

Thèse

Présentée à

L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Ecole doctorale Biologie-Santé

Par

Rodrigue ROMON

**ROLE DU NGF DANS L'ANGIOGENESE DU
CANCER DU SEIN**

Soutenu le 14 décembre 2009 devant le jury composé de :

Rapporteurs:	Dr. François Le Naour Pr. Halima Ouadid-Ahidouch
Membres :	Dr. Vincent Blanckaert Pr. Hubert Hondermarck
Directeur de thèse :	Pr. Xuefen Le Bourhis

Résumé

Résumé

Notre laboratoire a montré précédemment que le facteur NGF est produit par les cellules de cancer du sein et non par les cellules épithéliales mammaires normales. De plus, le NGF est un puissant facteur mitogène et anti-apoptotique pour les cellules de cancer du sein. Dans le cadre de ce travail, nous avons voulu déterminer l'implication du NGF dans l'angiogenèse tumorale ainsi que les mécanismes mis en jeu. Nous avons montré que le NGF est un puissant facteur angiogénique ayant un rôle essentiel dans la vascularisation tumorale dans des modèles expérimentaux chez la souris SCID. De plus, le NGF exerce des effets pléiotropiques sur les cellules endothéliales *in vitro* avec une intensité similaire au VEGF, le facteur angiogénique prototypique. Par ailleurs, l'effet stimulateur du NGF sur l'invasion des cellules endothéliales dépend de l'activation de son récepteur à activité tyrosine kinase TrkA et des voies de signalisation en aval telles que les voies PI3K/Akt et NO synthase. Enfin, nous avons montré que l'effet angiogénique du NGF est dévolu en partie à une activité du VEGF, puisque la neutralisation du VEGF à l'aide d'un anticorps conduit à une diminution de l'angiogenèse induite par le NGF. Ceci peut s'expliquer par le fait que le NGF augmente la sécrétion du VEGF par les cellules endothéliales et les cellules de cancer du sein. De façon intéressante, nous avons montré que la neurotrophine NT-4/5 exerce également un effet angiogénique *in vitro*.

Mots clés : Cancer du sein, facteurs de croissance, angiogenèse, signalisation

Abstract

Our laboratory has previously shown that the neurotrophic factor NGF (Nerve Growth Factor) is specifically produced by breast cancer cells and not by normal mammary epithelial cells. Furthermore, NGF is a powerful mitogenic and anti-apoptotic factor for breast cancer cells. To investigate the implication of NGF in breast cancer development, we wanted to determine its possible role in tumor angiogenesis and the underlying mechanisms. First, we showed that NGF is a powerful angiogenic factor playing an essential role in tumor vascularization in experimental models performed using SCID mice. Furthermore, NGF exerts pleiotropic effects on endothelial cells *in vitro* with intensity similar to VEGF. Moreover, NGF-stimulated invasion of endothelial cells depends on the activation of its receptor tyrosine kinase receptor TrkA and the downstream signaling pathways such as PI3K / Akt and NO synthase. Interestingly, we showed that angiogenic effect of NGF is partially due to VEGF, as NGF can increase secretion of VEGF by both endothelial cells and breast cancer cells; furthermore, neutralizing antibody against VEGF strongly reduces NGF-induced angiogenesis. In addition, we showed that neurotrophin factor NT-4/5 also exerts an angiogenic effect *in vitro*.

Key words : Breast cancer, growth factor, angiogenesis, signalisation

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés sous le tutorat scientifique de Madame le Professeur Xuefen Le Bourhis au sein du laboratoire de l'IFR-147 de l'Université de Lille : INSERM U 908, « Signalisation des facteurs de croissance dans le cancer du sein. Protéomique fonctionnelle. ».

Pendant les 3 premières années, un soutien à ces recherches a été apporté par une allocation du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche que je tiens ici à remercier.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Hubert Hondermarck, qui dirige l'unité 908 INSERM, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Les métaphores et autres tirades verbales que vous employez me manqueront.

Je remercie profondément Madame le Professeur Xuefen Le Bourhis qui m'a formé et encadré depuis le Master Recherche. Merci pour votre patience, il vous en aura fallu entre autre pour canaliser mes égarements à caractère « technique », ainsi que pour votre encadrement qui ma permis d'arriver jusque là

Je souhaite remercier vivement, pour l'honneur qu'ils me font en faisant parti de ce jury :

Monsieur le Directeur François Le Naour (INSERM U602, Paris)

Madame le Professeur Halima Ouadid-Ahidouch (Laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire, Amiens)

Qui ont accepté de juger ce travail.

Monsieur le Docteur Vincent Blanckaert (MMS EA-2160, Laval)

Monsieur le Professeur Hubert Hondermarck (INSERM U908, Villeneuve d'Ascq)

Qui ont bien voulu examiner ce travail

Je tiens à remercier le Professeur Eric Adriaenssens pour son aide précieuse, son expertise dans le cadre des expérimentations animales et pour sa « banane ».

Je remercie le Professeur Philippe Delannoy ainsi que le Docteur Nathalie Jouy pour leur aide et pour m'avoir permis d'utiliser l'appareillage de leur laboratoire et de leur plateforme.

Je remercie mes camarades de galère :

Yo, grand amateur, entre autres, de houblon. Ta bonne humeur est communicative et tu as souvent poussé la chansonnette, un vrai jukebox. Tu as également été de bon conseil quand j'avais besoin d'aide. Eh oui ! Je suis maceux et fier de l'être !

Stéphanie « la colonelle », que je connais depuis la licence (un bail en fait !). On pourra dire qu'au début tu as eu du mal à me supporter avec mon caractère si « particulier ». Mais au final tu as réussi, semble-t-il, à t'y faire un peu ! En tout cas, tu as toujours été une femme de principes, dotée d'une très grande droiture, qui force le respect.

J.P., l'autre fan (avec moi) de jeux vidéo et de culture japonaise. Toutes les discussions de geek/otaku ont toujours été bien sympathiques, en espérant qu'il y en ait d'autres. Et même situ as « trop de manips », pas trop souvent « ferme le labo ».

Cyril, « Paolo ». Quand je pense que chaque matin, lorsque j'allais en culture, tu étais à la hotte rouge avec une régularité métronomique. Toujours de bonne humeur et très bosseur, tu es un véritable puits de science. Et moi je sais, moi, que tu n'es pas un « faux gentil ».

Élisa, la petite italienne. On ne se sera pas côtoyés très longtemps, mais je te souhaite bon courage pour ce parcours du combattant qu'est la thèse.

Je remercie également les « anciens » du laboratoire :

Sam et Chann les ex-membres de la « Xuefen team » ainsi que Elsa, Bénédicte, Alessandro, Virginie, Nathalie et celles et ceux que j'ai pu oublier.

Je remercie de même les statutaires du laboratoire :

Christophe, la fée du logis, maceux et grand rénovateur. Manu, une confidente et un grand soutien dans les moments difficiles et de doutes. Robert-Alain, une source précieuse de conseils et de remarques. Ingrid, notre nouvelle experte en « biomol » et en embryons de souris et dernière maceuse du bataillon. Ikram, quelqu'un de très agréable à côtoyer dans le travail.

Je remercie les personnels techniques et administratifs : Isa, Johann, Nathalie, Valérie, Chantal, Gilles, Loïc ...

J'ai une pensée pour mes camarades du C9, et surtout pour Aurélie, Coralie et Stéphan.

J'adresse toute ma gratitude à celles et ceux, ils se reconnaîtront, qui m'ont soutenu durant le sombre mois de mai 2009. Je pense en particulier à Laurane, mon ambulancière, et à Marie.

Enfin, je remercie mes parents pour leur soutien et leur très grande patience.

J'adresse un clin d'œil complice aux correcteurs d'orthographe, Word et ... mon père.

Sommaire

Sommaire des figures	4
Sommaire des tableaux	5
Liste des abréviations	6
Introduction.....	11
I. La glande mammaire et sa cancérisation	13
I.A. La glande mammaire	13
I.A.1 Anatomie et histologie	13
I.A.2 Développement et contrôle	15
I.B. Le cancer du sein	16
I.B.1 Les différents types de cancer du sein.....	17
I.B.2 La tumorigenèse mammaire.....	20
I.B.2.a Altération du génome	22
• Activation d'oncogènes	22
• Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs.....	23
• Oncovirus.....	24
• Phénomènes épigénétiques	24
I.B.2.b Origine du cancer du sein	25
I.B.3 Le rôle des facteurs de croissance	25
II. La vascularisation de la tumeur mammaire	29
II.A. structure des vaisseaux normaux et intratumoraux	29
II.A.1 Structure normale du vaisseau sanguin	29
II.A.2 Différences entre vaisseaux normaux et intratumoraux.....	31
II.B. Initiation de la vascularisation tumorale : le switch angiogénique	33
II.B.1 Le switch angiogénique	33
II.B.2 Le rôle de l'hypoxie.....	35
II.B.2.a La voie HIF-1.....	35
II.B.2.b Autres régulations de la voie HIF-1.....	37
II.B.3 Les facteurs du switch angiogénique : facteurs pro- et anti-angiogéniques.	39
II.C. Mécanisme de la néovascularisation	41
II.C.1 L'angiogenèse	41
II.C.1.a Un processus complexe	41
• La perméabilisation des vaisseaux sanguins péri-tumoraux.....	42
• La migration et l'invasion.....	43
• La croissance.....	44
• La formation des <i>néo-vaisseaux</i>	45
II.C.1.b Impact de l'angiogenèse sur le cancer du sein	48
II.C.2 La vasculogenèse	49
II.C.3 Autres processus impliqués dans la vascularisation tumorale	50
II.C.3.a L'intussusception	50
II.C.3.b Le mimétisme vasculogénique et les vaisseaux en mosaïque	51
II.C.3.c La co-option et l'angiogenèse gloméroïde	51

Introduction

II.C.4 Thérapie anti-angiogénique dans le cancer du sein	52
II.C.4.a Principaux agents ciblant l'axe VEGF – Récepteur dans le cancer du sein.....	53
• Les anticorps monoclonaux : le bevacizumab	53
• Les inhibiteurs de tyrosine kinase	53
II.C.4.b Chimiothérapies métronomiques comme stratégie anti-angiogénique.....	54
III. Les neurotrophines et leurs récepteurs	55
III.A. Les neurotrophines	55
III.A.1 Découverte	55
III.A.2 Expression et structure.....	56
III.B. Les récepteurs aux neurotrophines.....	57
III.B.1 Les Tropomyosin Kinase Receptors	57
III.B.1.a Découverte.....	57
III.B.1.b Expression des récepteurs Trk.....	58
III.B.1.c Structure des récepteurs Trk.....	59
III.B.2 Le récepteur p75 ^{NTR}	61
III.B.2.a Découverte.....	61
III.B.2.b Expression du récepteur p75 ^{NTR}	61
III.B.2.c Structure du récepteur p75 ^{NTR}	62
III.B.3 Signalisation des récepteurs TrkA et p75 ^{NTR}	65
III.B.3.a Signalisation des récepteurs TrkA.....	65
III.B.3.b Signalisation du récepteur P75 ^{NTR}	68
• Interactions Ligand-récepteurs.....	68
• Signalisation induite par P75 ^{NTR}	68
III.C. Rôle des neurotrophines et de leurs récepteurs dans le cancer	72
III.C.1 Effet Anti-tumoral.....	73
III.C.2 Effet Pro-tumoral	73
III.D. Effet angiogénique des neurotrophines	75
III.D.1 Expression des neurotrophines et de leurs récepteurs par les cellules endothéliales	75
III.D.2 Effets angiogéniques des neurotrophines.....	75
III.D.2.a Le NGF.....	75
III.D.2.b Les autres neurotrophines.....	77
Revue: Rôle des cellules endothéliales progénitrices dans l'angiogenèse du cancer du sein : de la recherche fondamentale à l'application clinique	79
Objectif de la thèse	89
Résultats.....	93
Article: Le NGF promeut l'angiogenèse du cancer du sein en activant de multiples voies de signalisation	95
Effet du NT4 sur l'angiogenèse : premiers éléments	141
Discussion et perspectives	149
I. Le NGF est essentiel dans l'angiogenèse du cancer du sein	151
I.A. Contribution essentielle du NGF dans la vascularisation tumorale.....	151
I.B. Effet pléiotropique du NGF sur les cellules endothéliales	152
I.C. Mécanismes d'actions du NGF dans l'angiogenèse	152
I.D. Conclusion	155

Sommaire

II. Limites de nos approches expérimentales.....	155
II.A. Modèles cellulaires utilisé	155
II.B. Limites dans l'étude des mécanismes d'action du NGF.....	157
III. Perspectives	157
III.A. implication des précurseurs endothéliaux dans la vascularisation tumorale induite par le NGF	157
III.B. Contrôle de l'expression et de la sécrétion des facteurs angiogénique par le NGF	159
III.C. Implication des autres neurotrophines dans l'angiogenèse du cancer du sein.....	159
Annexes.....	161
Annexe 1: Ku86 is important for TrkA overexpression-induced breast cancer cell invasion	163
Annexe 2: TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells	209
Annexe 3: Nerve Growth Factor is a potential Therapeutic target in breast cancer	223
Annexe 4: Tamoxifen and TRAIL synergistically induce apoptosis in breast cancer cells	231
Bibliographie	239

