurs surexprimés dans la tumeur? Leur co-expression se traduira-t-elle par une simple addition de leurs effets propres, par une synergie de leur activation ou entraînera-t-elle un remaniement complet de leur mode de fonctionnement *via* leur interaction ?

D'autre part, il a été décrit que la surexpression de TrkB transforme les cellules épithéliales intestinales normales de rat et les rend hautement métastatiques (Douma et al., 2004). Dans ces conditions, la surexpression de TrkA et p75^{NTR} dans les cellules normales de sein pourrait-elle participer à leur cancérisation ou est-ce la conséquence tardive des altérations géniques accumulées durant le développement tumoral ?

Toutes ces questions ouvrent un large champ d'investigation dans la compréhension du rôle du NGF et de ses récepteurs dans le cancer du sein. Mes travaux de thèse ont permis une meilleure connaissance du mode d'action et de l'implication des récepteurs du NGF dans cette maladie. Les données et les modèles cellulaires apportés par ce travail constituent déjà la base de projet prometteur qui pourrait à terme, en combinaison avec d'autres traitements, faire du NGF et de ses récepteurs des cibles thérapeutiques potentielles.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adriaenssens, E., Vanhecke, E., Saule, P., Mougél, A., Page, A., Romon, R., Nurcombe, V., Le Bourhis, X. and Hondermarck, H.** (2008). Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* **68**, 346-51.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. and Clarke, M. F.** (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983-8.
- Allemand, H., Seradour, B., Weill, A. and Ricordeau, P.** (2008). [Decline in breast cancer incidence in 2005 and 2006 in France: a paradoxical trend]. *Bull Cancer* **95**, 11-5.
- Aragona, M., Panetta, S., Silipigni, A. M., Romeo, D. L., Pastura, G., Mesiti, M., Cascinu, S. and La Torre, F.** (2001). Nerve growth factor receptor immunoreactivity in breast cancer patients. *Cancer Invest* **19**, 692-7.
- Arakawa, T., Haniu, M., Narhi, L. O., Miller, J. A., Talvenheimo, J., Philo, J. S., Chute, H. T., Matheson, C., Carnahan, J., Louis, J. C. et al.** (1994). Formation of heterodimers from three neurotrophins, nerve growth factor, neurotrophin-3, and brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* **269**, 27833-9.
- Arevalo, J. C., Conde, B., Hempstead, B. L., Chao, M. V., Martin-Zanca, D. and Perez, P.** (2000). TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* **20**, 5908-16.
- Arevalo, J. C., Waite, J., Rajagopal, R., Beyna, M., Chen, Z. Y., Lee, F. S. and Chao, M. V.** (2006). Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron* **50**, 549-59.
- Arevalo, J. C., Yano, H., Teng, K. K. and Chao, M. V.** (2004). A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *Embo J* **23**, 2358-68.
- Arnold, A. and Papanikolaou, A.** (2005). Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* **23**, 4215-24.
- Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K. and Mizutani, S.** (1999). Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *Embo J* **18**, 1223-34.
- Aurikko, J. P., Ruotolo, B. T., Grossmann, J. G., Moncrieffe, M. C., Stephens, E., Leppanen, V. M., Robinson, C. V., Saarma, M., Bradshaw, R. A. and Blundell, T. L.** (2005). Characterization of symmetric complexes of nerve growth factor and the ectodomain of the pan-neurotrophin receptor, p75NTR. *J Biol Chem* **280**, 33453-60.
- Baldwin, A. N., Bitler, C. M., Welcher, A. A. and Shooter, E. M.** (1992). Studies on the structure and binding properties of the cysteine-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR). *J Biol Chem* **267**, 8352-9.
- Banfield, M. J., Naylor, R. L., Robertson, A. G., Allen, S. J., Dawbarn, D. and Brady, R. L.** (2001). Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5. *Structure* **9**, 1191-9.
- Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H. and Lesslauer, W.** (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**, 431-45.
- Barde, Y. A., Edgar, D. and Thoenen, H.** (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* **1**, 549-53.

BIBLIOGRAPHIE

- Barker, P. A.** (2007). High affinity not in the vicinity? *Neuron* **53**, 1-4.
- Bibel, M., Hoppe, E. and Barde, Y. A.** (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *Embo J* **18**, 616-22.
- Bieche, I. and Lidereau, R.** (1997). [Somatic genetics of breast cancer]. *Bull Cancer* **84**, 83-96.
- Bilderback, T. R., Gazula, V. R., Lisanti, M. P. and Dobrowsky, R. T.** (1999). Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem* **274**, 257-63.
- Bilderback, T. R., Grigsby, R. J. and Dobrowsky, R. T.** (1997). Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae. *J Biol Chem* **272**, 10922-7.
- Blancato, J., Singh, B., Liu, A., Liao, D. J. and Dickson, R. B.** (2004). Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer* **90**, 1612-9.
- Blochl, A. and Blochl, R.** (2007). A cell-biological model of p75NTR signaling. *J Neurochem* **102**, 289-305.
- Blochl, A., Blumenstein, L. and Ahmadian, M. R.** (2004). Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci* **20**, 2321-35.
- Bonnet, D. and Dick, J. E.** (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**, 730-7.
- Bosco, E. E. and Knudsen, E. S.** (2007). RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis and treatment. *Cell Cycle* **6**, 667-71.
- Bose, C. K.** (2005). Role of nerve growth factor and FSH receptor in epithelial ovarian cancer. *Reprod Biomed Online* **11**, 194-7.
- Boutillier, J., Ceni, C., Pagdala, P. C., Forgie, A., Neet, K. E. and Barker, P. A.** (2008). Proneurotrophins require endocytosis and intracellular proteolysis to induce TrkA activation. *J Biol Chem* **283**, 12709-16.
- Brann, A. B., Tcherpakov, M., Williams, I. M., Futerman, A. H. and Fainzilber, M.** (2002). Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* **277**, 9812-8.
- Bresnahan, P. A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H. L., Brake, A. J., Barr, P. J. and Thomas, G.** (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol* **111**, 2851-9.
- Bronfman, F. C. and Fainzilber, M.** (2004). Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep* **5**, 867-71.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E.** (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-68.
- Bui, N. T., Konig, H. G., Culmsee, C., Bauerbach, E., Poppe, M., Kriegelstein, J. and Prehn, J. H.** (2002). p75 neurotrophin receptor is required for constitutive and NGF-induced survival signalling in PC12 cells and rat hippocampal neurones. *J Neurochem* **81**, 594-605.
- Cailleau, R., Mackay, B., Young, R. K. and Reeves, W. J., Jr.** (1974a). Tissue culture studies on pleural effusions from breast carcinoma patients. *Cancer Res* **34**, 801-9.

BIBLIOGRAPHIE

- Cailleau, R., Young, R., Olive, M. and Reeves, W. J., Jr.** (1974b). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* **53**, 661-74.
- Campbell, L. L. and Polyak, K.** (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* **6**, 2332-8.
- Campos, X., Munoz, Y., Selman, A., Yazigi, R., Moyano, L., Weinstein-Oppenheimer, C., Lara, H. E. and Romero, C.** (2007). Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **104**, 168-75.
- Canfield, S. E., Zhu, K., Williams, S. A. and McConkey, D. J.** (2006). Bortezomib inhibits docetaxel-induced apoptosis via a p21-dependent mechanism in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* **5**, 2043-50.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed, J. C.** (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318-21.
- Casademunt, E., Carter, B. D., Benzel, I., Frade, J. M., Dechant, G. and Barde, Y. A.** (1999). The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *Embo J* **18**, 6050-61.
- Chang, C. F., Westbrook, R., Ma, J. and Cao, D.** (2007). Transforming growth factor-beta signaling in breast cancer. *Front Biosci* **12**, 4393-401.
- Chang, M. S., Arevalo, J. C. and Chao, M. V.** (2004). Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J Neurosci Res* **78**, 186-92.
- Chao, M. V.** (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* **4**, 299-309.
- Chao, M. V., Bothwell, M. A., Ross, A. H., Koprowski, H., Lanahan, A. A., Buck, C. R. and Sehgal, A.** (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* **232**, 518-21.
- Chao, M. V. and Hempstead, B. L.** (1995). p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* **18**, 321-6.
- Chiaramello, A., Neuman, K., Palm, K., Metsis, M. and Neuman, T.** (1995). Helix-loop-helix transcription factors mediate activation and repression of the p75LNGFR gene. *Mol Cell Biol* **15**, 6036-44.
- Chiarenza, A., Lazarovici, P., Lempereur, L., Cantarella, G., Bianchi, A. and Bernardini, R.** (2001). Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* **61**, 3002-8.
- Chittka, A., Arevalo, J. C., Rodriguez-Guzman, M., Perez, P., Chao, M. V. and Sendtner, M.** (2004). The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J Cell Biol* **164**, 985-96.
- Clary, D. O. and Reichardt, L. F.** (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11133-7.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R. and Hamburger, V.** (1954). A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**, 1014-8.

BIBLIOGRAPHIE

Collins, N. L., Reginato, M. J., Paulus, J. K., Sgroi, D. C., Labaer, J. and Brugge, J. S. (2005). G1/S cell cycle arrest provides anoikis resistance through Erk-mediated Bim suppression. *Mol Cell Biol* **25**, 5282-91.

Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* **13**, 65-70.

Coulson, E. J., Reid, K., Baca, M., Shipham, K. A., Hulett, S. M., Kilpatrick, T. J. and Bartlett, P. F. (2000). Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem* **275**, 30537-45.

Coulson, E. J., Reid, K., Barrett, G. L. and Bartlett, P. F. (1999). p75 neurotrophin receptor-mediated neuronal death is promoted by Bcl-2 and prevented by Bcl-xL. *J Biol Chem* **274**, 16387-91.

Cowin, P., Rowlands, T. M. and Hatsell, S. J. (2005). Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 499-508.

Davidson, B., Reich, R., Lazarovici, P., Ann Florenes, V., Nielsen, S. and Nesland, J. M. (2004). Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* **83**, 119-28.

Davidson, B., Reich, R., Lazarovici, P., Nesland, J. M., Skrede, M., Risberg, B., Trope, C. G. and Florenes, V. A. (2003). Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**, 2248-59.

del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. and Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**, 687-9.

Descamps, S., Lebourhis, X., Delehedde, M., Boilly, B. and Hondermarck, H. (1998). Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J Biol Chem* **273**, 16659-62.

Descamps, S., Pawlowski, V., Revillion, F., Hornez, L., Hebbar, M., Boilly, B., Hondermarck, H. and Peyrat, J. P. (2001a). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res* **61**, 4337-40.

Descamps, S., Toillon, R. A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S. M., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J. P. and Hondermarck, H. (2001b). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* **276**, 17864-70.

Diolaiti, D., Bernardoni, R., Trazzi, S., Papa, A., Porro, A., Bono, F., Herbert, J. M., Perini, G. and Della Valle, G. (2007). Functional cooperation between TrkA and p75(NTR) accelerates neuronal differentiation by increased transcription of GAP-43 and p21(CIP/WAF) genes via ERK1/2 and AP-1 activities. *Exp Cell Res* **313**, 2980-92.

Dissen, G. A., Romero, C., Hirshfield, A. N. and Ojeda, S. R. (2001). Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology* **142**, 2078-86.

Dobrowsky, R. T., Werner, M. H., Castellino, A. M., Chao, M. V. and Hannun, Y. A. (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* **265**, 1596-9.