Sommaire des figures

Figure 1. Anatomie et structure de la glande mammaire.	13
Figure 2. Structure du lobe mammaire	14
Figure 3. Histologie de la glande mammaire normale	15
Figure 4. Représentation des principaux carcinomes <i>in situ</i>	18
Figure 5. Représentation des principaux carcinomes infiltrants.....	19
Figure 6. Représentation schématique des stades de la cancérisation mammaire.....	21
Figure 7. Contrôles paracrine et autocrine de la croissance des cellules cancéreuses mammaires. ...	26
Figure 8. Structure du réseau sanguin.	30
Figure 9. Architecture des vaisseaux normaux et intratumoraux.....	31
Figure 10. Visualisation de la membrane basale et des péricytes des vaisseaux intratumoraux.....	32
Figure 11. Haute perméabilité des vaisseaux intratumoraux et formation de lits vasculaires.....	32
Figure 12. Le switch angiogénique.	34
Figure 13. La voie HIF-1.	36
Figure 14. Perméabilité des vaisseaux sanguins.	43
Figure 15. Migration et invasion des cellules endothéliales, signalisation associée induite par le VEGF.	46
Figure 16. Croissance des cellules endothéliales, signalisation associée induite par le VEGF.....	47
Figure 17. Formation des vaisseaux intratumoraux.....	48
Figure 18. L'intussusception.....	50
Figure 19. L'angiogenèse gloméroïde.	52
Figure 20. Spécificité de liaison des neurotrophines à leurs récepteurs tyrosine-kinases.	58
Figure 21. Structure des récepteurs Trk.....	60
Figure 22. Structure du récepteur p75 ^{NTR}	64
Figure 23. Activation de la voie MAPK/p38 MAPK suite à l'activation de TrkA.	66
Figure 24. Activation des voies PI3K/Akt et PLC γ suite à l'activation de TrkA.....	67
Figure 25. Les voies menant à l'apoptose suite à l'activation de p75 ^{NTR}	70
Figure 26. Les voies menant à la survie suite à l'activation de p75 ^{NTR}	72
Figure 27. Effets pléiotropiques du NT-4/5 sur l'angiogenèse <i>in vitro</i>	144
Figure 28. Implication des voies de signalisation MAPK, PI3K/akt et NO Synthase dans l'effet stimulateur du NT-4/5 sur l'invasion des HUVEC.....	145
Figure 29. Implication des MMP dans l'effet stimulateur du NT-4/5 sur l'invasion des HUVEC.	145
Figure 30. La stimulation de l'invasion induite par le NT-4/5 est indépendante d'une activité du VEGF.	146
Figure 31. Voies de signalisation et effecteurs impliqué dans l'invasion stimulé par le NGF.....	154

Sommaire des tableaux

Tableau 1. Classification des stades du cancer du sein.....	19
Tableau 2. Classification moléculaire des cancers du sein.....	20
Tableau 3. Exemples de gènes cibles du facteur de transcription HIF-1.....	37
Tableau 4. Les principaux facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques.....	40
Tableau 5. Caractéristiques géniques des neurotrophines.....	56
Tableau 6. Caractéristiques géniques des récepteurs Trk.	58

Liste des abréviations

A

ADAM	Association of a disintegrin-metalloprotease
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ARMS	Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning

B

Bad	Bcl-2/Bcl-x-associated death promoter
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl2	B-cell CLL/lymphoma 2
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BIK	Bcl Interacting Killer
Bim	Bcl2-interacting protein
BRCA	BReast Cancer gene product

C

c-jun	Avian sarcoma virus 17 oncogene homolog
c-Kit	Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
c-myc	avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CBP	CREB binding protein
CBP	CREB Binding protein
CCIS	carcinomes canauxiaux <i>in situ</i>
ccnd1	cyclin D1
CD	Cluster Differentiation
CLIS	carcinomes lobulaire <i>in situ</i>
CRD	Cystein Rich Domain
CREB	cAMP Response Element-Binding
Crk	Avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog
CUL2	Cullin 2
CXCL	chemokine CXC motif ligand

D

DAG	Diacylglycerol
DD	Death Domain
DEC	Differentiated Embryo-Chondrocyte expressed gene

E

EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Elk1	member of ETS oncogene family 1

Sommaire

ErbB2 / HER2	avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase
ER α	Estrogen Receptor α

F

FAK	Focal Adhesion Kinase
FAP-1	Fas-associated protein-1
FDA	Food and Drug Association
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
flt	fms related protein kinase
FOS	FBJ murine OsteoSarcoma viral oncogene homolog
FRS2	Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2
FSH	Follicule Stimulating Hormone

G

GAB 1/2	GrB2 Associated Binding Protein $\frac{1}{2}$
GADD	Growth Arrest and DNA Damage induced gene
GFP	Green Fluorescent Protein
GH	Growth Hormone
GLUT	GLUcose Trnasporter
Grb	Growth factor receptor-bound protein
GTP	Guanosine Triphosphate

H

HAP	Huntingtin Associated Protein
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cell
HGF/SF	Hepatocyte Growth Factor/Scater Factor
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor 1
HIF-1 α	hypoxic response factor
HMTV	Human Mammary Tumor Virus
HRE	Hypoxia Responsive Element
Hsp	Heat shock protein
	human apurinic/apyrimidinic site endonuclease
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell

I

IAP	Inhibitors of Apoptotic Proteins
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	IGF Binding Protein
IgG	Immunoglobuline de classe G
IKK- β	I κ B Kinase- β
ILK	Integrin Linked Kinase

Sommaire

IP3 Inositol Triphosphate
IRAK Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase

J

JNK c-jun N-terminal kinase

L

L1CAM neuronal Cell Adhesion Molecule L1
LDL Low Density Lipoprotein

M

MAPK Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKAPK Mitogen Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase
MCP Monocyte Chemotactic Protein
MDGI Mammary Derived Growth Factor Inhibitor
MEF2 Mads Box Transcription Enhancer Factor 2
MEK Mitogen Activated Protein ERK kinase
MEKK1 Mitogen Activated Protein ERK kinase kinase 1
Met mesenchymal-epithelial transition factor
MIF Macrophage Inhibitory Factor
MKK Mitogen Activated Protein kinase kinase
MKKK Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MMP Matrix MetalloProtease
MMTV Mouse Mammary Tumor Virus
MT1-MMP Membrane Type 1 – Matrix MetalloProtease
MYB avian MYeloBlastosis viral oncogene homolog

N

NADE Neurotrophin receptor Associating Death Effector
neuro/glioblastoma derived oncogene homolog
NF-κB Nuclear Factor-κB
NGF Nerve Growth Factor
NO Nitric Oxyde
NOS Nitric Oxyde Synthase
NRAGE Neurotrophin Receptor-interacting MAGE homolog
NRIF Neurotrophin Receptor Interacting Factor
NT NeuroTrophin
NTRK Neurotrophin Receptor Kinase

O

ORP Oxygen Regulated Protein

P

p75^{NTR} p75 NeuroTrophin Receptor

Sommaire

p75 ^{NTR} -CTF	p75 ^{NTR} -C-Terminal Fragment
p75 ^{NTR} -ECD	p75 ^{NTR} -ExtraCellular Domain
p75 ^{NTR} -ICD	p75 ^{NTR} -IntraCellular Domain
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PDK	Phosphoinositide Dependant Kinase
PDZ	Post-synaptic Disc-large Zona
PGI ₂	prostaglandine 2
PI3K	Phosphatidyl Inositol Tri-Phosphate kinase
PKC	Protein Kinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PIGF	Placental Growth Factor
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
R	
Rac	GTPase-activating protein
RAMEC	Rat Adrenal Medulary Endothelial Cell
Rap	Ras related protein
Ras	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
Rb	Retinoblastoma gene product
RBX1	Ring Box 1
RhoA	Ras homolog family member A
RIP-2	Receptor-Interacting Protein 2
S	
Sc-1	Schwann cell factor-1
Shc	Src homology-2 containing protein
SHP	Small Heterodimer Partner
SOS	son of sevenless
SP1	Specific Protein 1
Src	avian Sarcoma viral oncogene homolog
T	
TAD	TransActivation Domain
TAM	Tumor Associated Macrophage
TF	Tissue Factor
TGF- α et - β	Transforming Growth Factor α et β
TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProtease
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
tPA	tissue Plasminogen Activator
TRADD	Tumor Necrosis Factor Receptor 1-Associated Death Domain
TRAF	Tumor Necrosis Factor Associated Factor

Sommaire

Trk	Tropomyosin-related kinase
U	
Ub	Ubiquitin
uPA	urokinase-type Plasminogen Activator
V	
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	VEGF Receptor
VHL	Von Hippel-Lindau
VPF	Vascular Permeability Factor
vWF	von Willebrand Factor

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, qui est une glande exocrine cutanée se développant au cours de la vie de la femme et dont le rôle est la sécrétion lactée suite à la parturition ; cette glande est également présente chez l'homme mais beaucoup moins développée.

La glande mammaire est annexée à la paroi antérieure du thorax ; elle est 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).

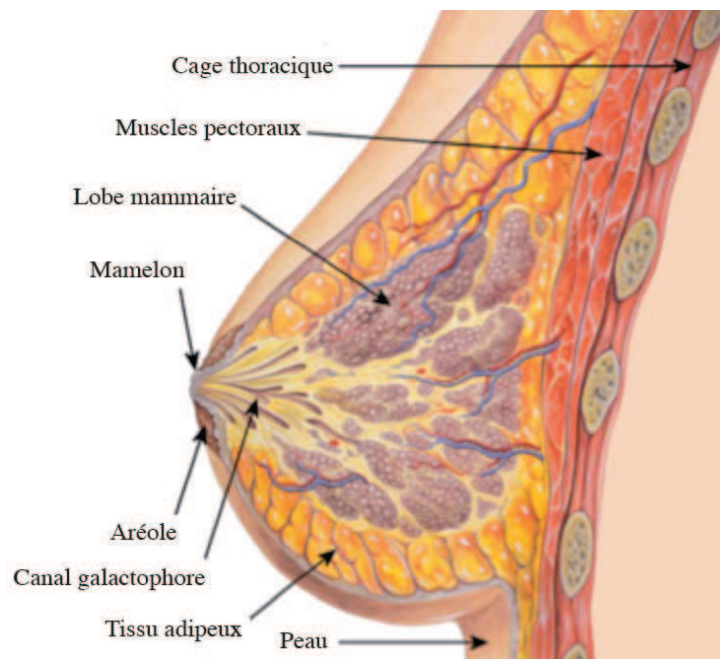


Figure 1. Anatomie et structure de la glande mammaire.

Représentation schématique en coupe de la glande mammaire (Illustration de 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).

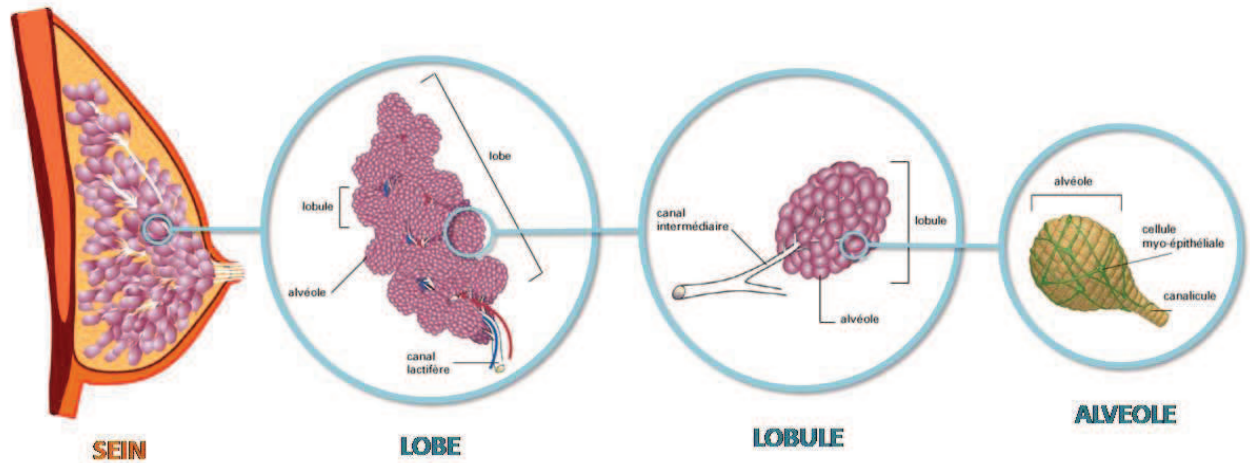


Figure 2. Structure du lobe mammaire

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.santeallaitemental.com).

La glande mammaire est composée de plusieurs types cellulaires distincts. Le système alvéolo-lobulo-canalair 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 sont présents 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 ainsi le développement de l'épithélium mammaire. Le tissu conjonctif extra-lobulaire est quant à lui plus dense en matrice extracellulaire et pauvre en cellules (Figure 3). L'éjection du lait dans les canaux alvéolaires, lobulaires et enfin galactophores, se fait en réponse au stimulus de succion, provoquant la contraction des cellules myoépithéliales.

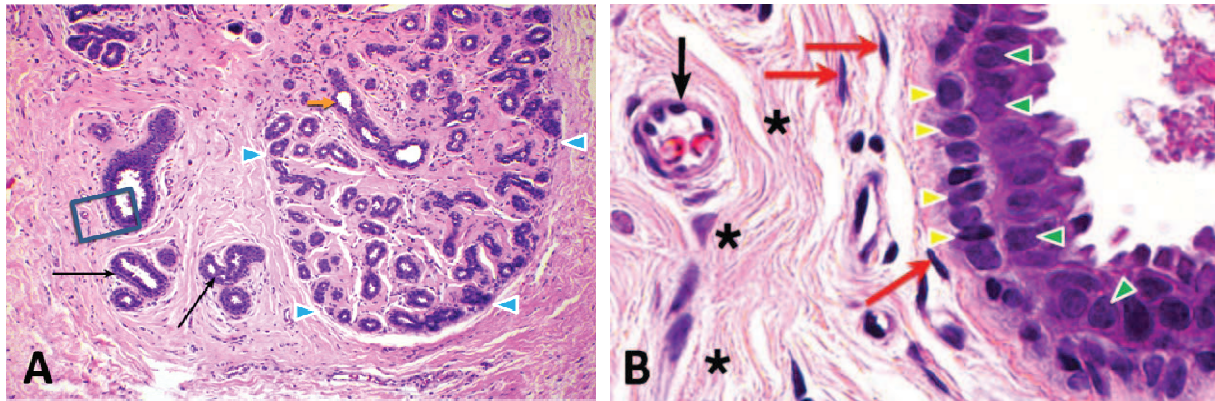


Figure 3. Histologie de la glande mammaire normale

(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'enroulent 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>, 2009).

I.A.2 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 développée 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.

A la puberté, la glande mammaire développe son arborescence sous le contrôle d'hormones ovariennes, progestérone et œstrogènes, et de l'hormone hypophysaire GH. Les œstrogènes stimulent la croissance et les ramifications du système canalaire et de son tissu conjonctif périphérique. La progestérone provoque la dilatation des canaux et la 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 des facteurs de croissance. Ces facteurs de croissance, tels que l'EGF, le TGF- α , le TGF- β , l'IGF ou le FGF, 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

Introduction

cellules en stimulant la synthèse de protéases (MMP-2, 3, 14, ADAM17) 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 mettant en jeu l'activation des enzymes protéolytiques, l'apoptose des cellules épithéliales et l'arrivée massive de macrophages.

I.B. Le cancer du sein

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. Il est responsable chaque année de plus de 400 000 décès et constitue ainsi une cause importante de mortalité des femmes âgées de 35 à 65 ans dans les pays développés.

En France, il représente plus du tiers de l'ensemble des nouveaux cas de cancer chez la femme. On estime qu'en 2005, près de 50 000 nouveaux cas ont été diagnostiqués et plus de 11 500 décès ont été liés à ce cancer. Entre 1980 et 2000, le nombre de nouveaux cas a presque doublé, lorsque dans le même temps la mortalité n'a que très peu augmenté grâce à l'amélioration des traitements 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, le taux global de survie relative à 5 ans après le diagnostic est de 79,8 % et un recul du taux d'incidence entre 2004 et 2006 est observé (Allemand *et al.*, 2008; Coleman *et*

Introduction

al., 2008) alors que le dépistage s'est considérablement accentué. Par exemple, l'examen par mammographie a augmenté 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 1 cm^3 , soit en moyenne 1 milliard de cellules, alors détectable par mammographie classique. L'amélioration des techniques d'imagerie et la campagne de dépistage intensive pour les femmes de plus de 50 ans ont 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.

I.B.1 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 chez la femme jeune. Les tumeurs de sein dites malignes sont au contraire mal délimitées et non-encapsulées. Les cellules cancéreuses ont croissance rapide et tendent à infiltrer et détruire les tissus adjacents. On compte parmi ces tumeurs les sarcomes, les lymphomes non hodgkiniens mais surtout, dans plus de 95% des cas, des adénocarcinomes. Les adénocarcinomes sont issus de la cancérisation de l'épithélium glandulaire à partir soit de cellules des canaux (cancer canalaire) soit de cellules des lobes glandulaires (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) : Les carcinomes *in situ* localisés dans les canaux sont appelés carcinomes canaux *in situ* (CCIS) et il en existe 4 différents types architecturaux (massif, cribriforme, papillaire et comédo). Ceux localisés au niveau des lobes sont qualifiés de carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS). Leur prolifération épithéliale maligne est limitée à la lumière du canal galactophorique ou des acini ; la membrane basale reste intacte et le tissu conjonctif n'est pas envahi.

Introduction

Les carcinomes mammaires *in situ* sont rares, les CCIS sont de bon pronostic et les CLIS évoluent dans 20 à 50% des cas vers une forme infiltrante.

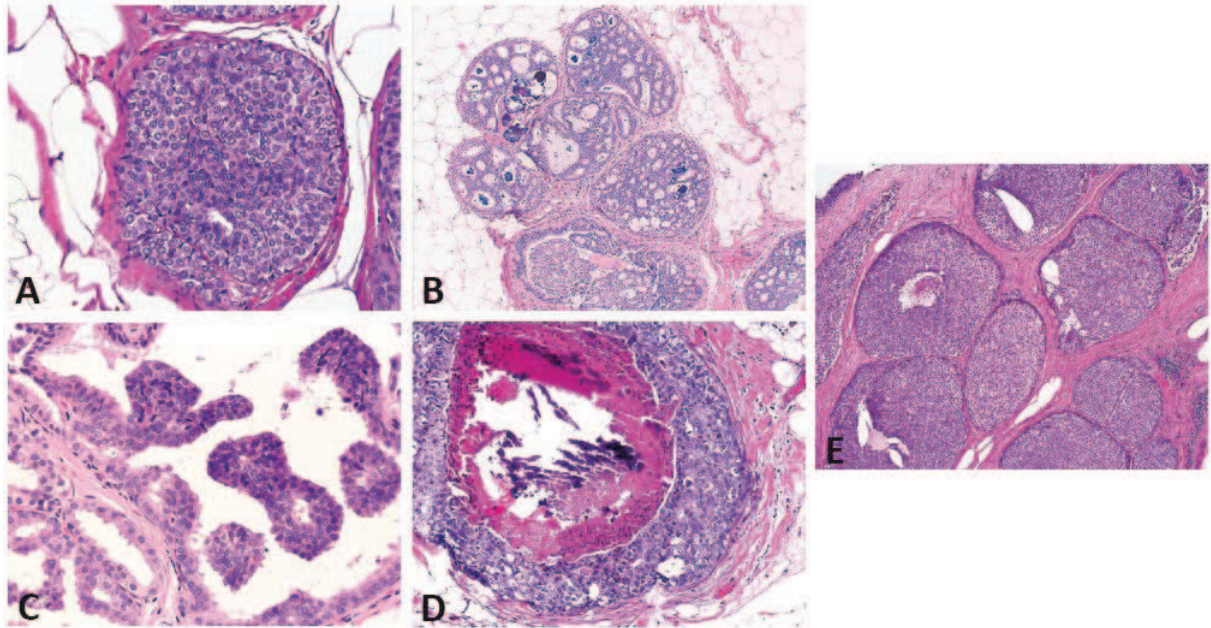


Figure 4. Représentation des principaux carcinomes *in situ*.

Coupes histologiques de carcinomes *in situ* canalaire ou CCIS de type massif (A), cribriforme (B), papillaire (C) et comédo (D) et de carcinomes *in situ* lobulaire, ou CLIS (E) où la prolifération épithéliale maligne est cantonnée dans la lumière du canal galactophorique ou des acini.

(<http://tgmouse.compmc.ucdavis.edu/jensen-mamm2000/indexpage.html> et <http://www.hopkinsbreastcenter.org/pathology/malignant/>, 2009).

- Les carcinomes infiltrants : Dans les carcinomes infiltrants, les cellules ont détruit la lame basale et infiltrent le tissu adjacent. Ils représentent une très large majorité des cancers du sein (98%), ils sont le plus souvent canaux (75%) et parfois lobulaires (4 à 11%). Il en 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 qui sont, quant à eux extrêmement rares.

Introduction

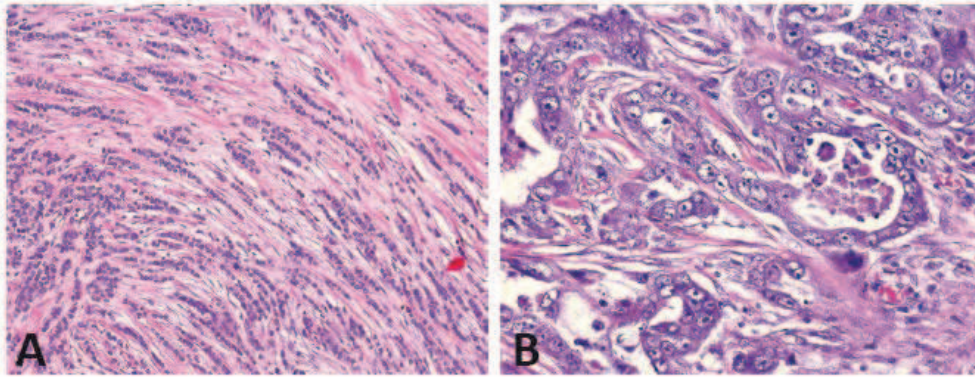


Figure 5. Représentation des principaux carcinomes infiltrants.

Coupes histologiques de carcinomes invasifs canaux (A) et lobulaires (B) où la lame basale est dégradée et où les cellules épithéliales cancéreuses ont envahi le stroma. (<http://www.hopkinsbreastcenter.org/pathology/malignant/>, 2009)

- 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 intracanaux ou canaux infiltrant sous-jacent.

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

- La classification TNM, datant de 1987, est 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 (Tableau 1) correspondant à une combinaison des facteurs T, N et M.

Stade	Description
Stade 0	Cancer in situ (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.

Tableau 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 les tissus mammaires normaux et tumoraux. Ces différences sont 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 le tableau 2.

Sous-type	Description
Luminal A	Cancer généralement de bas grade et de bon pronostic, exprimant les récepteurs hormonaux (ER 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 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 cytokératines 5/6 et 17 et une mutation fréquente de p53. Ils sont de grade III et de mauvais pronostic.
Normal Breast-like	Exprimant des gènes connus pour être exprimés par des cellules non épithéliales. Ce dernier sous-type reste assez mal défini.

Tableau 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 une succession d'altérations géniques confère aux cellules des avantages sélectifs menant à la transformation progressive de la cellule normale vers la cellule tumorale. La cancérogenèse mammaire est donc constituée de 3 grandes étapes (Figure 6):

- **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, conduisant à la formation d'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 accumulent des altérations géniques et acquièrent de nouvelles propriétés biologiques aboutissant à la formation d'une tumeur de plus en plus agressive.

Introduction

- **La dissémination** ou invasion tumorale. Les cellules envahissent le tissu conjonctif selon un processus actif et complexe. Les cellules doivent avoir acquis notamment la capacité de détruire la membrane basale et de perdre leurs connexions intercellulaires. Le stade ultime est la métastase par voie sanguine ou par voie 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.

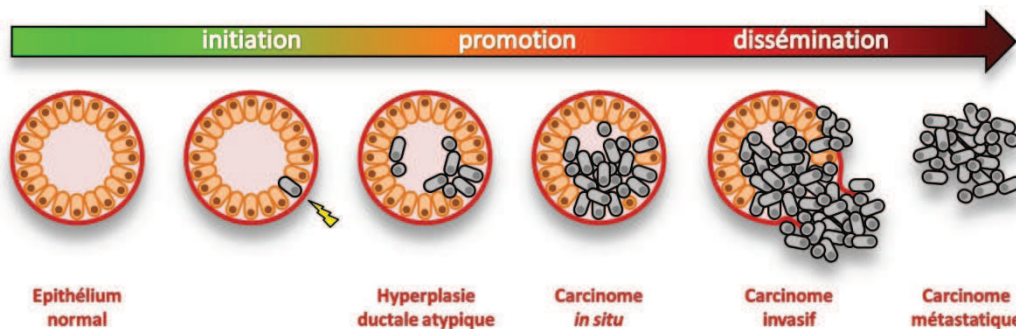


Figure 6. Représentation schématique des stades de la cancérisation mammaire.

A partir d'un tube épithélial sain, les cellules « initiées » prolifèrent 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.

Différentes altérations génétiques telles que l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et l'activation d'oncogènes (Thompson and Easton, 2004) entraînent l'altération de processus physiologiques conduisant à l'acquisition de différentes capacités qui permettront aux cellules cancéreuses de supplanter les autres cellules de l'environnement. Parmi ces différentes capacités, on peut noter principalement:

- L'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire,
- L'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs,
- L'échappement à l'apoptose,
- Le potentiel répliatif illimité,
- L'activation du processus angiogénique,
- L'invasion et la dissémination métastatique.

(Hanahan and Weinberg, 2000)

Introduction

I.B.2.a Altération du génome

- **Activation d'oncogènes**

L'activation d'oncogènes peut survenir à la suite de quatre types d'altérations génétiques : les mutations (échange d'un ou plusieurs nucléotides), les délétions (perte d'une partie d'un gène), les amplifications (augmentation du nombre de copies d'un gène ou d'une partie d'un gène) et les translocations chromosomiques. Ces différentes altérations génétiques peuvent concerner la partie régulatrice ou la partie codante de l'oncogène. Dans les cancers du sein, l'activation des oncogènes se fait majoritairement par amplification génique (Bieche and Lidereau, 1997).

Les oncogènes peuvent être 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, stimulent la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses.

Les amplifications les plus fréquentes dans le cancer du sein concernent les oncogènes *c-myc*, *ccnd1* et *c-ErbB2* ; ***c-myc*** compte parmi les premiers oncogènes identifiés. Il est localisé en 8p24 et code un facteur de transcription impliqué 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). L'oncogène ***ccnd1*** est localisé en 11q13 et code la cycline D1 qui est un régulateur majeur des transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire mais également un cofacteur de transcription. Ce gène est amplifié dans 15 % des carcinomes mammaires (Arnold and Papanikolaou, 2005) et représente le deuxième oncogène le plus souvent amplifié dans les tumeurs mammaires. De plus, la cycline D1 peut également être surexprimée au niveau transcriptionnel et protéique dans 50 % des cancers du sein avec ou sans amplification génique (Roy and Thompson, 2006). ***c-ErbB2*** (HER2), localisé en 17q21-22, est l'homologue humain du gène *neu* isolé dans les cellules de neuroblastomes de rat et code la protéine ErbB2, un récepteur de la famille de l'EGFR (récepteur de l'Epithelial Growth Factor ou ErbB1). Il est surexprimé ou amplifié dans 25 à 30 % des cancers du sein et constitue le 3^{ème} gène le plus fréquemment amplifié dans les tumeurs mammaires (Slamon,

Introduction

1987). Cette amplification est accompagnée d'une surexpression de l'ARNm et de la protéine (Revillion *et al.*, 1998). ErbB2 induit la tumorigenèse et il 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).

- **Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs**

Les gènes suppresseurs de tumeurs 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 « gatekeepers » (Rb, PTEN) et les modulateurs du microenvironnement cellulaire « landscapers » (E-Cadhérine, CD44). Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de cette inactivation, principalement les mutations et les altérations épigénétiques. Ces gènes, tels que les gènes *Rb* ou *p53*, agissent de manière récessive puisque leur inactivation nécessite l'altération des deux allèles (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).