BIBLIOGRAPHIE

- Dolle, J. P., Rezvan, A., Allen, F. D., Lazarovici, P. and Lelkes, P. I.** (2005). Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 1220-7.
- Dolle, L., El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Nurcombe, V. and Hondermarck, H.** (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* **22**, 5592-601.
- Donovan, M. J., Hempstead, B., Huber, L. J., Kaplan, D., Tsoulfas, P., Chao, M., Parada, L. and Schofield, D.** (1994). Identification of the neurotrophin receptors p75 and trk in a series of Wilms' tumors. *Am J Pathol* **145**, 792-801.
- Douma, S., Van Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., Van Garderen, E. and Peeper, D. S.** (2004). Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* **430**, 1034-9.
- Du, J. J., Dou, K. F., Peng, S. Y., Qian, B. Z., Xiao, H. S., Liu, F., Wang, W. Z., Guan, W. X., Gao, Z. Q., Liu, Y. B. et al.** (2003). Expression of NGF family and their receptors in gastric carcinoma: a cDNA microarray study. *World J Gastroenterol* **9**, 1431-4.
- Eckert, L. B., Repasky, G. A., Ulku, A. S., McFall, A., Zhou, H., Sartor, C. I. and Der, C. J.** (2004). Involvement of Ras activation in human breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis. *Cancer Res* **64**, 4585-92.
- Eggert, A., Grotzer, M. A., Ikegaki, N., Liu, X. G., Evans, A. E. and Brodeur, G. M.** (2002). Expression of the neurotrophin receptor TrkA down-regulates expression and function of angiogenic stimulators in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cancer Res* **62**, 1802-8.
- Eggert, A., Ikegaki, N., Liu, X. G. and Brodeur, G. M.** (2000). Prognostic and biological role of neurotrophin-receptor TrkA and TrkB in neuroblastoma. *Klin Padiatr* **212**, 200-5.
- El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Dolle, L., Descamps, S. and Hondermarck, H.** (2003). Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells. *J Biol Chem* **278**, 16952-6.
- Epa, W. R., Markovska, K. and Barrett, G. L.** (2004). The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation. *J Neurochem* **89**, 344-53.
- Esposito, D., Patel, P., Stephens, R. M., Perez, P., Chao, M. V., Kaplan, D. R. and Hempstead, B. L.** (2001). The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* **276**, 32687-95.
- Fahnestock, M., Yu, G., Michalski, B., Mathew, S., Colquhoun, A., Ross, G. M. and Coughlin, M. D.** (2004). The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *J Neurochem* **89**, 581-92.
- Fayard, B., Loeffler, S., Weis, J., Vogelin, E. and Kruttgen, A.** (2005). The secreted brain-derived neurotrophic factor precursor pro-BDNF binds to TrkB and p75NTR but not to TrkA or TrkC. *J Neurosci Res* **80**, 18-28.
- Festuccia, C., Gravina, G. L., Muzi, P., Pomante, R., Ventura, L., Ricevuto, E., Vicentini, C. and Bologna, M.** (2007). In vitro and in vivo effects of bicalutamide on the expression of TrkA and P75 neurotrophin receptors in prostate carcinoma. *Prostate* **67**, 1255-64.
- Florenes, V. A., Maelandsmo, G. M., Holm, R., Reich, R., Lazarovici, P. and Davidson, B.** (2004). Expression of activated TrkA protein in melanocytic tumors: relationship to cell proliferation and clinical outcome. *Am J Clin Pathol* **122**, 412-20.

BIBLIOGRAPHIE

- Fortino, V., Torricelli, C., Capurro, E., Sacchi, G., Valacchi, G. and Maioli, E.** (2008). Antiproliferative and survival properties of PMA in MCF-7 breast cancer cell. *Cancer Invest* **26**, 13-21.
- Friess, H., Zhu, Z. W., di Mola, F. F., Kulli, C., Graber, H. U., Andren-Sandberg, A., Zimmermann, A., Korc, M., Reinshagen, M. and Buchler, M. W.** (1999). Nerve growth factor and its high-affinity receptor in chronic pancreatitis. *Ann Surg* **230**, 615-24.
- Garcia, M., Derocq, D., Freiss, G. and Rochefort, H.** (1992). Activation of estrogen receptor transfected into a receptor-negative breast cancer cell line decreases the metastatic and invasive potential of the cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11538-42.
- Gartel, A. L. and Tyner, A. L.** (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* **1**, 639-49.
- Geetha, T., Jiang, J. and Wooten, M. W.** (2005a). Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* **20**, 301-12.
- Geetha, T., Kenchappa, R. S., Wooten, M. W. and Carter, B. D.** (2005b). TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *Embo J* **24**, 3859-68.
- Ghiran, I., Glodek, A. M., Weaver, G., Klickstein, L. B. and Nicholson-Weller, A.** (2008). Ligation of erythrocyte CR1 induces its clustering in complex with scaffolding protein FAP-1. *Blood* **112**, 3465-73.
- Goretzki, P. E., Wahl, R. A., Becker, R., Koller, C., Branscheid, D., Grussendorf, M. and Roeher, H. D.** (1987). Nerve growth factor (NGF) sensitizes human medullary thyroid carcinoma (hMTC) cells for cytostatic therapy in vitro. *Surgery* **102**, 1035-42.
- Grob, P. M., Ross, A. H., Koprowski, H. and Bothwell, M.** (1985). Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* **260**, 8044-9.
- Hallbook, F., Ibanez, C. F. and Persson, H.** (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* **6**, 845-58.
- Hamanoue, M., Middleton, G., Wyatt, S., Jaffray, E., Hay, R. T. and Davies, A. M.** (1999). p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* **14**, 28-40.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hayes, D. F., Miller, K. and Sledge, G.** (2007). Angiogenesis as targeted breast cancer therapy. *Breast* **16 Suppl 2**, S17-9.
- He, X. L. and Garcia, K. C.** (2004). Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* **304**, 870-5.
- Heimann, R., Lan, F., McBride, R. and Hellman, S.** (2000). Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res* **60**, 298-304.
- Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F. and Chao, M. V.** (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* **350**, 678-83.
- Herrmann, J. L., Menter, D. G., Hamada, J., Marchetti, D., Nakajima, M. and Nicolson, G. L.** (1993). Mediation of NGF-stimulated extracellular matrix invasion by the human melanoma

BIBLIOGRAPHIE

low-affinity p75 neurotrophin receptor: melanoma p75 functions independently of trkA. *Mol Biol Cell* **4**, 1205-16.

Herrup, K. and Shooter, E. M. (1973). Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3884-8.

Hoyle, G. W. (2003). Neurotrophins and lung disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 551-8.

Jackson, J. G., Yoneda, T., Clark, G. M. and Yee, D. (2000). Elevated levels of p66 Shc are found in breast cancer cell lines and primary tumors with high metastatic potential. *Clin Cancer Res* **6**, 1135-9.

Jin, H., Pan, Y., Zhao, L., Zhai, H., Li, X., Sun, L., He, L., Chen, Y., Hong, L., Du, Y. et al. (2007). p75 neurotrophin receptor suppresses the proliferation of human gastric cancer cells. *Neoplasia* **9**, 471-8.

Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C. R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M. and Chao, M. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* **47**, 545-54.

Jungbluth, S., Bailey, K. and Barde, Y. A. (1994). Purification and characterisation of a brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-3 (BDNF/NT-3) heterodimer. *Eur J Biochem* **221**, 677-85.

Kanning, K. C., Hudson, M., Amieux, P. S., Wiley, J. C., Bothwell, M. and Schecterson, L. C. (2003). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* **23**, 5425-36.

Kenchappa, R. S., Zampieri, N., Chao, M. V., Barker, P. A., Teng, H. K., Hempstead, B. L. and Carter, B. D. (2006). Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* **50**, 219-32.

Kendall, S. E., Ryczko, M. C., Mehan, M. and Verdi, J. M. (2003). Characterization of NADE, NRIF and SC-1 gene expression during mouse neurogenesis. *Brain Res Dev Brain Res* **144**, 151-8.

Khursigara, G., Bertin, J., Yano, H., Moffett, H., DiStefano, P. S. and Chao, M. V. (2001). A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* **21**, 5854-63.

Khwaja, F. and Djakiew, D. (2003). Inhibition of cell-cycle effectors of proliferation in bladder tumor epithelial cells by the p75NTR tumor suppressor. *Mol Carcinog* **36**, 153-60.

Khwaja, F., Tabassum, A., Allen, J. and Djakiew, D. (2006). The p75(NTR) tumor suppressor induces cell cycle arrest facilitating caspase mediated apoptosis in prostate tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 1184-92.

Kimura, M. T., Irie, S., Shoji-Hoshino, S., Mukai, J., Nadano, D., Oshimura, M. and Sato, T. A. (2001). 14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* **276**, 17291-300.

Klein, R., Jing, S. Q., Nanduri, V., O'Rourke, E. and Barbacid, M. (1991). The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* **65**, 189-97.

Knudson, A. G. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10914-21.

BIBLIOGRAPHIE

- Kogner, P., Barbany, G., Dominici, C., Castello, M. A., Raschella, G. and Persson, H.** (1993). Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res* **53**, 2044-50.
- Koizumi, H., Morita, M., Mikami, S., Shibayama, E. and Uchikoshi, T.** (1998). Immunohistochemical analysis of TrkA neurotrophin receptor expression in human non-neuronal carcinomas. *Pathol Int* **48**, 93-101.
- Krygier, S. and Djakiew, D.** (2001). The neurotrophin receptor p75NTR is a tumor suppressor in human prostate cancer. *Anticancer Res* **21**, 3749-55.
- Krygier, S. and Djakiew, D.** (2002). Neurotrophin receptor p75(NTR) suppresses growth and nerve growth factor-mediated metastasis of human prostate cancer cells. *Int J Cancer* **98**, 1-7.
- Lad, S. P., Peterson, D. A., Bradshaw, R. A. and Neet, K. E.** (2003). Individual and combined effects of TrkA and p75NTR nerve growth factor receptors. A role for the high affinity receptor site. *J Biol Chem* **278**, 24808-17.
- Lee, F. S. and Chao, M. V.** (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3555-60.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K. and Hempstead, B. L.** (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**, 1945-8.
- Lee, T. H., Seng, S., Sekine, M., Hinton, C., Fu, Y., Avraham, H. K. and Avraham, S.** (2007). Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* **4**, e186.
- Leoni, C. and Valtorta, F.** (2002). Constitutive TrkA activity in receptor-overexpressing PC12 clones. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 972-8.
- Liepinsh, E., Ilag, L. L., Otting, G. and Ibanez, C. F.** (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *Embo J* **16**, 4999-5005.
- Lipsick, J. S. and Wang, D. M.** (1999). Transformation by v-Myb. *Oncogene* **18**, 3047-55.
- Ma, Z., Myers, D. P., Wu, R. F., Nwariaku, F. E. and Terada, L. S.** (2007). p66Shc mediates anoikis through RhoA. *J Cell Biol* **179**, 23-31.
- Makkerh, J. P., Ceni, C., Auld, D. S., Vaillancourt, F., Dorval, G. and Barker, P. A.** (2005). p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep* **6**, 936-41.
- Mamidipudi, V., Li, X. and Wooten, M. W.** (2002). Identification of interleukin 1 receptor-associated kinase as a conserved component in the p75-neurotrophin receptor activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* **277**, 28010-8.
- Mamidipudi, V., Lin, C., Seibenhener, M. L. and Wooten, M. W.** (2004). Regulation of interleukin receptor-associated kinase (IRAK) phosphorylation and signaling by iota protein kinase C. *J Biol Chem* **279**, 4161-5.
- Mann, M.** (2006). Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 952-8.
- Marchetti, D., Aucoin, R., Blust, J., Murry, B. and Greiter-Wilke, A.** (2004). p75 neurotrophin receptor functions as a survival receptor in brain-metastatic melanoma cells. *J Cell Biochem* **91**, 206-15.

BIBLIOGRAPHIE

Marchetti, D., Menter, D., Jin, L., Nakajima, M. and Nicolson, G. L. (1993). Nerve growth factor effects on human and mouse melanoma cell invasion and heparanase production. *Int J Cancer* **55**, 692-9.

Martin-Zanca, D., Mitra, G., Long, L. K. and Barbacid, M. (1986). Molecular characterization of the human *trk* oncogene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 2**, 983-92.

McGregor, L. M., McCune, B. K., Graff, J. R., McDowell, P. R., Romans, K. E., Yancopoulos, G. D., Ball, D. W., Baylin, S. B. and Nelkin, B. D. (1999). Roles of *trk* family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4540-5.

Menter, D. G., Herrmann, J. L., Marchetti, D. and Nicolson, G. L. (1994). Involvement of neurotrophins and growth factors in brain metastasis formation. *Invasion Metastasis* **14**, 372-84.

Metsis, M. (2001). Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1014-20.