Parmi les gènes suppresseurs de tumeurs mutés dans le cancer du sein, le « caretaker » **p53** (localisé dans la région 17q13) est considéré comme le gardien 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. Le « gatekeeper » **Rb** (localisé en 13q14) appartient aux inhibiteurs de la croissance cellulaire. Il 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 « checkpoints » 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 (Bosco and Knudsen, 2007). Le « landscaper »

Introduction

E-cadhérine (localisé en 16q22) appartient aux modulateurs du microenvironnement cellulaire. C'est un constituant des jonctions adhérentes des cellules épithéliales qui possède également un pouvoir de signalisation cellulaire. La régulation de la E-cadhérine est fréquemment altérée dans les carcinomes ; elle 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. L'E-cadhérine est ainsi considérée comme un suppresseur de tumeurs et de métastases (Cowin *et al.*, 2005).

- **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 qui produisent des protéines détruisant la protéine p53 dans le cancer de l'utérus (Sun *et al.*, 2008), ou encore qui apportent des oncogènes dans leur acide nucléique. C'est le cas de *Myb* codé par le virus AMV causant la leucémie myéloïde chez l'homme (Lipsick and Wang, 1999). Cependant, l'implication de virus dans la carcinogenèse mammaire demeure discutée et les études montrant la présence du virus HMTV, équivalent humain du MMTV, dans les biopsies de cancer du sein ne permettent aucune certitude quant à son implication réelle dans la maladie (Ross, 2008).

- **Phénomènes épigénétiques**

Au-delà de ces modifications génétiques, l'implication des phénomènes épigénétiques dans la carcinogenèse est clairement établie. 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 tumorigenèse. 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.

Introduction

I.B.2.b Origine 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 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, ce sont des progéniteurs ou des cellules souches qui subissent les mutations dans le concept des cellules souches.

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 et possédant le profil des marqueurs $CD44^+$ et $CD24^{-/low}$ ont été identifiées comme hautement tumorigènes (Al-Hajj *et al.*, 2003). Enfin, les cellules souches cancéreuses et leur différenciation sont peut-être une cause de l'hétérogénéité des cancers du sein.

I.B.3 Le 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 la vascularisation, et

Introduction

d'autre part la formation de métastases, en jouant sur les capacités de migration et d'invasion des cellules cancéreuses et, là encore, sur la vascularisation. 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, cellules endothéliales, cellules épithéliales, Figure 7).

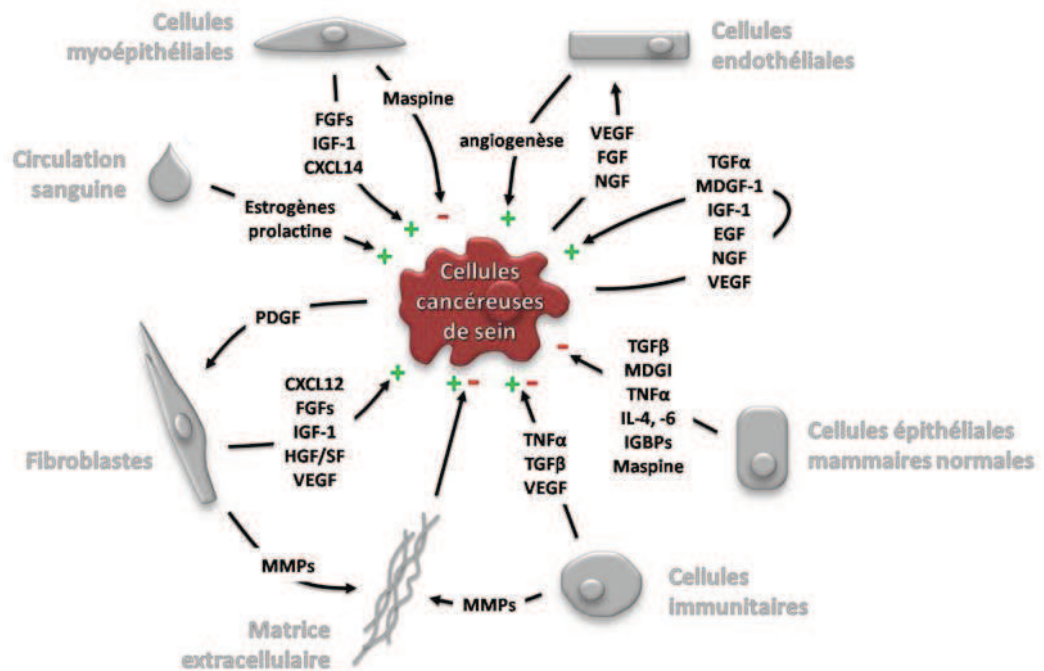


Figure 7. Contrôles paracrine et autocrine de la croissance des cellules cancéreuses mammaires.

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 « - ».

Les facteurs de croissance peuvent agir de deux façons sur les cellules cancéreuses, soit par stimulation directe des cellules activant leur croissance, leur migration et/ou leur invasion, soit indirectement, en agissant sur les cellules du stroma induisant ainsi des modifications du microenvironnement tumoral (modifications de la matrice extracellulaire, recrutement et activation des cellules endothéliales...) favorables à l'angiogenèse et à la métastase. A titre d'exemple, le TGF- β est un facteur 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 dissémination métastatique (Chang *et al.*, 2007).

Introduction

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

Au sein de notre laboratoire, des recherches ont montré le rôle d'un facteur de croissance supplémentaire intervenant dans le cancer du sein, il s'agit du NGF. En effet, les cellules cancéreuses mammaires sécrètent du NGF agissant de manière autocrine pour stimuler la croissance des cellules cancéreuses de sein (Descamps *et al.*, 2001b; Dolle *et al.*, 2003).

L'implication des facteurs de croissance n'est pas le seul mode d'action du microenvironnement sur les cellules cancéreuses mammaires. Citons l'exemple des chimiokines, comme la CXCL14 sécrétée par les cellules myoépithéliales qui augmentent la prolifération et la migration des cellules cancéreuses, ou des métalloprotéases (MMP) capables de dégrader la matrice extracellulaire et favoriser ainsi l'invasion des cellules tumorales.

II. LA VASCULARISATION DE LA TUMEUR MAMMAIRE

Judah Folkman et son équipe ont démontré pour la première fois le caractère indispensable du processus de néovascularisation dans certaines conditions physiologiques et pathologiques telles que la croissance tumorale et la formation de métastases de manière générale et dans le cancer du sein en particulier (Folkman, 1971; Weidner *et al.*, 1991).

En effet, le développement de la tumeur mammaire requiert un approvisionnement essentiellement en oxygène et en nutriments, les métabolites toxiques produits par les cellules cancéreuses étant quant à eux rapidement éliminés. Mais, lors des premières phases de son développement, la tumeur mammaire est dépourvue de vaisseaux sanguins et par conséquent d'une connexion avec le système vasculaire environnant. L'apport en oxygène et en nutriments ainsi que l'élimination des métabolites par diffusion passive ne pouvant être assurés au delà d'un volume tumoral de quelques mm³, la vascularisation de la tumeur s'avère rapidement indispensable. Différents processus, essentiellement les processus d'angiogenèse et de vasculogenèse, sont alors engagés grâce une activité des facteurs pro-angiogénique sécrété en grande partie par les cellule cancéreuses. Ces processus aboutissent à la formation d'un réseau vasculaire permettant la perfusion de la tumeur nécessaire à sa croissance, et par la suite à sa dissémination métastatique. Nous allons aborder les différents mécanismes impliqués dans l'initiation et la formation des vaisseaux intratumoraux ainsi que leur impact dans le développement du cancer du sein.

II.A. structure des vaisseaux normaux et intratumoraux

II.A.1 Structure normale du vaisseau sanguin

Le vaisseau sanguin est la structure permettant de véhiculer le sang dans l'organisme, assurant entre autre l'apport en oxygène et en nutriments aux tissus ainsi que l'élimination des déchets métaboliques. Le réseau sanguin concourt donc au maintien de l'homéostasie.

On peut distinguer dans le système vasculaire :

- Le réseau artériel, allant du cœur vers les organes.
- Le réseau veineux, ramenant le sang des organes vers le cœur
- Les capillaires, faisant le lien entre ces deux grands réseaux.

Introduction

Les réseaux artériels et veineux sont eux même subdivisés en différents types de vaisseaux (Figure 8).

La paroi interne de tous les vaisseaux sanguins est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales qui sera en contact direct avec le sang. Ces cellules reposent sur une membrane basale qui est un type de matrice extracellulaire d'une épaisseur de 50 à 800 nm qui permet la séparation des cellules endothéliales du tissu conjonctif sous-jacent. La membrane basale est composée d'une lame basale et d'une lame réticulaire. La lame basale est elle-même composée d'une couche dense, constituée de collagène IV pour les capillaires, comprise entre deux couches claires composées de laminine. La lame réticulaire, quant à elle, est notamment constituée de fibronectine. Différentes cellules accessoires entrent également dans la composition des vaisseaux. Les cellules musculaires lisses, qui sont les constituants principaux de la *media* des vaisseaux, bordent les artères, artérioles, veines et veinules. Elles servent à la régulation du flux sanguin et à la perméabilité vasculaire, en permettant la vasoconstriction. Les péricytes sont des cellules mésenchymateuses aux caractéristiques proches des cellules musculaires lisses servant de support aux vaisseaux (Figure 8).

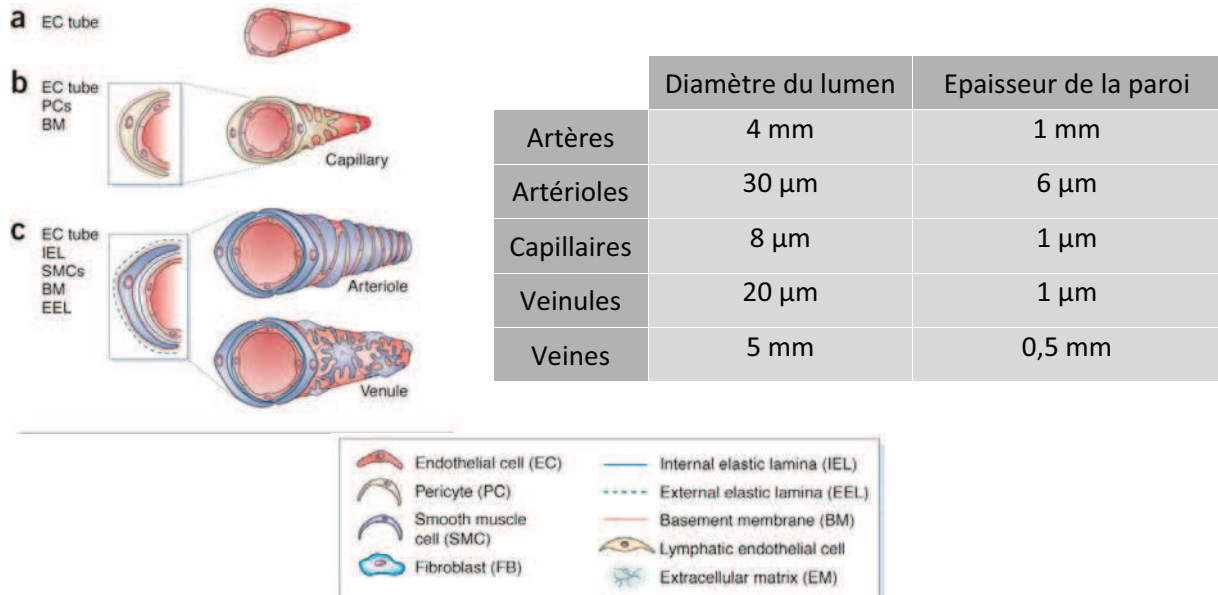


Figure 8. Structure du réseau sanguin.

Le système vasculaire est composé du réseau artériel comprenant les artères et les artérioles et du réseau veineux comprenant les veines et les veinules. Les capillaires assurent l'interface entre ces deux systèmes et c'est essentiellement à ce niveau que se font les échanges entre les tissus et la circulation. On peut considérer que les artères et les veines sont des vaisseaux de gros calibre, les artérioles et les veinules étant quant à elles des vaisseaux de calibre moyen. Ces vaisseaux possèdent une membrane basale, une lamina interne et externe et sont bordés par des cellules musculaires lisses et des péricytes. Les capillaires sont, eux, des vaisseaux de petit calibre et ne comportent qu'une membrane basale et ne sont bordés que par des péricytes (Jain, 2003).

II.A.2 Différences entre vaisseaux normaux et intratumoraux.

Les vaisseaux intratumoraux ont une structure et des caractéristiques bien différentes des vaisseaux « normaux », ces différences sont dues essentiellement à la sécrétion constante de facteurs pro-angiogéniques par les cellules cancéreuses (McDonald and Choyke, 2003) :

- Les vaisseaux intratumoraux sont désordonnés d'un point de vue architectural, avec une organisation en mosaïque due à un nombre important de branchements en cul-de-sac. De plus, ces vaisseaux ne sont pas organisés en veinules/artérioles/capillaires mais présentent néanmoins certaines de ces caractéristiques (Figure 9).

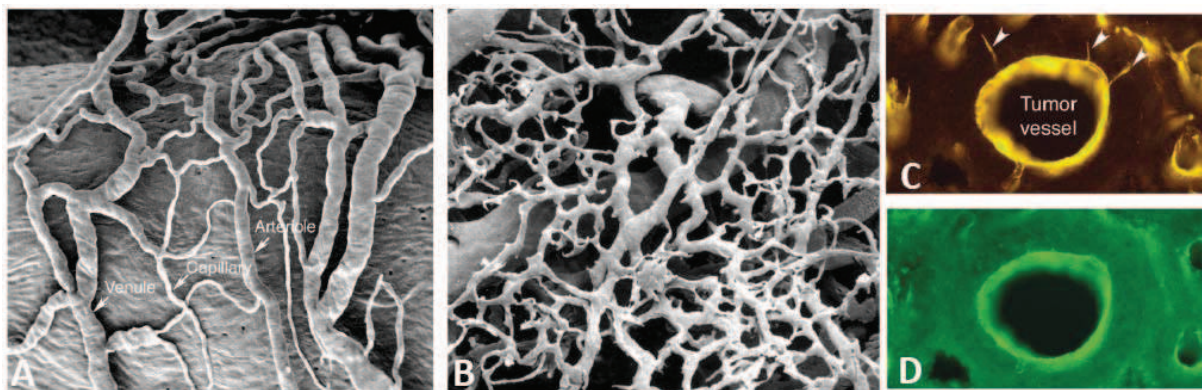


Figure 9. Architecture des vaisseaux normaux et intratumoraux.