Metsis, M., Timmusk, T., Allikmets, R., Saarma, M. and Persson, H. (1992). Regulatory elements and transcriptional regulation by testosterone and retinoic acid of the rat nerve growth factor receptor promoter. *Gene* **121**, 247-54.

Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B. et al. (2004). LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* **7**, 221-8.

Miao, G., Mace, J., Kirby, M., Hopper, A., Peverini, R., Chinnock, R., Shapiro, J. and Hathout, E. (2005). Beneficial effects of nerve growth factor on islet transplantation. *Transplant Proc* **37**, 3490-2.

Miao, G., Mace, J., Kirby, M., Hopper, A., Peverini, R., Chinnock, R., Shapiro, J. and Hathout, E. (2006). In vitro and in vivo improvement of islet survival following treatment with nerve growth factor. *Transplantation* **81**, 519-24.

Miknyoczki, S. J., Wan, W., Chang, H., Dobrzanski, P., Ruggeri, B. A., Dionne, C. A. and Buchkovich, K. (2002). The neurotrophin-*trk* receptor axes are critical for the growth and progression of human prostatic carcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* **8**, 1924-31.

Missale, C., Codignola, A., Sigala, S., Finardi, A., Paez-Pereda, M., Sher, E. and Spano, P. F. (1998). Nerve growth factor abrogates the tumorigenicity of human small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5366-71.

Mohammed, R. A., Green, A., El-Shikh, S., Paish, E. C., Ellis, I. O. and Martin, S. G. (2007). Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer* **96**, 1092-100.

Mowla, S. J., Pareek, S., Farhadi, H. F., Petrecca, K., Fawcett, J. P., Seidah, N. G., Morris, S. J., Sossin, W. S. and Murphy, R. A. (1999). Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J Neurosci* **19**, 2069-80.

Murray, S. S., Perez, P., Lee, R., Hempstead, B. L. and Chao, M. V. (2004). A novel p75 neurotrophin receptor-related protein, NRH2, regulates nerve growth factor binding to the TrkA receptor. *J Neurosci* **24**, 2742-9.

Navarro-Tableros, V., Sanchez-Soto, M. C., Garcia, S. and Hiriart, M. (2004). Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* **53**, 2018-23.

BIBLIOGRAPHIE

- Naveilhan, P., Neveu, I., Baudet, C., Funakoshi, H., Wion, D., Brachet, P. and Metsis, M.** (1996). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of the low-affinity neurotrophin receptor. *Brain Res Mol Brain Res* **41**, 259-68.
- Nykjaer, A., Willnow, T. E. and Petersen, C. M.** (2005). p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 49-57.
- Odegaard, E., Staff, A. C., Abeler, V. M., Kopolovic, J., Onsrud, M., Lazarovici, P. and Davidson, B.** (2007). The activated nerve growth factor receptor p-TrkA is selectively expressed in advanced-stage ovarian carcinoma. *Hum Pathol* **38**, 140-6.
- Oelmann, E., Sreter, L., Schuller, I., Serve, H., Koenigsmann, M., Wiedenmann, B., Oberberg, D., Reufi, B., Thiel, E. and Berdel, W. E.** (1995). Nerve growth factor stimulates clonal growth of human lung cancer cell lines and a human glioblastoma cell line expressing high-affinity nerve growth factor binding sites involving tyrosine kinase signaling. *Cancer Res* **55**, 2212-9.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E. and Lisanti, M. P.** (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* **273**, 5419-22.
- Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K. K., Yung, W. H., Hempstead, B. L. and Lu, B.** (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* **306**, 487-91.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Bubici, C., Jayawardena, S., Alvarez, K., Matsuda, S., Nguyen, D. U., Pham, C. G., Nelsbach, A. H., Melis, T. et al.** (2004a). Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* **6**, 146-53.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C. and Franzoso, G.** (2004b). Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* **117**, 5197-208.
- Papatsoris, A. G., Liolitsa, D. and Deliveliotis, C.** (2007). Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **16**, 303-9.
- Park, J. A., Lee, J. Y., Sato, T. A. and Koh, J. Y.** (2000). Co-induction of p75NTR and p75NTR-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat. *J Neurosci* **20**, 9096-103.
- Perez-Pinera, P., Hernandez, T., Garcia-Suarez, O., de Carlos, F., Germana, A., Del Valle, M., Astudillo, A. and Vega, J. A.** (2007). The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Mol Cell Biochem* **295**, 19-26.
- Perez, P., Coll, P. M., Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D. and Chao, M. V.** (1995). NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol Cell Neurosci* **6**, 97-105.
- Pflug, B. R., Onoda, M., Lynch, J. H. and Djakiew, D.** (1992). Reduced expression of the low affinity nerve growth factor receptor in benign and malignant human prostate tissue and loss of expression in four human metastatic prostate tumor cell lines. *Cancer Res* **52**, 5403-6.
- Polyak, K. and Hahn, W. C.** (2006). Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* **12**, 296-300.
- Price, J. E., Polyzos, A., Zhang, R. D. and Daniels, L. M.** (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res* **50**, 717-21.
- Radeke, M. J., Misko, T. P., Hsu, C., Herzenberg, L. A. and Shooter, E. M.** (1987). Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* **325**, 593-7.

BIBLIOGRAPHIE

- Rajagopal, R., Chen, Z. Y., Lee, F. S. and Chao, M. V.** (2004). Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *J Neurosci* **24**, 6650-8.
- Ricci, A., Graziano, P., Mariotta, S., Cardillo, G., Sposato, B., Terzano, C. and Bronzetti, E.** (2005). Neurotrophin system expression in human pulmonary carcinoid tumors. *Growth Factors* **23**, 303-12.
- Ricci, A., Greco, S., Mariotta, S., Felici, L., Bronzetti, E., Cavazzana, A., Cardillo, G., Amenta, F., Bisetti, A. and Barbolini, G.** (2001). Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**, 439-46.
- Rocha, A. S., Risberg, B., Magalhaes, J., Trovisco, V., de Castro, I. V., Lazarovici, P., Soares, P., Davidson, B. and Sobrinho-Simoes, M.** (2006). The p75 neurotrophin receptor is widely expressed in conventional papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* **37**, 562-8.
- Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G. and Barde, Y. A.** (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* **4**, 487-92.
- Romero, C., Paredes, A., Dissen, G. A. and Ojeda, S. R.** (2002). Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* **143**, 1485-94.
- Ross, S. R.** (2008). MMTV infectious cycle and the contribution of virus-encoded proteins to transformation of mammary tissue. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **13**, 299-307.
- Roux, P. P. and Barker, P. A.** (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* **67**, 203-33.
- Roux, P. P., Bhakar, A. L., Kennedy, T. E. and Barker, P. A.** (2001). The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* **276**, 23097-104.
- Roy, P. G. and Thompson, A. M.** (2006). Cyclin D1 and breast cancer. *Breast* **15**, 718-27.
- Sakamoto, Y., Kitajima, Y., Edakuni, G., Sasatomi, E., Mori, M., Kitahara, K. and Miyazaki, K.** (2001). Expression of Trk tyrosine kinase receptor is a biologic marker for cell proliferation and perineural invasion of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep* **8**, 477-84.
- Salas, C., Julio-Pieper, M., Valladares, M., Pommer, R., Vega, M., Mastronardi, C., Kerr, B., Ojeda, S. R., Lara, H. E. and Romero, C.** (2006). Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 2396-403.
- Salehi, A. H., Roux, P. P., Kubu, C. J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L. L., Verdi, J. M. and Barker, P. A.** (2000). NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* **27**, 279-88.
- Schneider, M. B., Standop, J., Ulrich, A., Wittel, U., Friess, H., Andren-Sandberg, A. and Pour, P. M.** (2001). Expression of nerve growth factors in pancreatic neural tissue and pancreatic cancer. *J Histochem Cytochem* **49**, 1205-10.
- Schor, N. F.** (2005). The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol* **77**, 201-14.
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., Chretien, M. and Murphy, R. A.** (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* **314** (Pt 3), 951-60.

BIBLIOGRAPHIE

Shen, S. C., Huang, T. S., Jee, S. H. and Kuo, M. L. (1998). Taxol-induced p34cdc2 kinase activation and apoptosis inhibited by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human breast MCF-7 carcinoma cells. *Cell Growth Differ* **9**, 23-9.

Sheng, M. and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* **24**, 1-29.

Shipitsin, M. and Polyak, K. (2008). The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Invest* **88**, 459-63.

Shonukan, O., Bagayogo, I., McCrea, P., Chao, M. and Hempstead, B. (2003). Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin. *Oncogene* **22**, 3616-23.

Slamon, D. J. (1987). Proto-oncogenes and human cancers. *N Engl J Med* **317**, 955-7.

Snider, W. D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* **77**, 627-38.

Sole, C., Dolcet, X., Segura, M. F., Gutierrez, H., Diaz-Meco, M. T., Gozzelino, R., Sanchis, D., Bayascas, J. R., Gallego, C., Moscat, J. et al. (2004). The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kapp B signaling. *J Cell Biol* **167**, 479-92.

Sotiriou, C., Neo, S. Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S. B., Harris, A. L. and Liu, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10393-8.

Squinto, S. P., Stitt, T. N., Aldrich, T. H., Davis, S., Bianco, S. M., Radziejewski, C., Glass, D. J., Masiakowski, P., Furth, M. E., Valenzuela, D. M. et al. (1991). trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* **65**, 885-93.

Strande, V. k., Canelle, L., Tastet, C., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B. and Hondermarck, H. (2008). The proteome of the human breast cancer cell line MDA-MB-231: Analysis by LTQ-Orbitrap mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl* **Sous presse**.

Sun, L., Zhang, G., Li, Z., Lei, T., Huang, C., Song, T. and Si, L. (2008). Cellular distribution of tumour suppressor protein p53 and high-risk human papillomavirus (HPV)-18 E6 fusion protein in wild-type p53 cell lines. *J Int Med Res* **36**, 1015-21.

Suzuki, A., Tsutomi, Y., Yamamoto, N., Shibutani, T. and Akahane, K. (1999). Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. *Mol Cell Biol* **19**, 3842-7.

Tacconelli, A., Farina, A. R., Cappabianca, L., Desantis, G., Tessitore, A., Vetuschi, A., Sferra, R., Rucci, N., Argenti, B., Screpanti, I. et al. (2004). TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* **6**, 347-60.

Tacconelli, A., Farina, A. R., Cappabianca, L., Gulino, A. and Mackay, A. R. (2005). TrkAIII. A novel hypoxia-regulated alternative TrkA splice variant of potential physiological and pathological importance. *Cell Cycle* **4**, 8-9.

Tagliabue, E., Castiglioni, F., Ghirelli, C., Modugno, M., Asnaghi, L., Somenzi, G., Melani, C. and Menard, S. (2000). Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* **275**, 5388-94.

Taniuchi, M., Johnson, E. M., Jr., Roach, P. J. and Lawrence, J. C., Jr. (1986). Phosphorylation of nerve growth factor receptor proteins in sympathetic neurons and PC12

BIBLIOGRAPHIE

cells. In vitro phosphorylation by the cAMP-independent protein kinase FA/GSK-3. *J Biol Chem* **261**, 13342-9.

Teng, K. K. and Hempstead, B. L. (2004). Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci* **61**, 35-48.

Thompson, D. and Easton, D. (2004). The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 221-36.

Truzzi, F., Marconi, A., Lotti, R., Dallaglio, K., French, L. E., Hempstead, B. L. and Pincelli, C. (2008). Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* **128**, 2031-40.

Ultsch, M. H., Wiesmann, C., Simmons, L. C., Henrich, J., Yang, M., Reilly, D., Bass, S. H. and de Vos, A. M. (1999). Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J Mol Biol* **290**, 149-59.

Underwood, C. K., Reid, K., May, L. M., Bartlett, P. F. and Coulson, E. J. (2008). Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase. *Mol Cell Neurosci* **37**, 346-58.

Urfer, R., Tsoulfas, P., O'Connell, L., Shelton, D. L., Parada, L. F. and Presta, L. G. (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *Embo J* **14**, 2795-805.

Urrea, S., Escudero, C. A., Ramos, P., Lisbona, F., Allende, E., Covarrubias, P., Parraguez, J. I., Zampieri, N., Chao, M. V., Annaert, W. et al. (2007). TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal gamma-secretase-mediated release of the p75 intracellular domain. *J Biol Chem* **282**, 7606-15.

Vilar, M., Murillo-Carretero, M., Mira, H., Magnusson, K., Besset, V. and Ibanez, C. F. (2006). Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle. *Embo J* **25**, 1219-30.

Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M. et al. (2001). First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer. *Oncology* **61 Suppl 2**, 37-42.

Walch, E. T., Albino, A. P. and Marchetti, D. (1999). Correlation of overexpression of the low-affinity p75 neurotrophin receptor with augmented invasion and heparanase production in human malignant melanoma cells. *Int J Cancer* **82**, 112-20.

Wang, K. C., Kim, J. A., Sivasankaran, R., Segal, R. and He, Z. (2002). P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* **420**, 74-8.

Wang, X., Bauer, J. H., Li, Y., Shao, Z., Zetoune, F. S., Cattaneo, E. and Vincenz, C. (2001). Characterization of a p75(NTR) apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *J Biol Chem* **276**, 33812-20.

Watson, F. L., Porcionatto, M. A., Bhattacharyya, A., Stiles, C. D. and Segal, R. A. (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J Neurobiol* **39**, 323-36.

Weeraratna, A. T., Arnold, J. T., George, D. J., DeMarzo, A. and Isaacs, J. T. (2000). Rational basis for Trk inhibition therapy for prostate cancer. *Prostate* **45**, 140-8.

Wehrman, T., He, X., Raab, B., Dukipatti, A., Blau, H. and Garcia, K. C. (2007). Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* **53**, 25-38.

BIBLIOGRAPHIE

Wen, C. J., Xue, B., Qin, W. X., Yu, M., Zhang, M. Y., Zhao, D. H., Gao, X., Gu, J. R. and Li, C. J. (2004). hNRAGE, a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation. *FEBS Lett* **564**, 171-6.

Wiesmann, C., Ultsch, M. H., Bass, S. H. and de Vos, A. M. (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* **401**, 184-8.

Wooten, M. W., Seibenhener, M. L., Mamidipudi, V., Diaz-Meco, M. T., Barker, P. A. and Moscat, J. (2001). The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J Biol Chem* **276**, 7709-12.

Yamashita, T. and Tohyama, M. (2003). The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* **6**, 461-7.

Yamashita, T., Tucker, K. L. and Barde, Y. A. (1999). Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* **24**, 585-93.

Yan, H. and Chao, M. V. (1991). Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J Biol Chem* **266**, 12099-104.

Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J. J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C. A. et al. (1999). TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* **274**, 30202-8.

Yeiser, E. C., Rutkoski, N. J., Naito, A., Inoue, J. and Carter, B. D. (2004). Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in traf6^{-/-} mice. *J Neurosci* **24**, 10521-9.

Yuanlong, H., Haifeng, J., Xiaoyin, Z., Jialin, S., Jie, L., Li, Y., Huahong, X., Jiugang, S., Yanglin, P., Kaichun, W. et al. (2008). The inhibitory effect of p75 neurotrophin receptor on growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* **268**, 110-9.

Zhang, Y., Dang, C., Ma, Q. and Shimahara, Y. (2005). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human pancreatic cancer. *Oncol Rep* **14**, 161-71.

Zhu, Z., Friess, H., diMola, F. F., Zimmermann, A., Graber, H. U., Korc, M. and Buchler, M. W. (1999). Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol* **17**, 2419-28.

Zhu, Z., Kleeff, J., Kaye, H., Wang, L., Korc, M., Buchler, M. W. and Friess, H. (2002). Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog* **35**, 138-47.

Zhu, Z. W., Friess, H., Wang, L., Bogardus, T., Korc, M., Kleeff, J. and Buchler, M. W. (2001). Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* **7**, 105-12.

ANNEXE

ANNEXE

ANNEXE

Article 3:

Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-4/5 are involved in Breast Cancer

Ces travaux, auxquels j'ai collaborés, montrent que les neurotrophines BDNF et NT-4/5 contribuent à la progression du cancer du sein en conférant aux cellules cancéreuses une résistance à l'apoptose. Contrairement à la NT-3, le BDNF et la NT-4/5 sont exprimés par les cellules cancéreuses de sein et leur expression est exclusivement identifiée dans les cellules mammaires épithéliales de biopsies tumorales de sein. Seul le récepteur du BDNF et de la NT-4/5 sans activité catalytique intrinsèque, p75^{NTR}, est exprimé dans le cancer du sein. Enfin, la sécrétion du BDNF et de la NT-4/5 par les cellules mammaires stimule leur récepteur p75^{NTR} grâce auquel elles exercent leur action de facteur de survie à la fois *in vitro* et en modèle animal.

Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-4/5 are Expressed in Breast Cancer and Can Be Targeted to Inhibit Tumor Cell Survival

Elsa Vanhecke¹, Eric Adriaenssens¹, Samuel Meignan¹, Emmanuelle Germain¹, Nathalie Berteaux², Xuefen Le Bourhis¹ and Hubert Hondermarck^{1,*}

¹INSERM U908 "Growth factor signaling in breast cancer cells. Functional proteomics", IFR-147, University of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

²CNRS UMR 8161, Institute of Biology, 59000 Lille, France.

Short title: BDNF and NT-4/5 in breast cancer.

Key words: breast cancer / neurotrophins / tumor cell survival.

* **Corresponding author:** H. Hondermarck, INSERM U 908, batiment SN3, University of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel: 33 (0)3 20 43 40 97. hubert.hondermarck@univ-lille1.fr

FOOTNOTES

The abbreviations used are:

NT, neurotrophin, BDNF, brain-derived neurotrophic factor, NT-4/5, neurotrophin 4/5, NT-3, neurotrophin 3, NGF, nerve growth factor, p75NTR, neurotrophin receptor, TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TrkA, tropomyosin related kinase A, TrkB, tropomyosin related kinase B, TrkC, tropomyosin related kinase C, RT-PCR, retro transcription-polymerase chain reaction, HMEC, human mammary epithelial cells, TBS-T, Tris buffered saline-tween 20.

ABSTRACT

The identification of new molecular targets is key for the development of future and more efficient treatments for breast cancer. It has previously been shown that nerve growth factor, the prototypic neurotrophin, and its receptors TrkA and p75^{NTR}, are expressed in breast cancer, but the involvement of the other neurotrophins and corresponding receptors has not been reported. Here, we demonstrate that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-4/5 (NT-4/5), but not neurotrophin-3 (NT-3), are expressed in breast cancer cells, both in cell cultures and in tumor biopsies. In contrast, the expression of the corresponding tyrosine kinase receptors TrkB and TrkC was not detected. BDNF and NT-4/5 were found secreted by breast cancer cells, and their inhibition, using blocking antibodies, led to an increase in apoptosis, suggesting the existence of an autocrine prosurvival loop. RNA interference against p75^{NTR} totally abolished the BDNF and NT-4/5 anti-apoptotic effect and, in contrast, the use of pharmacological inhibitors K252 and PD98059 had no consequences, demonstrating the implication of p75^{NTR}, but not of the Trk receptors/MAPK pathway, in BDNF and NT-4/5 mediated prosurvival activity for breast cancer cells. Moreover, *in vivo*, immunodeficient mice xenografted with human breast cancer cells and treated with either anti-BDNF or anti-NT-4/5 blocking antibodies displayed inhibited tumor growth that was characterized by an increase in cancer cell apoptosis whereas cell proliferation was not affected. Together, these data demonstrate that BDNF and NT-4/5 are expressed in breast cancer, contribute to cancer cell survival through p75^{NTR}, and can eventually be targeted to inhibit tumor development.

INTRODUCTION

The neurotrophins constitute a family of structurally and functionally related polypeptides including the prototypic nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) and neurotrophin 4/5 (NT-4/5). They are primarily known to play an important role in the development and maintenance of the nervous system, where they stimulate neuronal cell survival, differentiation and plasticity (1). Neurotrophins have their activities mediated through two classes of cell surface receptors: the Trk tyrosine kinase receptors and the neurotrophin receptor p75^{NTR}. NGF preferentially binds TrkA, whereas BDNF and NT-4/5 bind TrkB. NT-3 primarily binds TrkC, but also TrkA and TrkB to a lesser extent (2). In contrast, all neurotrophins bind and activate p75^{NTR}, a member of the Tumor Necrosis Factor-receptor superfamily (3). Interestingly, non neuronal cells can also eventually respond to neurotrophins, in both healthy tissues and in disease states, and in addition to their involvement in neuroblastomas and glioblastomas, several studies have also suggested the influence of neurotrophins and their receptors in non neuronal cancer (4, 5). Indications that neurotrophins and their receptors can participate in tumorigenesis include data from Wilm's tumors (6), medullary thyroid carcinoma (7), prostatic cancer (8), melanoma (9), myeloma (10), as well as pancreatic (11-13), ovarian (14, 15) and hepatocellular (16) carcinomas.

In breast cancer, it has previously been described that NGF is able to stimulate proliferation and survival of breast tumor cells through the activation of TrkA and p75^{NTR} respectively (17-21). In addition, NGF cooperates with HER2 to activate breast cancer cell growth (22) and the anti-estrogen drug tamoxifen, which is widely used in breast cancer therapy, is able to inhibit the mitogenic effect of NGF (23). Given TrkA and p75^{NTR} expression in breast tumor cells (24-26), the recent demonstration that NGF is overexpressed in the majority of human breast tumors and that its inhibition can result in a diminished tumor growth in preclinical models

(27), pointed to the potential value of NGF as a therapeutic target. Although it has previously been shown that exogenously added BDNF, NT-4/5 or NT-3 can have an anti-apoptotic effect on breast cancer cells in vitro (18), no studies have investigated the possible expression of these neurotrophins in breast cancer and the potential subsequent impact on breast cancer cell growth.

Here, we report for the first time that BDNF and NT-4/5 are expressed and secreted by breast cancer cells, whereas NT-3 is not. BDNF and NT-4/5 can act as anti-apoptotic factors through p75^{NTR}, whereas TrkB and TrkC are not expressed. In addition, we have shown that targeting BDNF or NT-4/5 resulted in a decrease in breast cancer cell survival. These results demonstrate that BDNF and NT-4/5 can contribute to the progression of breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Cell culture reagents were purchased from BioWhittaker except foetal bovine serum (Perbio), culture medium (Cambrex), fibronectin (Falcon-Biocoat), insulin and transferrin (Sigma). The flasks and Petri dishes were obtained from Starstedt (Fisher-Scientific). Recombinant human neurotrophins, Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) were from R & D Systems. Antibodies used for immunostaining were rabbit polyclonal anti-BDNF, anti-NT-3, anti-NT-4/5, anti-TrkB and anti-TrkC from Santa Cruz Biotechnology, p75^{NTR} antibody from Promega, anti-actin from Sigma, and secondary antibodies from Jackson laboratories. ECL reagents were obtained from Pierce Interchim. Neutralizing anti- NT-4/5 and BDNF antibodies were from R&D systems. K252a and PD98059 were obtained from Calbiochem. RNA and histological slides of breast tumor biopsies were from CliniSciences. Hoechst 33342, electrophoresis reagents and chemicals were from Sigma, solvent from Fluka and Glycergel from Dako. DNase and Retro-Transcription reagents were from Invitrogen (Fisher-Scientific) and the Quantitect SYBR®Green PCR kit, used for real time PCR, was obtained from Qiagen. Primers for BDNF, NT-3, NT-4/5, p75^{NTR}, TrkB and RPLP0 were from Eurogentec, primers for TrkC from Qiagen. Molecular weight standards were obtained from Fermentas.