Les vaisseaux normaux visualisés par microscopie électronique à balayage (A) présentent une structure organisée en artérioles, capillaires et veinules. A contrario, les vaisseaux intratumoraux (B) sont désorganisés, sans présence identifiable d'artérioles, de capillaires et de veinules et présentent une structure en mosaïque. (C-D) Les vaisseaux intratumoraux présentent également des branchements en cul-de-sac, visualisés ici par l'absence de lectine dans les extensions vasculaires après injection intraveineuse (cellules endothéliales en jaune et lectine en vert) (McDonald and Choyke, 2003).

- La paroi des vaisseaux intratumoraux est généralement incomplète avec des lacunes au niveau de la membrane basale ainsi qu'une raréfaction des cellules accessoires, principalement les péricytes et cellules musculaires lisses (Figure 10).

Introduction

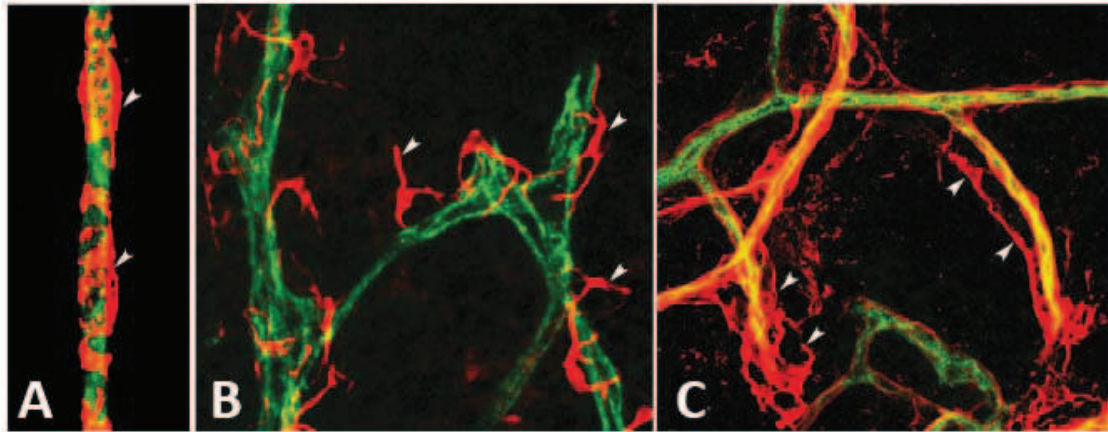


Figure 10. Visualisation de la membrane basale et des péricytes des vaisseaux intratumoraux.

Dans les vaisseaux normaux (A), les péricytes (en rouge) enveloppent les cellules endothéliales (en vert) alors qu'elles sont attachées de manière lâche aux cellules endothéliales de vaisseaux intratumoraux (B, observé par microscopie confocale). (C) La membrane basale (en rouge) des vaisseaux intratumoraux présente différentes anomalies, telles que l'absence de lame basale ou une présence fragmentaire avec une organisation en multicouches (McDonald and Choyke, 2003).

- Les vaisseaux intratumoraux sont hautement dilatés et présentent une perméabilité accrue due, en grande partie, à de faibles jonctions entre les cellules endothéliales des vaisseaux. Cela conduit à la formation de ce que l'on appelle des lits vasculaires, résultant des phénomènes d'hémorragies intratumorales (Figure 11).

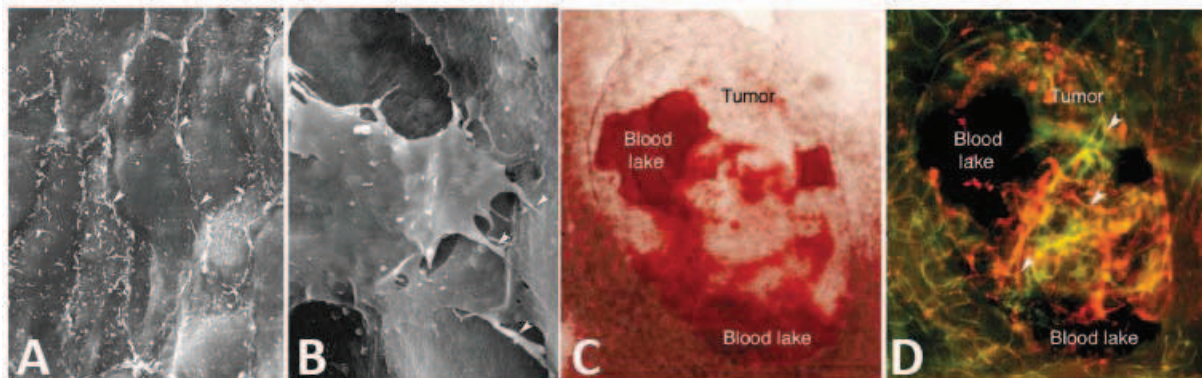


Figure 11. Haute perméabilité des vaisseaux intratumoraux et formation de lits vasculaires.

Les vaisseaux normaux présentent des jonctions entre cellules endothéliales serrées (A), au contraire des vaisseaux intratumoraux (B), visualisés ici par microscopie électronique à balayage. De ce fait, les vaisseaux sont hautement perméables ce qui conduit à la formation de lits vasculaires visualisés par microscopie optique (C) et par microscopie à fluorescence (D). La fluorescence verte correspond à la lectine permettant de visualiser le réseau sanguin et la fluorescence rouge correspond à des liposomes cationiques injectés par intraveineuse permettant de visualiser la circulation sanguine. Nous pouvons constater que les lits vasculaires ne sont pas en continuité avec le réseau sanguin et ne comportent aucune trace du traceur fluorescent, signe que ces lits proviennent d'hémorragies (McDonald and Choyke, 2003).

II.B. Initiation de la vascularisation tumorale : le switch angiogénique

Durant la vasculogénèse embryonnaire, la formation des vaisseaux sanguins s'effectue *de novo* à partir de différents précurseurs endothéliaux afin de former un réseau vasculaire primitif. Ce réseau se différencie, par la suite, et de nouveaux vaisseaux sanguins se forment. C'est ce que l'on appelle l'angiogénèse (Carmeliet, 2000). A l'âge adulte, le réseau vasculaire est dans un état de quiescence, et le processus d'angiogénèse n'intervient, par exemple, que lors de la menstruation chez la femme ou lors de lésions tissulaires suite à une blessure. Lorsque ce processus intervient, les néovaisseaux formés mûrissent rapidement et se stabilisent, les cellules endothéliales entrant en quiescence.

A contrario, les processus de vascularisation tumorale se révèlent bien différents. La tumeur, qui peut être décrite comme une « blessure qui ne guérit jamais » (Dvorak, 1986), voit son réseau vasculaire ne jamais entrer en quiescence avec, par conséquent, une formation continue de nouveaux vaisseaux sanguins intratumoraux découlant de l'événement clef dans l'initiation de vascularisation tumorale : le switch angiogénique.

II.B.1 Le switch angiogénique

L'initiation de la vascularisation tumorale, mais également les différences de structures et de caractéristiques entre vaisseaux normaux et vaisseaux intratumoraux évoquées précédemment, sont dues à une dérégulation de la balance entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques. Dans des conditions physiologiques normales, les facteurs anti-angiogéniques sont prépondérants ou en équilibre par rapport aux facteurs pro-angiogéniques, ceci conduisant au maintien des cellules endothéliales en état de quiescence et au maintien de la structure hiérarchique des vaisseaux sanguins. Pendant le développement tumoral, la balance se déplace en faveur des facteurs pro-angiogéniques ; cet événement est communément appelé switch angiogénique. Ce switch conduit à la sortie de quiescence des cellules endothéliales, au recrutement de précurseurs endothéliaux et, par conséquent, à la formation de vaisseaux sanguins intratumoraux par angiogénèse et vasculogénèse (Figure 12).

Introduction

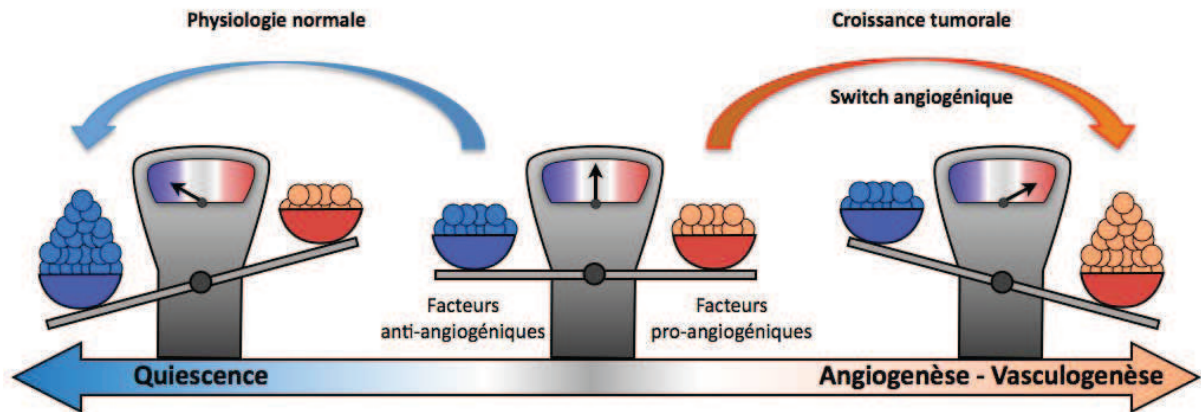


Figure 12. Le switch angiogénique.

Dans des conditions physiologiques normales, les facteurs anti-angiogéniques sont prépondérants par rapport aux facteurs pro-angiogéniques. Cela se traduit par un maintien en état de quiescence des cellules endothéliales, une stabilisation des vaisseaux et donc une inhibition de l'angiogenèse. Lors de la croissance tumorale, différents stimuli conduisent à un déplacement de la balance en faveur des facteurs pro-angiogéniques. Cet événement que l'on nomme switch angiogénique provoque une sortie de quiescence, une activation des cellules endothéliales et subséquentement un engagement du processus d'angiogenèse.

Le déplacement de la balance en faveur des facteurs pro-angiogéniques est dû, généralement, à une augmentation de l'expression de ces facteurs par les cellules cancéreuses et par des cellules normales adjacentes, mais il peut également y avoir en parallèle une diminution de l'expression des facteurs anti-angiogéniques solubles (Bergers and Benjamin, 2003).

Ainsi, les différentes altérations géniques des cellules cancéreuses peuvent contribuer à l'initiation de la vascularisation tumorale (Baeriswyl and Christofori, 2009; Bergers and Benjamin, 2003; Fox *et al.*, 2007; Kerbel and Folkman, 2002). L'activation d'oncogènes, tels que **Ras** (Arbiser *et al.*, 1997; Matsuo *et al.*, 2009; Rak *et al.*, 2000), **c-myc** (Fotsis *et al.*, 1999; Ngo *et al.*, 2000), **c-erbB-2** (Klos *et al.*, 2006; Linderholm *et al.*, 2004), **c-jun** (Kim *et al.*, 2009b; Matsuo *et al.*, 2009) et **src** (Kim *et al.*, 2009a; Mukhopadhyay *et al.*, 1995), ou l'inactivation de suppresseurs de tumeurs, tels que **p53** (Dameron *et al.*, 1994; Mukhopadhyay *et al.*, 1995) et **Rb** (Gabellini *et al.*, 2006), conduisent à l'initiation du switch angiogénique par surexpression de facteurs pro-angiogéniques (Ex : VEGF) ou par diminution de l'expression de facteurs anti-angiogéniques (Ex : thrombospondine).

Introduction

En conjugaison de la surexpression de facteurs pro-angiogéniques due aux altérations géniques, différents stress environnementaux survenant en absence de vascularisation tumorale vont également contribuer à l'initiation du switch angiogénique. Ces stress peuvent être dus à une insuffisance en glucose, une formation d'espèces réactives de l'oxygène, une acidose cellulaire ou une déficience en fer. Enfin, l'hypoxie est un stress métabolique majeur et la signalisation induite par ce stress est abondamment décrite dans la littérature en raison de son importance dans l'initiation du switch angiogénique comme nous le verrons ci-après.

II.B.2 Le rôle de l'hypoxie

L'hypoxie est la conséquence physiopathologique de la réduction du niveau normal de la tension en oxygène des tissus due à l'absence ou à la déstructuration du réseau vasculaire. Ce stress métabolique majeur est extrêmement courant au début de la croissance tumorale, du fait de l'absence d'un réseau vasculaire intratumoral, mais également tout au long de cette croissance, conséquence du caractère aberrant des vaisseaux intratumoraux et de la mauvaise circulation du sang dans ceux-ci. En réponse à ce stress, les cellules cancéreuses s'adaptent afin de survivre et prolifèrent dans cet environnement hypoxique. La réponse des cellules cancéreuses à l'hypoxie s'effectue principalement *via* le facteur de transcription HIF-1 qui est composé des sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β appelé aussi ARNT (Harris, 2002). A noter qu'il existe également les sous-unités HIF-2 α et HIF-3 α dont le rôle dans la réponse à l'hypoxie reste bien moindre par rapport à HIF-1 α .

II.B.2.a La voie HIF-1

Quand la tension en oxygène tissulaire est normale, c'est à dire en normoxie, les « senseurs à oxygène » prolyl hydroxylases (1, 2 et 3) hydroxylent la sous-unité HIF-1 α , au niveau du domaine de dégradation oxygène dépendant (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 2001). La forme hydroxylée de HIF-1 α interagit avec le suppresseur de tumeurs VHL, qui sera alors ubiquitinylé et dégradé par le protéasome (Cockman *et al.*, 2000). En condition d'hypoxie, l'oxygène n'est pas disponible et son absence rend impossible l'hydroxylation de HIF-1 α ; la sous-unité se trouve ainsi stabilisée. HIF-1 α est alors transloqué au noyau et s'associe à la sous-unité HIF-1 β , formant le facteur de transcription HIF-1. HIF-1 recrute alors différents co-activateurs, tels que CBP/P300 (Yamashita *et al.*, 2001), ainsi que le complexe

Introduction

DNA Polymerase II, ce complexe se fixant au niveau des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE). Les différents gènes cibles de l'hypoxie (Tableau 3) sont alors transcrits (Figure 13). En particulier, certains sont des gènes clés pour l'initiation de la vascularisation tumorale, telle que les facteurs de croissance, les cytokines et les métalloprotéases.