Cell culture. The human breast epithelial cell lines (MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, BT-20 and MCF-10A) and the human neural precursor cells NTERA-2 cl.D1 (NT2/D1) derived from the NT-2 teratocarcinoma were obtained from the American Type Culture Collection. The Human Mammary Epithelial cells (HMEC) were from Cambrex. MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, BT-20, MCF-10A, were routinely grown in monolayer cultures as described previously (19). HMEC and NT2/D1 were grown in conditions given by the supplier. To obtain

conditioned media, MCF-7, MDA-MB-231 and HMEC were plated in 175 cm² flasks. When they reached confluence, they were washed and incubated in basal medium. Two hours later, the basal medium was changed and cells were further cultured for 24 h. The medium was then collected, concentrated with column (Amicon) and stored at -80°C prior to use. To test neurotrophins activities, breast cancer cells were transfected by nucleofection (Amaxa) with siRNA against p75^{NTR} 5'-AUGCCUCCUUGGCACCUCC-3' and 5'-GGAGGUGCCAAGGAGGCAU-3' or control siRNA 5'-GCUGACCCUGAAGUUCAUC-3' and 5'-GAUGAACUUCAGGGUCAGC-3'. 48h after transfection, apoptosis of breast cancer cells was induced by TRAIL, which is pro-apoptotic for breast cancer cells, at 5 ng/ml for 6 h in serum free medium. To evaluate the anti-apoptotic activity of exogenous neurotrophins, we used the concentration of 200 ng/ml with or without pharmacological inhibitors: 10nM K252a (inhibitor of Trk receptors) or 20µM PD98059 (inhibitor of the MAP-Kinases). Anti-apoptotic activity of endogenous neurotrophins was tested using BDNF and NT-4/5 neutralizing antibodies (R&D systems) or non relevant antibodies as control, diluted at 1µg/ml in serum free medium 45 min before inducing apoptosis with TRAIL. For determination of apoptotic cell percentage, all cells (adherent and non adherent) were fixed with cold methanol (-20°C) during 20 min and washed with phosphate-buffered saline (PBS) after staining with 1 µg/ml Hoechst 33342, for 15 min at room temperature in the dark. The apoptotic cells, exhibiting condensed and fragmented nuclei, were counted under a Leica fluorescence microscope in randomly selected fields. A minimum of 500-1000 cells was examined for each condition, and results were expressed as a ratio of the total number of counted cells.

Real time RT-PCR. Total RNA from cells were isolated with TriReagent® (Euromedex) and RNA from cells and biopsies treated with DNase. RNA from breast tumor tissues

corresponded to 1 fibroadenoma, 1 ductal carcinoma *in situ*, 1 adenocarcinoma, 3 invasive ductal carcinomas, 2 invasive lobular carcinomas, 1 mixed ductal and lobular carcinoma and 1 medullary carcinoma. Reverse transcription was performed with 1 µg of RNAs, 0.5 µg of random hexamers, 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase for 10 min at 25°C, 50 min at 37°C and 15 min at 70°C in a final volume of 20 µl. Real time PCR amplifications were performed using a Quantitect SYBR®Green PCR kit with 2 µl of 1/10 cDNA and 500 nM of primers. The primers used were as follows: for *NT-3* transcript 5'-TGGCATCCAAGGTAACAACA-3' and 5'-CTCTGTTGTCGCAGCAGTTC-3' ; *NT-4/5* 5'-AGGCCAAGCAGTCCTATGT-3' and 5'-GGTCTCTCAGCATCCAGCT-3' ; *BDNF* 5'-TGGCTGACACTTTCGAACAC-3' and 5'-CCTCATGGACATGTTTGCAG-3'; *p75^{NTR}* 5'-ACGGCTACTACCAGGATGAG-3' and 5'-TGGCCTCGTCGGAATACGTG-3'; *TrkB* 5'-AGGGCAACCCGCCACGGAA-3' and 5'-GGATCGGTCTGGGGAAAAGG-3', *TrkC* primers were Quantitect® Primer Assay: QT00052906 (Qiagen) and for *RPLP0* (human acidic ribosomal phosphoprotein P0), which was used as a reference gene: 5'-GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT-3' and 5'-GATGACCAGCCCAAAGGAGA-3'. The subsequent PCR conditions were carried out in the following manner: 95°C for 15s, 60°C (or 55°C for Quantitect® Primer Assay) for 20 s, and 72°C for 30 s. Data were analyzed using the MX4000 PCR system software (Stratagene) with the SYBRGreen option (with dissociation curves). Standard curves were performed on serial dilutions of genomic human DNA or RT-transcripts. Values were obtained by the calculation methodology recommended by Pfaffl *et al* (28) : $\text{ratio} = (\text{cycle number} - b/a)_{\text{target}} / (\text{cycle number} - b/a)_{\text{reference}}$ (where a = slope of the standard curve and b = ordinate of origin). In real time PCR, Ct (Cycle threshold) is defined as the number of cycles required for the accumulation of a fluorescent signal (corresponding to the accumulation of PCR product) to cross the threshold. Here, the ΔCt corresponding to (Ct interest gene – Ct reference gene) is added for information.

Western-blotting. Protein extraction of subconfluent cells was performed in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% NP-40, 1 mM permethylsulfonate, 1 mM orthovanadate, 1% SDS, 1% protease inhibitors) at 4 °C. Insoluble material was removed by centrifugation at 4°C for 15 min at 10,000 g after proteins boiling at 95°C for 5 min. Total protein concentration was determined using BCA assay (Sigma). 50 µg of lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels (12.5% for NT and 7.5% for receptors), transferred onto a nitrocellulose membrane (0.45µm) (Scheilcher & Shuell) in transfer buffer (48 mM Tris-Base, 39 mM glycine, 0.0375% SDS, 20% (v/v) methanol) and blocked for 2h at room temperature in Tris-buffered saline with Tween-20 (TBS-T) (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20) and 5% BSA or skimmed milk. Incubation with primary antibodies was performed in blocking buffer overnight at 4°C. After washing with TBS-T, the membranes were incubated with anti-rabbit IgG peroxidase antibody (Jackson laboratories 1:10,000) for 1 h at room temperature. The reaction was revealed using the chemiluminescence kit West Pico chemiluminescent substrate (Pierce) and Hyperfilm™ (Amersham Biosciences).

Immunohistochemistry. Analysis of tumor biopsies was performed using tissue arrays (Superbiochips, Clinisciences), with TSA biotin system kit (PerkinElmer), according to the manufacturer's instructions. Anti-neurotrophins rabbit polyclonal antibodies (Santa Cruz) were used at dilution 1/200 in blocking buffer, overnight at 4°C, in a moist chamber. After several washes, slides were incubated for 1 h with a secondary biotinylated goat anti-rabbit antibody (BD Pharmingen) at a final dilution of 1/200 in blocking buffer at 37°C. After revelation of immunolabelling, sections were counterstained with hematoxylin to contrast cell nuclei and slides were then coverslipped and observed using a Leica light microscope.

Photomicrographs were taken with a phase-contrast microscope connected to an Olympus optical Camedia digital camera. Negative controls were obtained by exclusion of the primary antibodies.

Tumor xenograft growth in immunodeficient mice. Six-week-old female severe combined immunodeficient (SCID) mice were purchased from Charles River Laboratories and acclimatized for at least 2 weeks. Mice were maintained under a 12 h light/dark cycle at a temperature of 20 to 22°C. Food and water were available *ad libitum*. Mice were maintained in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee procedures and guidelines. MDA-MB-231 cells were harvested and resuspended in PBS before subcutaneous injection into flanks (4×10^6 cells per flank) of the animals. Three days after cell injection, anti-NT-4/5 and anti-BDNF treatments were applied every 3 days. 12.5 μg of antibodies (BDNF: Mab 258; NT-4/5: AF-268-NA from R&D Systems), were injected as close as possible to the tumor. The tumor volume was determined every 3 days by measuring the length (l) and width (w) and then calculating the volume as $\pi/6 \times l \times w \times (l+w)/2$. Eight animals were used in each group. For determination of index labelling, anti-PCNA (Pharmingen) was used for the determination of proliferating cells, and cell apoptosis was measured using terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labelling (TUNEL, Roche).

Statistics. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SD). Statistical significance between two groups was evaluated using Student's t test. Asterisks in figures indicate significant difference between the test group and the control group, within time point or condition, one asterisk means $p < 0.05$, two asterisks mean $p < 0.01$.

RESULTS

Neurotrophin and receptor expression in breast cancer cells. The expression of BDNF, NT-3, NT-4/5, TrkB and TrkC and p75^{NTR} was examined, in breast cancer cell lines MDA-MB-231, MCF-7, T-47D, BT-20 and normal breast epithelial cells MCF-10A and HMEC, using real time RT-PCR and immunoblotting. The results (Fig. 1A) indicated that these cell lines expressed both BDNF and NT-4/5 transcripts, visualized at 200 pb and 164 pb respectively after RT-PCR. In the same way, all breast epithelial cells, except MCF-10A, expressed the neurotrophin receptor p75^{NTR} which was amplified at 147 pb, whereas TrkB was not detected. NT-3, detected at 249 pb was much less or not expressed, depending on cell types, and its tyrosine kinase receptor TrkC was undetectable in any of the tested cell lines. For detection of TrkB, TrkC and NT-3, neuronal NT2/D1 cells were used as positive control. Relative mRNA quantifications and Δ Ct (cycle threshold), obtained for each neurotrophin and for p75^{NTR}, are shown in Fig. 1B. Western-blotting on total cell lysates revealed 14 kDa bands corresponding to BDNF and NT-4/5 in all cell types tested (Fig. 1C). In contrast, NT-3 was not detected at the protein level, in line with the low level or absence of mRNA detection. Receptor expression profiles were also tested by western-blotting and a 75 kDa band, corresponding to p75^{NTR}, was detected in all cell types except MCF-10A (Fig. 1C). Neither TrkB nor TrkC were detected at the protein level, once again confirming data from RT-PCR analysis. In addition, results presented in Fig. 1D show that BDNF and NT-4/5 were detected in the conditioned media from both normal and breast cancer cells, indicating that these neurotrophins are secreted by breast epithelial cells and breast cancer cells.

Neurotrophin and receptor expression in breast tumors. Expression of neurotrophins and associated receptors mRNA was also detected by real time RT-PCR in a pilot series of 10 breast tumor biopsies and a series of 45 breast tumors was analyzed by

immunohistochemistry. The results presented in Fig. 2A show that NT-4/5 and p75^{NTR} transcripts were present in all biopsies studied. BDNF was detected in 6/10 tumors. We have then determined the relative quantification of BDNF, NT-4/5 and p75^{NTR} expression in these 10 biopsies. Fig. 2B shows that the mRNA rates were very variable within the 10 biopsies, confirming the well known molecular heterogeneity among mammary tumors (Fig. 2B). To study the distribution of BDNF and NT-4/5, breast tissue arrays corresponding to 45 breast tumor samples were analysed by immunohistochemistry. Fig. 2C summarizes the results obtained with the different spots of tissue for each tumor. The staining intensities for NT-4/5 and BDNF were concentrated in the epithelial cancer cells and were slightly, but significantly, elevated in cancer biopsies compared to normal tissues, whatever breast cancer type. The levels of NT-4/5 and BDNF were estimated by microscopic observation and breast tissues were classified into four different categories depending on the intensity of labelling (Table 1). The results show no apparent relationship between the level of any neurotrophin with stage, node invasion, estrogen or progesterone receptors and p53 levels, indicating no correlation with classical clinicopathological factors. These data show that BDNF, NT-4/5 and p75^{NTR} are expressed in tumor epithelial cells of mammary tumors.

Biological effect of BDNF and NT-4/5 on breast cancer cells. As BDNF and NT-4/5 were found expressed in breast cancer cells, we have tested their effect on cell survival, proliferation and migration. First, our data indicated no effect of exogenously added neurotrophins on cell proliferation and migration (data not shown), whereas an anti-apoptotic effect was observed, confirming previous data (18). The two exogenously added neurotrophins exhibited a rescue effect on TRAIL-treated MCF-7 cells (Fig. 3A). MDA-MB-231 cells were also tested and the same survival effect of BDNF and NT-4/5 was obtained (data not shown). Interestingly, siRNA against p75^{NTR} totally abolished the NT-4/5 and

BDNF anti-apoptotic effect and even increased the apoptosis rate compared to siRNA control (Fig. 3A and 3B). Moreover, the Trk pharmacological inhibitors K252a, and the MEK inhibitor PD98059, had no effect on apoptosis induced by siRNA anti p75^{NTR} and on neurotrophin survival effect, confirming the non-involvement of Trk receptors in BDNF and NT-4/5 activities in breast cancer cells. The control of siRNA efficacy in depleting p75^{NTR} mRNA is shown in Fig. 3C.

More importantly, we have then tested the effect of endogenous NT-4/5 and BDNF on breast cancer cell growth, both *in vitro* and *in vivo*, through a strategy of inhibition utilizing blocking antibodies. Importantly, in the absence of exogenous neurotrophins, the addition of neutralizing anti-NT-4/5 or anti-BDNF resulted in the inhibition of cell survival, as we observed a significant increase in the number of apoptotic nuclei (Fig. 3D). In the same experimental conditions, antibodies against NT-3 had no effect (data not shown). These data suggested an autocrine loop of BDNF and NT-4/5 resulting in the stimulation of breast cancer cell growth. This hypothesis was confirmed *in vivo*, with the highly tumorigenic breast cancer cells MDA-MB-231 which were xenografted in SCID mice. The results indicated that treatments with anti NT-4/5 or anti-BDNF induced an inhibition of tumor growth, resulting in a decrease of final tumor size (Fig. 4A and 4B). In addition, the proliferative and apoptotic rates in tumors were assessed by immunohistochemistry with anti-PCNA antibodies and TUNEL staining (Fig. 4C) and the number of brown TUNEL or PCNA labeled nuclei was counted in each condition. The results, synthesized in Fig. 4D, revealed an increase of apoptosis in tumor cells treated with antibodies against neurotrophins, whereas no significant modification of proliferation was observed. Together, these data indicate that BDNF and NT-4/5 can stimulate breast tumor cell survival and resistance to apoptosis.

DISCUSSION

Our results show for the first time that BDNF and NT-4/5 are expressed in breast cancer cells. BDNF and NT-4/5 mRNA were found in all tested mammary epithelial cell lines. This was confirmed at the protein level for which BDNF and NT-4/5 expression and release were clearly observed, whereas no NT-3 protein was detected in any of the cell lines tested. Together, expression pattern analysis, in both cell lines and tissue biopsies, revealed a widespread expression of BDNF and NT-4/5 in both cancerous and non-cancerous samples. Thus, unlike NGF which is overexpressed in breast cancer cells (19), NT-4/5 and BDNF are also synthesized and secreted by normal breast epithelial cells, and in consequence, they cannot be proposed as new biomarkers for breast cancer. Considering the levels of immunoreactivity in tumor biopsies, and the strong staining of these growth factors in breast metastatic tissue (lymph node), they may well be related to tumor aggressiveness, albeit we have as yet established no relationship with any known prognostic factor. Therefore, although prognostic value was not shown here, we have established that BDNF and NT-4/5 expression occurs in all breast cancer subtypes.

In contrast to BDNF and NT-4/5, the corresponding tyrosine kinase receptor TrkB was not detected. The implication of TrkB in neuronal and non neuronal cancer is largely documented. Indeed, TrkB is overexpressed in some cancers like neuroblastoma (29), prostate adenocarcinoma (30), Wilm's tumors (31), pancreatic adenocarcinoma (11, 12), myeloma (32), and is able to increase resistance to chemotherapy, and eventually to promote tumor invasion, proliferation and neoangiogenesis. In further support for a role in metastasis, TrkB acts in some cases as a mediator of anoikis resistance, which is believed to be a contributing factor (33, 34). However, in breast cancer, TrkB expression has never been investigated and in our study we have shown that TrkB was not expressed in breast cancer cells. Similarly,

TrkC was also not detected in breast cancer cells, confirming observation made in pancreatic cancer cells (11). In contrast, the other receptor for BDNF and NT-4/5, p75^{NTR}, had already been shown to be expressed in breast tumors where it could be related to prognosis (24-26), and we confirmed here the expression of p75^{NTR} in breast cancer cell lines and tumors. Together, our data indicated that p75^{NTR} is the predominant receptor form for BDNF and NT-4/5 in breast cancer, and the biological effect of these neurotrophins has therefore to be interpreted in this context.

Several neurotrophic growth factor receptors are now known for their biological impact in carcinogenesis (4). In neuroblastoma, TrkAIII splice variant is able to act as a stimulator (35), and the BDNF/TrkB axis enhances neuroblastoma cell survival, resistance to chemotherapy and tumor progression (36-39). In breast cancer, the expression of NGF and glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) increases proliferation, survival and breast cancer cell scattering (27, 40). In the present study, we show that BDNF and NT-4/5 stimulation rescued breast cancer cells from apoptosis, via p75^{NTR}, and therefore they can be considered as survival factors for breast cancer cell. The pharmacological inhibitors of Trk and MEK had no consequence on BDNF and NT-4/5 survival effect of breast cancer cells, reinforcing the idea that Trk receptors are not involved in BDNF and NT-4/5 anti-apoptotic effect. Therefore there is a striking difference with NGF, which acts on breast cancer cells through p75^{NTR} plus TrkA (18, 26), inducing both anti-apoptotic and proliferative effects respectively. The p75^{NTR} receptor binds all neurotrophins with the same affinity and regulates neuronal cell apoptosis/survival balance (41). In carcinogenesis, p75^{NTR} seems to be ambivalent, since it is, on one hand, correlated to the development of melanoma through an increase of cell invasion, survival and brain metastasis (9, 42) and, on the other hand, it acts as an inhibitor in prostate, gastric and hepato carcinomas (43-45). In our experiments, the inhibition of p75^{NTR} with specific siRNA totally abolished the BDNF and NT-4/5 anti-apoptotic/prosurvival effect. In

addition, abolition of p75^{NTR} further increased the basal level of TRAIL induced apoptosis of mammary cancer cells, suggesting an endogenous stimulation of p75^{NTR} through BDNF and NT-4/5 secretion in breast cancer cells. This strongly suggested the existence of a BDNF and NT-4/5 mediated autocrine loop for the stimulation of breast cancer cells. This hypothesis was reinforced by our *in vivo* experiments, with tumor cell xenograft in immunodeficient mice, in which blocking anti-BDNF and anti-NT-4/5 were able to decrease tumor growth. Interestingly, immunohistochemical analysis revealed that anti-BDNF or anti-NT-4/5 treatments induced an increase in tumor cell apoptosis with no effect on the rate of cell proliferation. Therefore, both *in vitro* and *in vivo* experiments contributed to demonstrate the impact of BDNF and NT-4/5 on breast cancer cell survival.

In conclusion, our study demonstrates that BDNF and NT-4/5 are involved in breast cancer. Although further pharmacological and clinical investigations will be needed, the stimulation of breast cancer cell survival by BDNF and NT-4/5, through p75^{NTR}, suggests a potential value as therapeutic targets that may offer new perspectives for the design of innovative therapeutic strategies.

REFERENCES

1. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:299-309.
2. Huang EJ and Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003;72:609-42.
3. Lu B, Pang PT, and Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:603-14.
4. Kruttgen A, Schneider I, and Weis J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain Pathol* 2006;16:304-10.
5. Sariola H. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1061-6.
6. Donovan MJ, Hempstead B, Huber LJ, et al. Identification of the neurotrophin receptors p75 and trk in a series of Wilms' tumors. *Am J Pathol* 1994;145:792-801.
7. McGregor LM, McCune BK, Graff JR, et al. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4540-5.
8. Dalal R and Djakiew D. Molecular characterization of neurotrophin expression and the corresponding tropomyosin receptor kinases (trks) in epithelial and stromal cells of the human prostate. *Mol Cell Endocrinol* 1997;134:15-22.
9. Truzzi F, Marconi A, Lotti R, et al. Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* 2008;128:2031-40.
10. Pearse RN, Swendeman SL, Li Y, et al. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* 2005;105:4429-36.
11. Ketterer K, Rao S, Friess H, et al. Reverse transcription-PCR analysis of laser-captured cells points to potential paracrine and autocrine actions of neurotrophins in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:5127-36.

12. Miknyoczki SJ, Lang D, Huang L, et al. Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *Int J Cancer* 1999;81:417-27.
13. Zhu Z, Kleeff J, Kayed H, et al. Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog* 2002;35:138-47.
14. Campos X, Munoz Y, Selman A, et al. Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2007;104:168-75.
15. Davidson B, Reich R, Lazarovici P, et al. Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:2248-59.
16. Yang ZF, Ho DW, Lam CT, et al. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:219-25.
17. Descamps S, Lebourhis X, Delehedde M, et al. Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:16659-62.
18. Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, et al. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 2001;276:17864-70.
19. Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, et al. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22:5592-601.
20. El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Dolle L, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278:16952-6.
21. Naderi A, Teschendorff AE, Beigel J, et al. BEX2 is overexpressed in a subset of primary breast cancers and mediates nerve growth factor/nuclear factor-kappaB inhibition of apoptosis in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2007;67:6725-36.
22. Tagliabue E, Castiglioni F, Ghirelli C, et al. Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000;275:5388-94.

23. Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, et al. Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* 2001;61:3002-8.
24. Aragona M, Panetta S, Silipigni AM, et al. Nerve growth factor receptor immunoreactivity in breast cancer patients. *Cancer Invest* 2001;19:692-7.
25. Davidson B, Reich R, Lazarovici P, et al. Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004;83:119-28.
26. Descamps S, Pawlowski V, Revillion F, et al. Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:4337-40.
27. Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, et al. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:346-51.
28. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
29. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, et al. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 1994;14:759-67.
30. Dionne CA, Camoratto AM, Jani JP, et al. Cell cycle-independent death of prostate adenocarcinoma is induced by the trk tyrosine kinase inhibitor CEP-751 (KT6587). *Clin Cancer Res* 1998;4:1887-98.
31. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol* 2001;19:689-96.
32. Sclabas GM, Fujioka S, Schmidt C, et al. Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:440-9.
33. Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, et al. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 2004;430:1034-9.
34. Geiger TR and Peeper DS. Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis. *Cancer Res* 2007;67:6221-9.

35. Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, et al. TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 2004;6:347-60.
36. Ho R, Eggert A, Hishiki T, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res* 2002;62:6462-6.
37. Li Z, Jaboin J, Dennis PA, et al. Genetic and pharmacologic identification of Akt as a mediator of brain-derived neurotrophic factor/TrkB rescue of neuroblastoma cells from chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 2005;65:2070-5.
38. Li Z, Zhang J, Liu Z, et al. Downregulation of Bim by brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from paclitaxel but not etoposide or cisplatin-induced cell death. *Cell Death Differ* 2007;14:318-26.
39. Schulte JH, Schramm A, Klein-Hitpass L, et al. Microarray analysis reveals differential gene expression patterns and regulation of single target genes contributing to the opposing phenotype of TrkA- and TrkB-expressing neuroblastomas. *Oncogene* 2005;24:165-77.
40. Essegir S, Todd SK, Hunt T, et al. A role for glial cell derived neurotrophic factor induced expression by inflammatory cytokines and RET/GFR alpha 1 receptor up-regulation in breast cancer. *Cancer Res* 2007;67:11732-41.
41. Nykjaer A, Willnow TE, and Petersen CM. p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 2005;15:49-57.
42. Marchetti D, Aucoin R, Blust J, et al. p75 neurotrophin receptor functions as a survival receptor in brain-metastatic melanoma cells. *J Cell Biochem* 2004;91:206-15.
43. Jin H, Pan Y, Zhao L, et al. p75 neurotrophin receptor suppresses the proliferation of human gastric cancer cells. *Neoplasia* 2007;9:471-8.
44. Papatsoris AG, Liolitsa D, and Deliveliotis C. Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2007;16:303-9.
45. Yuanlong H, Haifeng J, Xiaoyin Z, et al. The inhibitory effect of p75 neurotrophin receptor on growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2008;268:110-9.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée 2009), le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Région Nord/Pas-de-Calais. Elsa Vanhecke was the recipient of a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). We thank Prof. Philippe Delannoy (University of Lille, France) for the use of Mx4000 and Nanodrop apparatus.