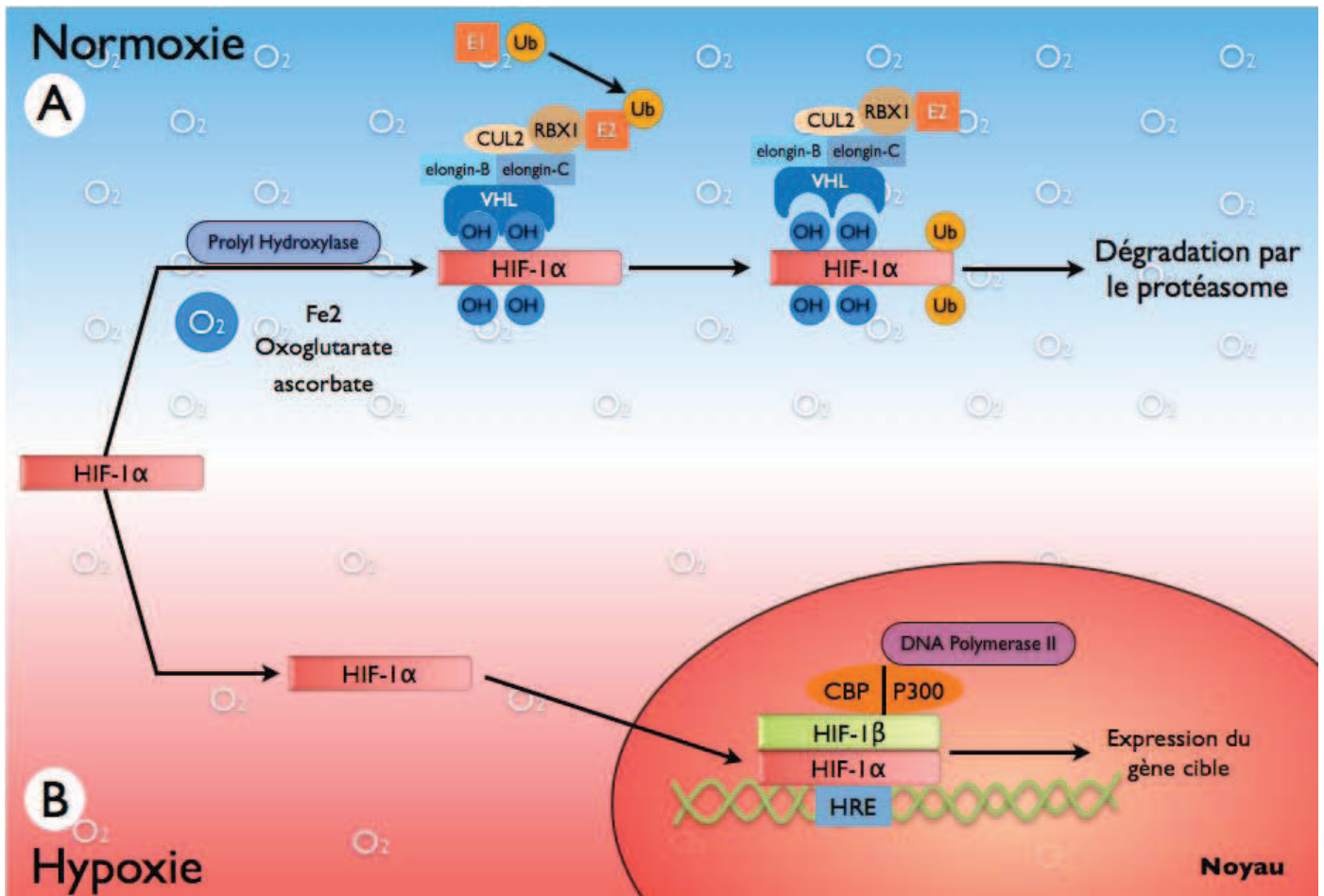


Figure 13. La voie HIF-1.

(A) En condition de normoxie, la prolyl hydroxylase hydroxyle la sous-unité HIF-1 α , entraînant son interaction avec le complexe de Von Hippel-Lindau qui est composé du VHL, de l'elongin-B, de l'elongin-C, de CUL2, de RBX1 et de l'ubiquitin-conjugating enzyme E2. Le complexe VHL/HIF-1 α en interagissant avec l'ubiquitin-activating enzyme E1 entraîne l'ubiquitination de HIF-1 α (Stebbins et al., 1999). HIF-1 α ubiquitinilé sera alors dégradé par le protéasome. (B) En absence d'oxygène, la prolyl hydroxylase ne peut hydroxiler HIF-1 α . HIF-1 α stabilisé est alors transloqué au noyau et s'hétérodimérise avec la sous-unité HIF-1 β , formant le facteur de transcription HIF-1. HIF-1 recrute les co-facteurs CBP/p300/DNA Polymerase II et ce complexe se lie au niveau des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) des gènes cibles.

Introduction

Transport de l'oxygène et métabolisme du fer
Ceruloplasmin, erythropoietin, ferritin light chain, heme oxygenase 1, transferrin, transferrin receptor
Switch angiogénique et vascularisation
Adrenomedullin, angiopoietin 2, cyclooxygenase 2, endothelin 1 et 2, FGF-3, HGF/SF, histone deacetylase, MCP-1, NO Synthase, osteopontin, PlGF, Tie-2 (récepteur à angiopoietin), TGF- α / - β 1 / - β 3, VEGF-A, VEGF Receptor
Glycolyse et transport du glucose
Aldolase-A, enolase-1, GLUT1, GLUT3, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase-1, hexokinase-2, lactate dehydrogenase A, phosphofruktokinase C, phosphofruktokinase L, phosphoglycerate kinase-1, pyruvate kinase M
Facteurs de transcription
Annexin V, BIK, cyclin G2, DEC1, FOS, hsp, HIF-1 α , HIF-2 α , IGFBP-1 / -2 / -3, JUN, KIP1, lipocortin, NF- κ B, transgelin, transglutaminase-2
Métabolismes, pH et neurotransmetteurs
Acetoacetyl CoA thiolase, adenylate kinase 3, aminopeptidase A, carbonic anhydrase 9/12, phosphoribosyl pyrophosphate synthetase, spermidine N1-acetyltransferase, tyrosine hydroxylases, α -adrenergic receptor
Facteurs de croissance et cytokines
IGF 2, interleukin 6, interleukin 8, intestinal trefoil factor, MIF, PDGF, staniocalcin
Réponse au stress
150-kDa ORP, glucose-related protein, GADD, HAP-1, thioredoxin
Molécules d'adhérence, de la matrice extracellulaire, du cytosquelette/protéase et facteurs de coagulation
CD99, collagen-5 α 1, Ku70, Ku80, LDL receptor-related protein, metalloproteinases, MMP-13, L1CAM, PAI-1, proline-4-hydroxylase, TF, uPAR, vimentin, α -integrin

Tableau 3. Exemples de gènes cibles du facteur de transcription HIF-1
(Harris, 2002)

II.B.2.b Autres régulations de la voie HIF-1.

L'analyse de tumeurs primaires de cancer du sein par immunohistochimie montre deux profils d'expression de HIF-1 α bien distincts. HIF-1 α est retrouvé fortement exprimé au niveau des foyers d'hypoxie, c'est à dire dans les régions peu ou pas vascularisées. Cela est dû, comme nous l'avons vu précédemment, à la stabilisation de la sous-unité HIF-1 α suite au stress hypoxique. Mais HIF-1 α est également retrouvé exprimé de manière diffuse dans la totalité des tumeurs, indiquant une augmentation du niveau de HIF-1 α indépendante de l'hypoxie (Vleugel *et al.*, 2005). De plus, il est décrit dans le cancer du sein qu'un haut niveau de HIF-1 α est corrélé à une aggravation du stade clinique et constitue un facteur de mauvais pronostic (Bos *et al.*, 2003; Dales *et al.*, 2005; Schindl *et al.*, 2002; Trastour *et al.*, 2007).

Introduction

Les hauts niveaux de HIF-1 α retrouvés en condition de normoxie sont la conséquence de la stabilisation de HIF-1 α , de l'augmentation de l'expression de HIF-1 α ou de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (notamment par une augmentation de l'affinité de HIF-1 α pour HIF-1 β) suite à l'activation de différentes signalisations ; ceci étant observé dans de nombreux cancers. Trois voies de signalisation majeures sont donc impliquées dans la régulation positive de HIF-1 α :

- L'activation de la voie des MAPK aboutit à la phosphorylation de HIF-1 α qui augmente, d'une part, son affinité avec la sous-unité HIF-1 β (Hofer *et al.*, 2001; Hur *et al.*, 2001) et, d'autre part, son affinité avec les co-facteurs p300 et TAD-C (Sang *et al.*, 2003). Ainsi, le complexe HIF-1 se formera plus facilement, le recrutement des différents co-facteurs s'opérera plus rapidement et verra donc son activité transcriptionnelle grandement renforcée. L'activation de la voie MAPK peut également conduire à une augmentation de la synthèse protéique de HIF-1 α (Fukuda *et al.*, 2002).
- La voie PI3K/Akt/mTor est également un régulateur important de HIF-1 α , contribuant à la stabilisation (Chen *et al.*, 2001b) et à l'augmentation de l'expression de la sous-unité (Jiang *et al.*, 2001).
- L'activation de La voie NF- κ B conduit à une stabilisation et donc une accumulation de la protéine HIF-1 α .

Ces différentes voies de signalisation peuvent être activées par des facteurs de croissance tels que l'IGF (Feldser *et al.*, 1999), le TNF- α (Hellwig-Burgel *et al.*, 1999) ou l'EGF (Laughner *et al.*, 2001), par des oncogènes tels que Src (Jiang *et al.*, 1997; Karni *et al.*, 2002) et Ras (Chen *et al.*, 2001a; Mazure *et al.*, 1997), ou suite à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs comme par exemple PTEN (Zundel *et al.*, 2000) et VHL (Shuin *et al.*, 1999).

II.B.3 Les facteurs du switch angiogénique : facteurs pro- et anti-angiogéniques.

L'initiation de la vascularisation dépend de l'augmentation d'expression des facteurs pro-angiogéniques au détriment des facteurs anti-angiogéniques.

Au sein de la famille des facteurs pro-angiogéniques (Tableau 4), on retrouve essentiellement des facteurs de croissance et des facteurs hématopoïétiques qui sont sécrétés, pour la plupart, par les cellules cancéreuses, mais également par les cellules du stroma. Le facteur de croissance pro-angiogénique le plus important est le VEGF avec en particulier le VEGF-A. Le VEGF-A, membre majeur de la famille du VEGF, est composé de plusieurs isoformes, le VEGF₁₂₁ / VEGF₁₆₅ / VEGF₁₈₂ / VEGF₂₀₆, qui sont les produits d'épissages alternatifs (le chiffre indiqué donnant le nom de l'isoforme correspond au nombre d'acides aminés qui la constitue). Le VEGF₁₆₅ est d'ailleurs considéré comme l'isoforme la plus active (Ferrara *et al.*, 2003). De plus le VEGF₁₆₅ est l'isoforme la plus exprimée dans les tissus sains (Mura *et al.*, 2004) ainsi que dans de nombreux cancers, et particulièrement dans le cancer du sein (Linderholm *et al.*, 1998; Stimpfl *et al.*, 2002). La matrice extracellulaire est également une importante réserve de facteurs pro-angiogéniques. Par exemple, certaines isoformes du VEGF-A (VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₂, VEGF₂₀₆) peuvent être séquestrées dans la matrice extracellulaire en se liant, avec une plus ou moins grande affinité, aux héparanes sulfates (Ferrara *et al.*, 2003). Les facteurs protéolytiques, tels que les MMP, les uPA et les tPA, sont également essentiels dans le processus de vascularisation.

Concernant les facteurs anti-angiogéniques (voir Tableau 4), ce sont en majorité des inhibiteurs d'enzymes protéolytiques, tels que les TIMP et le PAI, de fragments issus de la protéolyse, tels que l'angiostatine, ou de médiateurs solubles, tels que l'Interleukine 4 et 12.

Introduction

Facteurs pro-angiogéniques	Facteurs anti-angiogéniques
Facteurs de croissance	Médiateurs solubles
<ul style="list-style-type: none"> - Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - Placental Growth Factor (PIGF) - Fibroblast Growth Factor (FGF) - Platelet Derived Growth Factor (PDGF) - Hepatocyte Growth Factor/Scater Factor (HGF/SF) - Transforming Growth Factor α et β (TGFα – TGFβ) - Epidermal Growth Factor (EGF) - Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) 	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombospondine 1 (TSP1) - Troponine 1 - Platelet Factor 4 (PF4) - Retinoïc acid (RA) - Angiopoïetin 2 (Ang2) - Angioarrestin
Médiateurs de l'inflammation	Fragments protéiques
<ul style="list-style-type: none"> - Tumor Necrosis Factor α (TNFα) - Interleukine 8 (IL8) - Interleukine 3 (IL3) - Prostaglandines E1, E2 	<ul style="list-style-type: none"> - Angiostatine (fragment du plasminogène) - Endostatine (fragment du collagène XVIII) - Fragment de l'anti-thrombine III
Facteurs hématopoïétiques	Médiateurs de l'inflammation
<ul style="list-style-type: none"> - Erythroïétine - Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) - Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) - Stem Cell Factor (SCF) 	<ul style="list-style-type: none"> - Interleukine 4 (IL4) - Interleukine 12 (IL12) - Interferon α / β / γ
Enzymes	Inhibiteurs d'Enzymes
<ul style="list-style-type: none"> - Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor/Thymidine Phosphorylase (PD-ECGF/TP) - Cyclooxygenase 2 - Angiogenine - Matrix Metalloprotease - Heparanase - Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) - tissue Plasminogen Activator (tPA) 	<ul style="list-style-type: none"> - Tissue Inhibitor of MetalloProtease (TIMP) - Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)
Molécule d'adhérence	
<ul style="list-style-type: none"> - Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM1) - E-selectin 	
Autres	
<ul style="list-style-type: none"> - Angiopoïetin 1 (Ang1) - Nitric Oxyde (NO) 	

Tableau 4. Les principaux facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques.
(Liekens et al., 2001)

II.C. Mécanisme de la néovascularisation

Suite au switch angiogénique, plusieurs processus sont initiés sous l'action des facteurs pro-angiogéniques, permettant une vascularisation de la tumeur. Ainsi, l'angiogenèse et la vasculogenèse sont les deux principaux processus impliqués dans la formation des vaisseaux intratumoraux. De plus, des processus de réorganisation vasculaire et de mimétisme vasculogénique peuvent également intervenir en soutien.