Clinicopathological factors	NT-4/5							BDNF							
	labelling intensity				Mean	SD	labelling intensity				Mean	SD			
	0	1	2	3			0	1	2	3					
Breast Normal tissues	(n=9)	1	4	4	0	1.3	0.7	(n=9)	1	4	2	2	1.6	1.0	
Breast Cancer tissues	(n=35)	2	5	11	17	2.2	0.9	(n=36)	3	10	13	10	1.8	0.9	
Breast cancer metastatic tissues (lymph node)	(n=9)	0	2	5	2	2.0	1.0	(n=9)	0	1	4	4	2.3	0.7	
cancer + metastase	(n=44)	2	7	16	19	2.2	0.9	(n=45)	3	11	17	14	1.9	0.9	
Stage	0	(n=2)	0	0	0	2	3.0	0.0	(n=2)	0	0	2	0	2.0	0.0
	I	(n=0)	0	0	0	0	0.0	0.0	(n=0)	0	0	0	0	0.0	0.0
	II	(n=15)	0	2	5	8	2.4	0.7	(n=15)	1	2	4	8	2.3	0.9
	III	(n=27)	2	5	11	9	2.0	0.9	(n=28)	2	9	11	6	1.8	0.9
Estrogen receptors	+	(n=25)	2	4	7	12	2.2	1.0	(n=25)	3	4	9	9	2.0	1.0
	-	(n=19)	0	3	9	7	2.2	0.7	(n=20)	0	7	8	5	1.9	0.8
Progesterone receptors	+	(n=18)	1	2	6	9	2.3	0.9	(n=18)	2	1	7	8	2.2	1.0
	-	(n=25)	1	5	10	9	2.1	0.8	(n=26)	1	10	10	5	1.7	0.8
Lymph nodes status	+	(n=32)	2	5	12	13	2.1	0.9	(n=33)	2	10	11	10	1.9	0.9
	-	(n=12)	1	2	3	6	2.2	1.0	(n=11)	1	1	5	4	2.1	0.9
P53	+	(n=18)	1	2	8	7	2.2	0.8	(n=17)	1	6	4	6	1.9	1.0
	-	(n=26)	1	5	8	12	2.2	0.9	(n=28)	2	5	13	8	2.0	0.9

Table 1: NT-4/5 and BDNF expression compared to clinicopathological factors. The intensity of anti-NT-4/5 and anti-BDNF immunohistological staining in breast tumor biopsies (Fig. 3A) was estimated from 0 (no staining) to 3 (intense staining). For a few patients, some clinicopathological evaluations failed, and consequently, the total number of cases can differ from 44 and 45 for NT-4/5 or BDNF. For each tissue sample, the following clinicopathological information was obtained: stage (from the TNM classification of the UICC; ranging from 0 to III), hormone receptor status (estrogen receptor and progesterone receptor), lymph node and p53 status.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Expression of neurotrophins and their receptors in breast cancer cells *in vitro*.

A, Total RNA from breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF-7, T-47D, BT-20) and noncancerous breast epithelial cells (MCF-10A and HMEC), plus the neuronal NT2/D1 as control, were isolated and reverse-transcribed. Real time PCR amplifications of BDNF, NT-3, NT-4/5, p75^{NTR}, TrkB, TrkC, and RPLP0 as loading control, were migrated in 2 % agarose gel. **B**, mRNA relative quantification for BDNF, NT-3, NT-4/5 and p75^{NTR} in breast cancer cells were calculated as explained in Material and Methods. The ΔC_t are indicated. The control represents value obtained for the NT2/D1 cells and are adjusted to 100 for all genes studied. The histograms for TrkB and TrkC were not presented here because their expression was not found in any cell type. **C**, Protein extracts of various cells were processed for Western blotting using anti-neurotrophins (anti-BDNF, anti-NT-3, anti-NT-4/5) and anti-receptors (anti-p75^{NTR}, anti-TrkB, anti-TrkC) antibodies. Recombinant proteins or NT2/D1 cells served as positive control and an anti-actin antibody was used for equiloading control. **D**, Secretion of BDNF and NT-4/5 by breast epithelial cells. Immunoblotting of conditioned media from MDA-MB-231, MCF-7 cells and HMEC were performed using anti-BDNF and anti-NT-4/5 antibodies, recombinant BDNF and NT-4/5 proteins were used as control.

Figure 2. Expression of neurotrophins and their receptors in breast tumors.

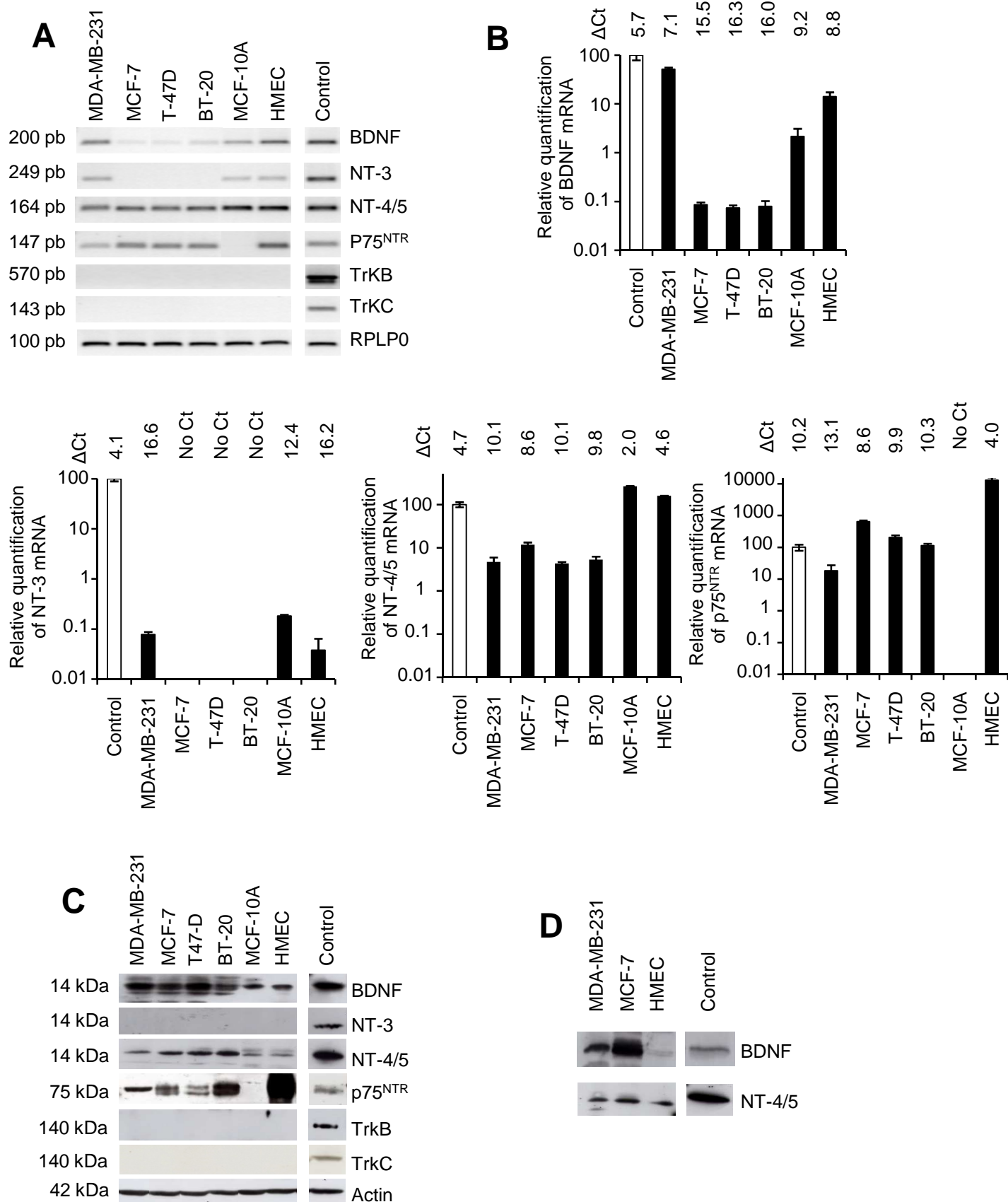
A, Total RNA from 10 breast tumors were reverse-transcribed as described in "Material and Methods". Real time PCR amplifications of BDNF, NT-4/5, p75^{NTR} and RPLP0 as loading control, were migrated in 2 % agarose gel. **B**, Relative quantification of neurotrophins and receptor mRNA expression. The ΔC_t are indicated. **C**, Immunohistochemistry of BDNF and NT-4/5 in breast tumors. Antibodies against BDNF and NT-4/5 were used on breast tissue arrays. Specific

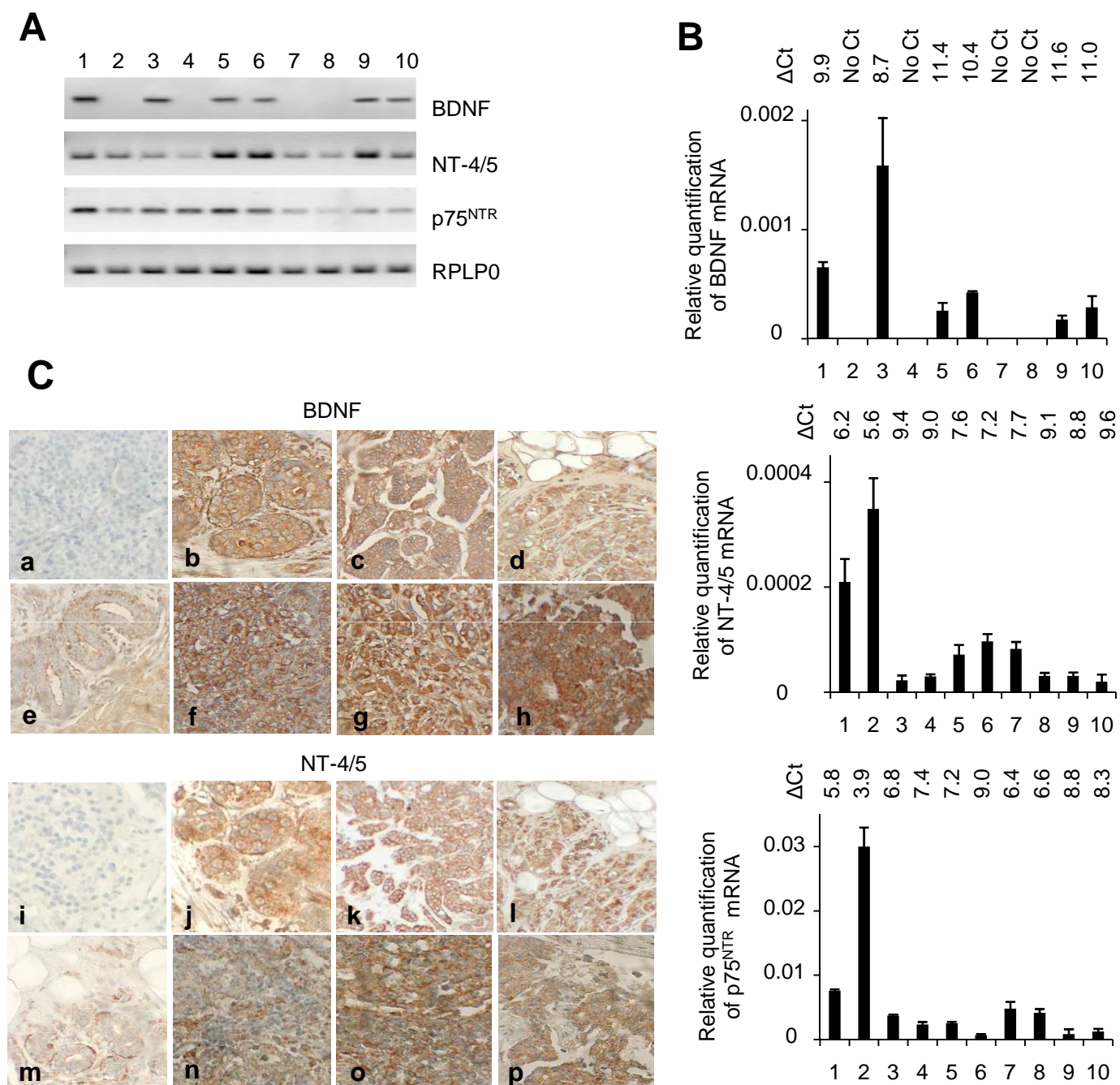
immunoreactivity was observed for all histological types of breast cancer compared to normal breast tissues (e, m) or control without primary antibody (a, i). b, j: ductal carcinoma *in situ*; c, k: infiltrating ductal carcinoma; d, l: infiltrating lobular carcinoma; f, n: metastatic atypical medullary carcinoma in lymph node; g, o: metastatic infiltrating ductal carcinoma in lymph node; h, p: metastatic infiltrating lobular carcinoma in lymph node. Relative quantification of immunostaining intensities are presented in Table 1.