II.C.1 L'angiogenèse

II.C.1.a Un processus complexe

L'angiogenèse est considérée, par nombre de chercheurs, comme le processus essentiel de la vascularisation tumorale. Elle peut être définie comme étant la formation de nouveaux vaisseaux à partir du réseau vasculaire préexistant dans la périphérie de la tumeur. Ce processus débute suite à la sortie de quiescence des cellules endothéliales des vaisseaux péri-tumoraux provoquée par le switch angiogénique ; cet événement est appelé **activation** ou **initiation des cellules endothéliales**. L'angiogenèse se décompose alors en différentes étapes clefs afin d'aboutir à la formation de vaisseaux sanguins. Ainsi, la perméabilisation des vaisseaux péri-tumoraux (Figure 14), la migration/invasion (Figure 15), la croissance (Figure 16) et l'organisation finale des cellules endothéliales en vaisseaux sanguins (Figure 17) se succèdent sous l'action stimulatrice des facteurs pro-angiogéniques.

Les différentes signalisations impliquées dans le déroulement des étapes successives de l'angiogenèse seront illustrées en utilisant, en particulier, la signalisation induite par le VEGF comme exemple. La forme majoritaire du VEGF, le VEGF-A et en particulier l'isoforme VEGF₁₆₅, se fixe aux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Notons que le VEGFR-2, récepteur à forte affinité pour le VEGF-A, représente le récepteur le plus important dans l'induction de la signalisation menant à l'angiogenèse, les différentes voies de signalisation induites par ce récepteur étant bien connues.

Introduction

- **La perméabilisation des vaisseaux sanguins péri-tumoraux.**

La perméabilisation des vaisseaux sanguins est le premier événement survenant suite à l'activation des cellules endothéliales par les facteurs pro-angiogéniques ; le VEGF étant le meilleur représentant des facteurs inducteurs de la perméabilité. En effet, le VEGF avait été découvert et étudié, à l'origine, en raison de son puissant effet sur l'hyperperméabilisation des veines et des veinules. L'effet du VEGF était tel qu'il fut nommé, au moment de sa découverte, « Vascular Permeability Factor » ou VPF (Dvorak *et al.*, 1995).

La perméabilisation des vaisseaux péri-tumoraux mais également, par la suite, des vaisseaux intratumoraux, entraîne des fuites de protéines contenues dans le plasma, essentiellement le fibrinogène ainsi que d'autres protéines impliquées dans la coagulation. Les fibrines, produits de clivage du fibrinogène sous l'action des thrombines, se déposent alors dans l'espace périvasculaire séparant le réseau vasculaire de la masse tumorale. Le stroma des tissus normaux à caractère anti-angiogénique devient alors un environnement pro-angiogénique en favorisant notamment la migration/invasion des cellules endothéliales (Dvorak *et al.*, 1999; Nagy *et al.*, 2006). La formation de lits vasculaires, d'effusions pleurales (Yuan *et al.*, 1996) et d'ascites (Yoshiji *et al.*, 2001) sont d'autres conséquences de la perméabilisation des vaisseaux.

Plusieurs mécanismes potentiels peuvent être mis en œuvre dans la stimulation de la perméabilité induite par le VEGF. Ainsi, les différentes protéines du plasma peuvent traverser l'endothélium vasculaire par voie transendothéliale. Ce transport se ferait *via* un trafic vésiculaire (Dvorak, 2002; Dvorak *et al.*, 1995; Nagy *et al.*, 2008), mais tous les scientifiques ne sont pas en accord avec cette hypothèse (Rippe *et al.*, 2002). Le VEGF peut également induire la formation de fenestrations dans les vaisseaux, notamment par une perte de jonctions entre les cellules endothéliales, ceci conduisant à l'extravasation de plasma (Figure 14) (Hicklin and Ellis, 2005).

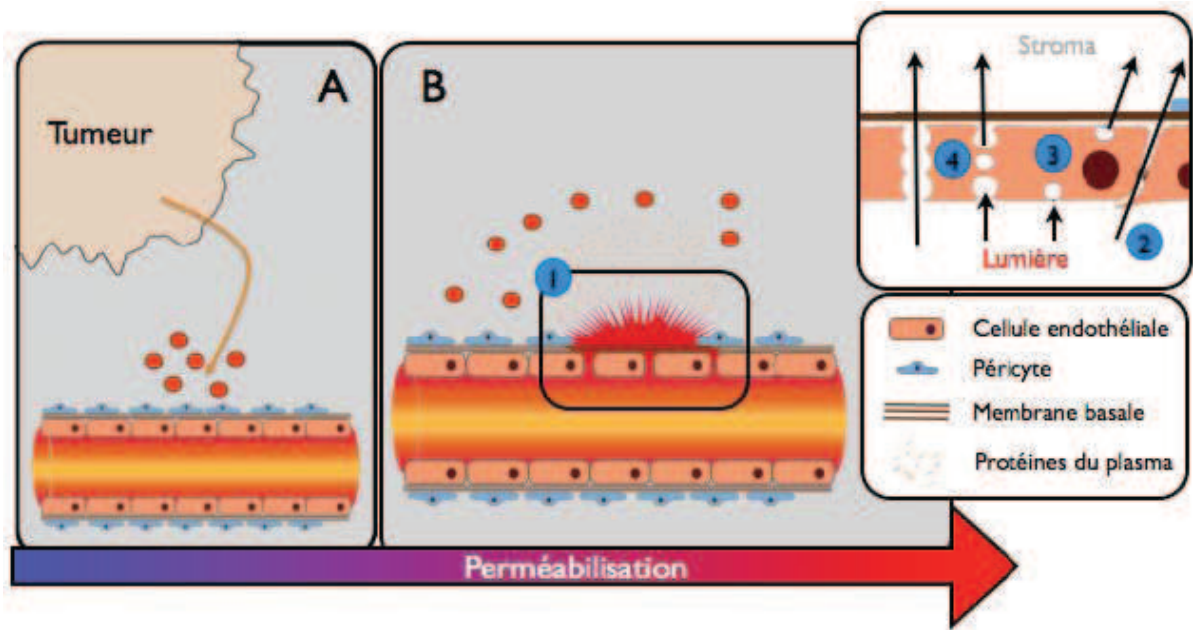


Figure 14. Perméabilité des vaisseaux sanguins.

Consécutivement au switch angiogénique, la tumeur libère un grand nombre de facteurs pro-angiogéniques, entraînant la sortie de quiescence des cellules endothéliales des vaisseaux péri-tumoraux (A). Cela entraîne, en premier lieu, une perméabilisation de ces vaisseaux (B), conduisant à des fuites de protéines du plasma. Ces fuites peuvent être dues à la formation de fenestrations (1), à des fuites au niveau des jonctions entre cellules endothéliales (2), à un trafic vésiculaire (3) allant jusqu'à la formation d'une chaîne vésiculaire connectant la lumière du vaisseau au stroma (4). Adapté de (Nagy *et al.*, 2008)

Enfin, la perméabilisation vasculaire induite par le VEGF dépend de la production d'oxyde nitrique par le NO Synthase et de prostaglandine 2 par les cyclooxygénases (Cianchi *et al.*, 2004; Kowanetz and Ferrara, 2006; Namkoong *et al.*, 2005; Zachary and Glicki, 2001).

- **La migration et l'invasion**

La migration et l'invasion des cellules endothéliales constituent les premières étapes importantes du processus angiogénique. Elles requièrent, dans un premier temps, la dégradation de la membrane basale des vaisseaux sanguins et, par la suite, une dégradation des protéines de la matrice extracellulaire grâce à l'activité de nombreuses protéases (Choong and Nadesapillai, 2003; Hicklin and Ellis, 2005)(Tableau 4) afin que les cellules endothéliales puissent envahir le stroma tumoral et former des bourgeons vasculaires (Ferrara *et al.*, 2003).

Les facteurs pro-angiogéniques, dans le cas présent le VEGF-A, stimulent la migration et l'invasion des cellules endothéliales en activant différentes voies de signalisation (Figure 15). Ainsi, la phosphorylation du VEGFR2, suite à la fixation du VEGF-A, conduit à l'activation

Introduction

essentiellement de la voie PI3K/Akt, MAPK et p38 MAPK. La production d'oxyde nitrique (NO) par la NOS, suite à l'activation de la voie PI3K/Akt (Dimmeler et al., 1999) ou de Src (Duval et al., 2007) stimule la migration par induction de la podokinésie et par régulation de l'intégrité des points d'adhérence focaux, notamment en conditionnant la phosphorylation des FAK (Dimmeler et al., 2000; Hicklin and Ellis, 2005; Zachary and Glikli, 2001). L'activation de la voie p38 MAPK, quant à elle, module la polymérisation de l'actine (Landry and Huot, 1999). La voie MAPK contribue à la stimulation de la migration, mais également à la stimulation de l'invasion en augmentant l'expression des différentes protéases de la matrice extracellulaire (Munoz-Chapuli et al., 2004), l'invasion étant la conjugaison de la migration cellulaire et de la digestion du stroma par les protéases. A noter que la phosphorylation de FAK peut également conduire à l'activation des voies PI3K/Akt/NOS et MAPK (Munoz-Chapuli et al., 2004).

- **La croissance**

Afin de fournir les cellules endothéliales nécessaires à la formation du réseau vasculaire intratumoral, les cellules endothéliales prolifèrent de manière active sous l'action des facteurs de croissance pro-angiogéniques. La survie des cellules endothéliales induites par ces facteurs est également essentielle au maintien de cette population et par la suite au maintien du réseau vasculaire ainsi formé

Pour reprendre l'exemple du VEGF, ce facteur stimule la prolifération et la survie des cellules endothéliales suite à l'activation des voies MAPK et PI3K/Akt (Figure 16). La voie MAPK peut être activée via Grb-SOS-Ras mais également via PLC γ -PKC (Munoz-Chapuli et al., 2004). La production de NO consécutive à l'activation de la NOS est également essentielle à la prolifération des cellules (Morbidelli et al., 1996; Parenti et al., 1998). A noter que la libération de calcium due à la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) à partir du phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate suite à l'activation de la PLC γ peut, en plus d'activer la PKC, influencer sur la production de NO (Bauer et al., 2000). D'autre part, la survie des cellules endothéliales dépend de l'activation de la voie PI3K/Akt. Ainsi, Akt induit une augmentation d'expression de la survivin (Tran et al., 2002) et l'expression des IAPs via le facteur de transcription NF- κ B (Romashkova and Makarov, 1999). Akt inhibe également de nombreux facteurs pro-apoptotiques et augmente l'expression des facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et la protéine A1 (Brunet et al., 1999; Gerber et al., 1998;

Introduction

Hermann et al., 2000). La production de NO induit également la survie des cellules en concourant à l'inactivation des caspases (Brunner et al., 2003; Shiojima and Walsh, 2002). Enfin la phosphorylation de la FAK induit la survie des cellules endothéliales (signaux d'adhérence) (Ilic et al., 1998).

- **La formation des néo-vaisseaux**

Les cellules endothéliales, au fil des étapes du processus angiogénique, s'organisent en un réseau vasculaire intratumoral connecté aux vaisseaux péritumoraux (Figure 17). Ainsi, les cellules s'assemblent en tubes pourvus d'une lumière grâce à l'interaction entre les cellules endothéliales et à la formation de jonctions. Cette lumière s'établit soit par canalisation intracellulaire, c'est à dire par fusion de vésicules cytoplasmiques, soit par canalisation intercellulaire, c'est à dire par apposition d'une membrane provenant de 2 cellules différentes (Milkiewicz *et al.*, 2006). Les vaisseaux nouvellement formés se stabilisent ensuite par le recrutement de cellules accessoires (péricytes, cellules musculaires lisses) et la génération de la membrane basale. Les cellules endothéliales entrent alors en quiescence afin de stabiliser la structure du vaisseau. Cependant, le caractère hautement angiogénique du stroma tumoral est tel que le réseau vasculaire intratumoral n'est pas complètement stabilisé et se révèle désorganisé (voir chapitre II.A.2). Concernant les voies de signalisation impliquées dans la morphogenèse des vaisseaux, il a été décrit que l'activation des voies MAPK, PI3K/Akt et Notch sont nécessaires à la stimulation de ce processus par les facteurs pro-angiogéniques (Munoz-Chapuli *et al.*, 2004).