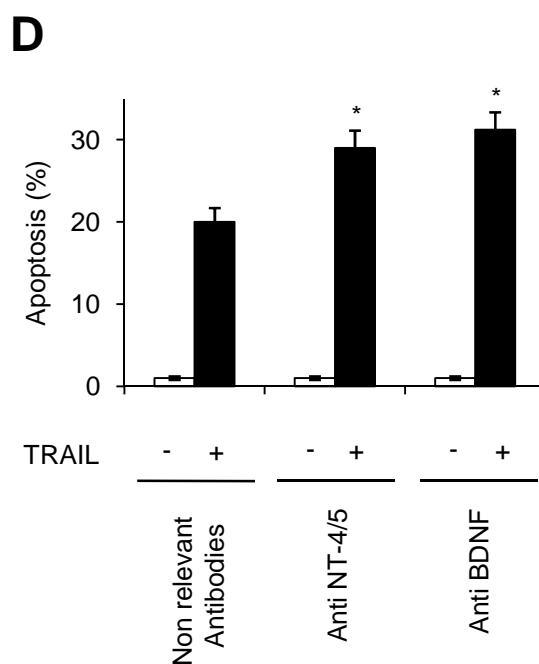
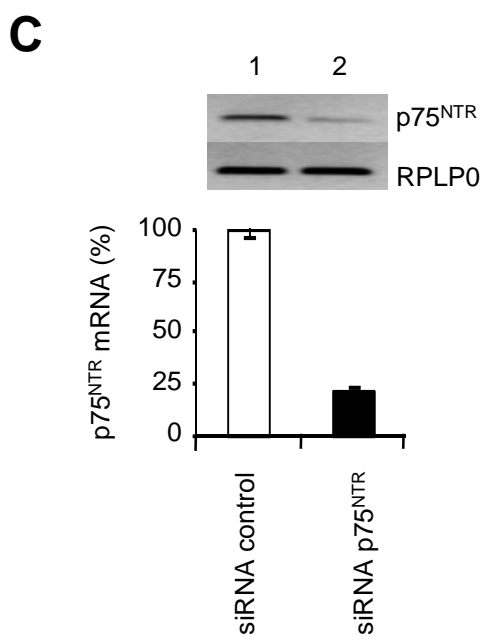
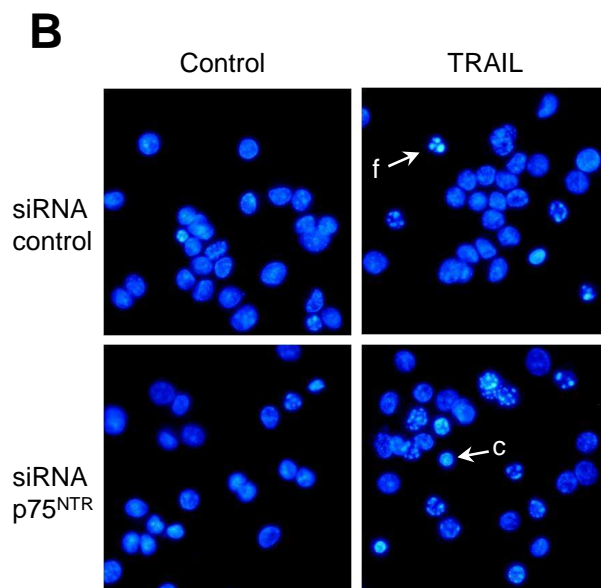
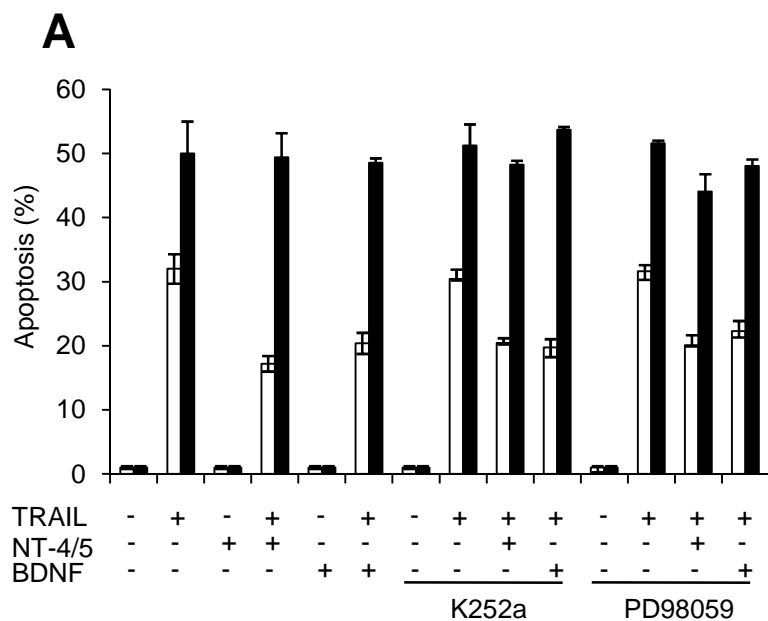
Figure 3. Effect of BDNF and NT-4/5 on breast cancer cells *in vitro*.

A, Effect of recombinant BDNF and NT-4/5 on breast cancer cell survival. 36h after transfection with siRNA against p75^{NTR} (black bars) or control siRNA (white bars), MCF-7 cells were serum-deprived in minimum essential medium overnight and treated with 5 ng/ml TRAIL, with or without 200 ng/ml BDNF or NT-4/5, in presence or absence of 10 nM K252a or 20 μ M PD98059 during 6 h. Apoptotic nuclei were determined after Hoechst staining under a fluorescence microscope. **B**, Hoechst staining of MCF-7 cells in different experimental conditions. Apoptotic nuclei appear condensed (c) or fragmented (f). **C**, Demonstration of siRNA efficacy. MCF-7 cells were treated with siRNA against p75^{NTR}, and the quantity of p75^{NTR} mRNA was then assessed by Q-RT-PCR. RPLP0 was used as control. Lane 1, control siRNA; lane 2, siRNA against p75^{NTR}. **D**, Effect of blocking antibodies against BDNF and NT-4/5 on survival and resistance to apoptosis of breast cancer cells. As previously described, MCF-7 cells were induced into apoptosis with 5 ng/ml TRAIL, in the absence of exogenously added neurotrophins, with or without neutralizing antibodies against BDNF or NT-4/5, and apoptotic nuclei percentage was determined after Hoechst staining under a fluorescence microscope. *, $p < 0.05$.

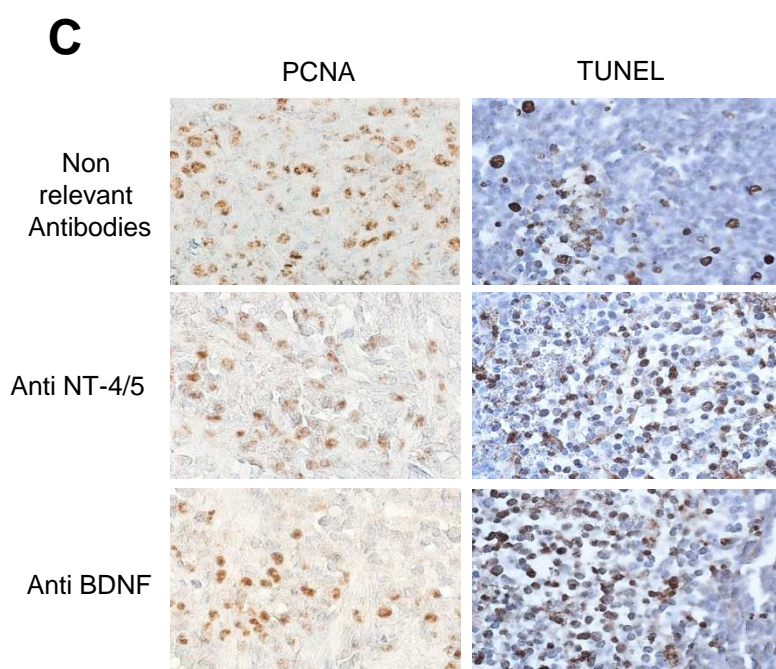
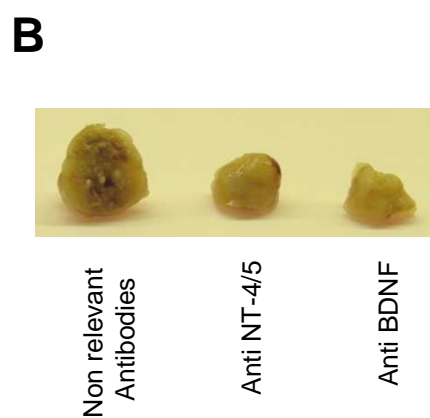
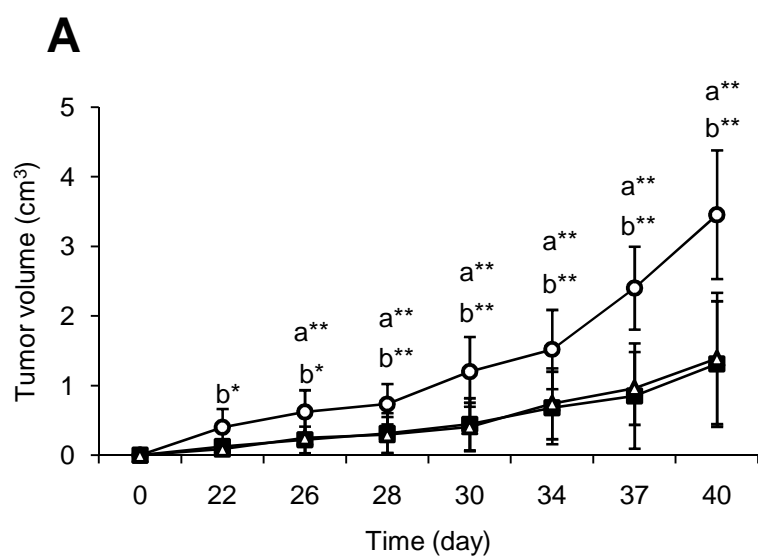
Figure 4. *In vivo* effect of BDNF and NT-4/5 inhibition on tumor xenograft in immunodeficient mice. **A**, 3 days after subcutaneous injection of MDA-MB-231 cells, SCID mice were injected with 12.5 μ g of neutralizing antibodies: anti-BDNF (Δ), anti-NT-4/5 (\blacksquare) and non relevant antibodies (\circ) as control. Treatments were repeated every 3 days until animal sacrifice at day 40. Eight animals were used for each group and student's t test was performed between control groups and anti-NT-4/5 (a) and anti-BDNF (b) antibodies groups. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. The difference between control and NT-4/5 antibody-treated group was significant from day 26 ($p < 0.01$) through day 40 and between controls and BDNF antibody treated group was significant from day 22 ($p < 0.05$) through days 28 to 40 ($p < 0.01$). Experiments were performed twice with equivalent results. **B**, Comparative tumor size differences observed after anti-BDNF or anti-NT-4/5 treatments (day 40). **C**, **D**, Cell proliferation and apoptosis were measured by immunohistochemistry against PCNA and TUNEL analysis respectively. Photographic illustrations of xenografted tumors immunohistochemistry after PCNA and TUNEL analysis are presented in **C**. Evaluations of cell proliferation (PCNA labeling) and apoptosis (TUNEL) from xenograft tumors are in **D**.







Vanhecke et al. Figure 3



D

	% of proliferative cells (PCNA)	% of apoptotic cells (TUNEL)
Non relevant Antibodies	5.5 ± 2.8	7.5 ± 3.1
Anti NT-4/5	4.3 ± 3.2	15.2 ± 2.2
Anti BDNF	4.1 ± 1.2	13.1 ± 6.0