Introduction

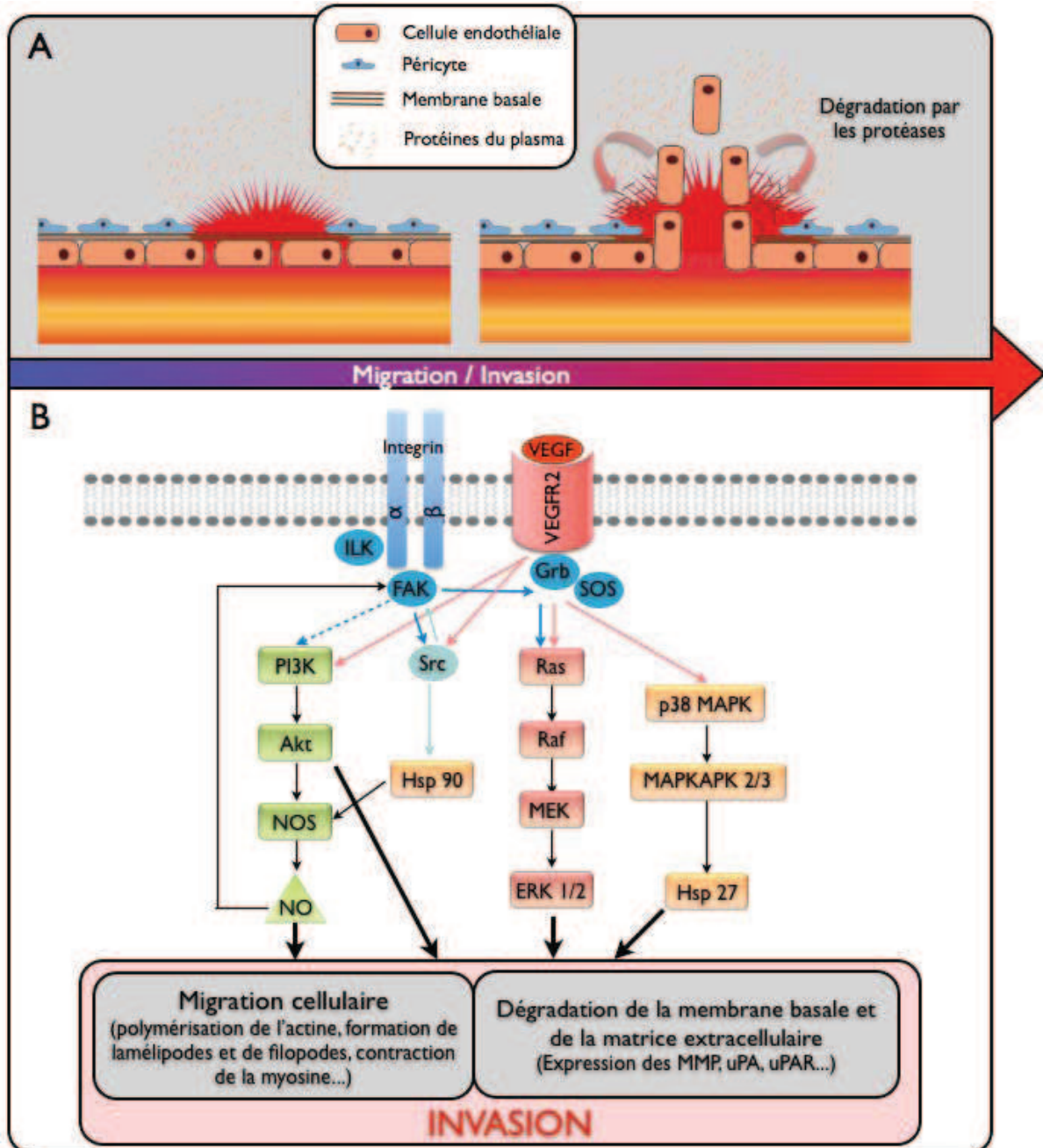


Figure 15. Migration et invasion des cellules endothéliales, signalisation associée induite par le VEGF.

(A) Dans un premier temps, les cellules endothéliales activées dégradent la membrane basale des vaisseaux et par la suite, la matrice extracellulaire afin d'envahir le stroma tumoral. Cette dégradation s'effectue grâce à l'activité protéolytique des MMPs, pour ne citer qu'elles. (B) Les facteurs pro-angiogéniques, stimulent la migration et l'invasion des cellules endothéliales en activant différentes voies de signalisation. Le VEGF-A conduit par exemple à une activation des voies MAPK, PI3K/Akt/NOS et p38 MAPK. Adapté de (Munoz-Chapuli et al., 2004).

Introduction

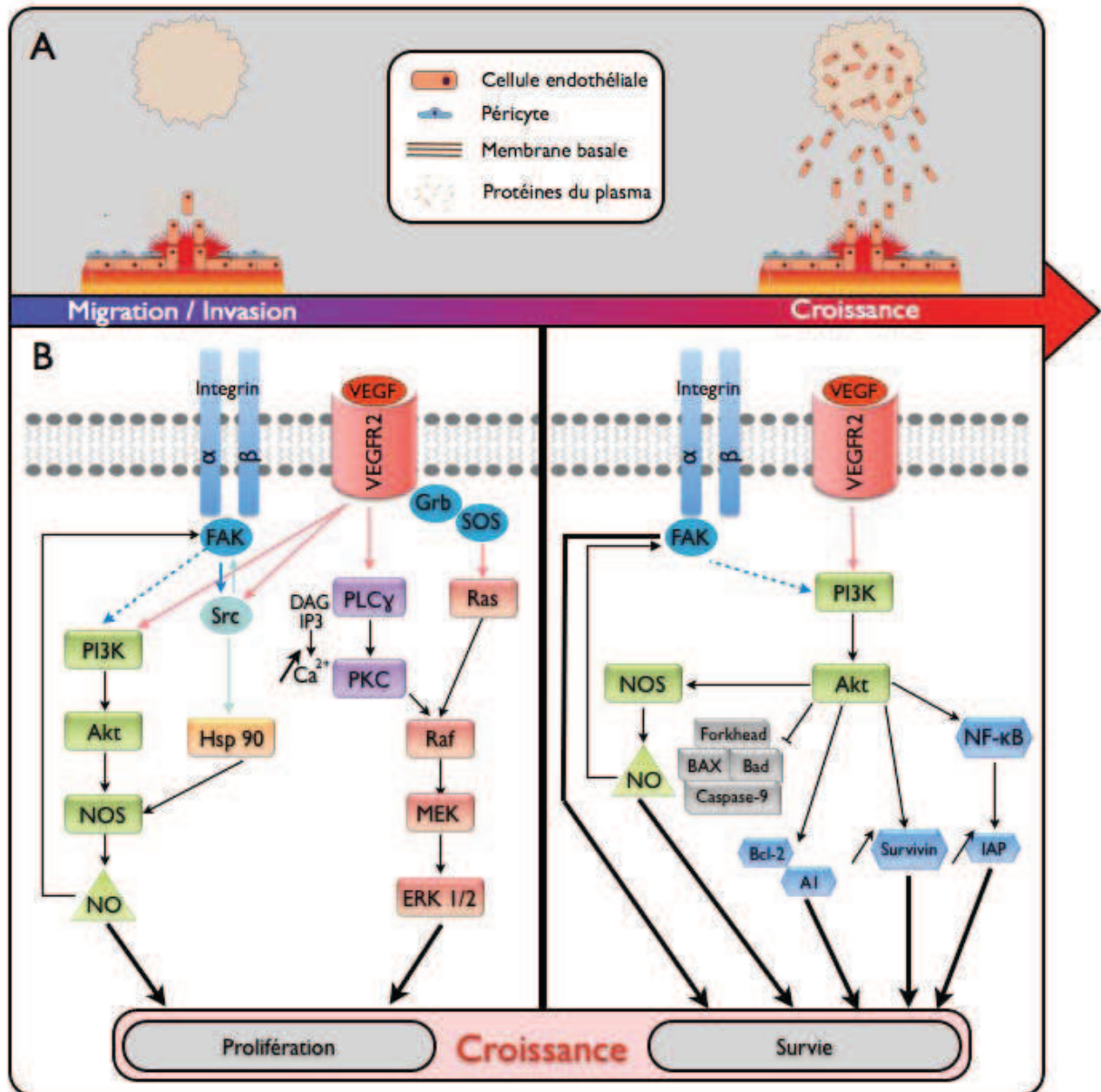


Figure 16. Croissance des cellules endothéliales, signalisation associée induite par le VEGF.

(A) Alors que les cellules endothéliales envahissent le stroma tumoral, celles-ci entrent en croissance sous l'effet des facteurs pro-angiogéniques afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules endothéliales pour former le réseau vasculaire intratumoral. (B) Les facteurs pro-angiogéniques, en occurrence ici le VEGF-A, stimulent la prolifération et la survie des cellules endothéliales suite à l'activation des voies MAPK et PI3K/Akt. Adapté de (Munoz-Chapuli et al., 2004).

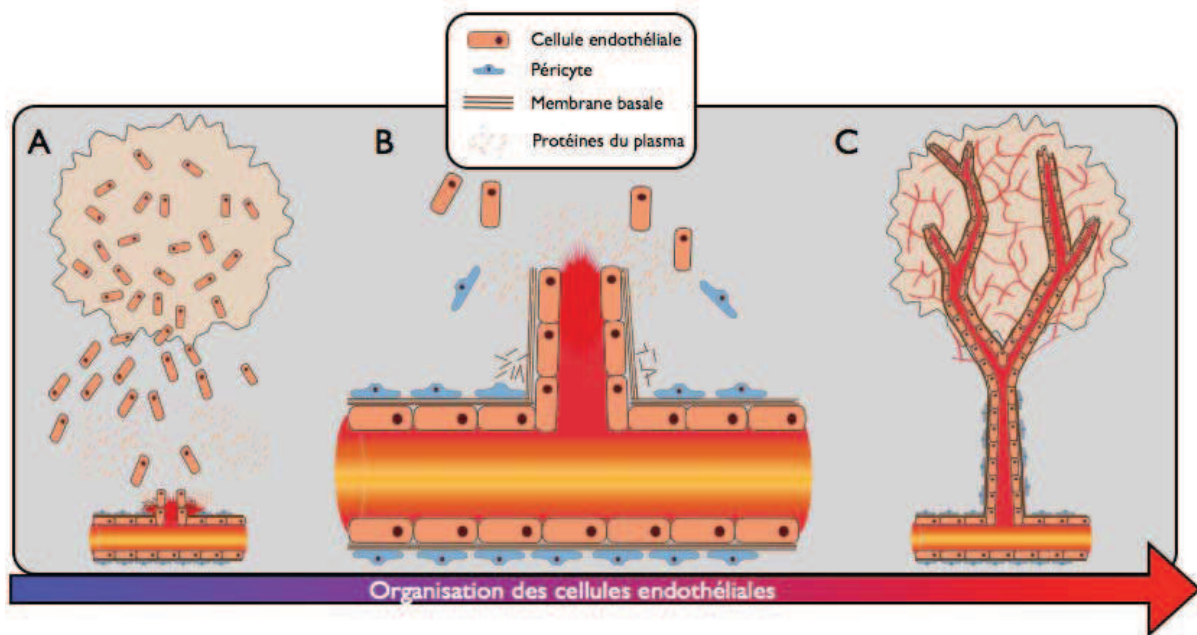


Figure 17. Formation des vaisseaux intratumoraux.

Au fur et à mesure que les cellules endothéliales envahissent le stroma tumoral et prolifèrent activement (A), celles-ci commencent, sous l'effet des facteurs pro-angiogéniques, à s'agencer en tubes pourvus de lumières (B). Ainsi, les cellules se forment à partir du vaisseau péri-tumoral, un bourgeon de vaisseaux progressant vers la tumeur. Une membrane basale rudimentaire se forme progressivement et des péricytes sont recrutés de manière sporadique. A terme, un réseau vasculaire intratumoral connecté à la circulation sanguine se formera afin de perfuser la tumeur (C), concourant à sa croissance et par la suite à la formation de métastases (Milkiewicz *et al.*, 2006; Munoz-Chapuli *et al.*, 2004).

II.C.1.b Impact de l'angiogenèse sur le cancer du sein

La vascularisation de la tumeur mammaire est indispensable à son développement. En effet, il a été décrit pour la première fois qu'environ 30% des tissus mammaires hyperplasiques transplantés dans la cornée de lapin sont angiogéniques, contre seulement 3% des tissus mammaires normaux (Brem *et al.*, 1978). Par la suite, différentes études cliniques furent réalisées. Par exemple, les lésions hyperplasiques ayant une néovascularisation stromale importante présentent un risque élevé de cancer (Guinebretiere *et al.*, 1994). De plus, la présence d'un réseau sanguin intratumoral important constitue un facteur de mauvais pronostic dans les cancers primaires du sein (Uzzan *et al.*, 2004). Enfin, la mesure du niveau d'expression du VEGF dans le cancer du sein constitue un indicateur de la sévérité du cancer, des niveaux élevés en VEGF étant associés à un mauvais pronostic dans les cancers du sein à un stade avancés (Gasparini, 2000; Linderholm *et al.*, 1998; Linderholm *et al.*, 2009; Salven *et al.*, 1999).

II.C.2 La vasculogénèse

La vasculogénèse peut être définie comme étant un processus permettant la formation de nouveaux vaisseaux *de novo* suite au recrutement de différents types de précurseurs endothéliaux ; ces cellules, qui circulent généralement dans le sang, ayant des origines et des caractéristiques diverses (Bertolini *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2000; Neumuller *et al.*, 2006).

Depuis quelques années, des études montrent qu'il y a une contribution des précurseurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse dans la vascularisation tumorale en association avec l'angiogénèse classique (Asahara *et al.*, 1999a; Asahara *et al.*, 1999b; Lyden *et al.*, 2001). Elles constituent une aide à la formation des vaisseaux intratumoraux dans les stades précoces de l'angiogénèse tumorale (Lyden *et al.*, 2001; Nolan *et al.*, 2007) ainsi qu'une aide à la reprise de la croissance tumorale suite à un traitement à l'aide de drogues anticancéreuses à des doses maximales tolérables (Bertolini *et al.*, 2003; Shaked *et al.*, 2008) ou suite à un traitement ciblant les vaisseaux sanguins avec, par exemple, un agent de disruption vasculaire (Shaked *et al.*, 2006).

Les précurseurs endothéliaux semblent apporter une contribution importante à l'angiogénèse tumorale dans le cancer du sein. En effet, les cellules de cancer du sein peuvent recruter ces cellules dans des modèles expérimentaux *in vivo*, contribuant à l'angiogénèse tumorale (Shirakawa *et al.*, 2002a; Shirakawa *et al.*, 2002b). De plus, les patientes atteintes du cancer du sein présentent des taux élevés de précurseurs endothéliaux dans le sang en comparaison avec les taux détectés chez des sujets sains (Furstenberger *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2003) ; ces taux étant corrélé avec un stade élevé de cancer du sein (Goodale *et al.*, 2009; Naik *et al.*, 2008; Richter-Ehrenstein *et al.*, 2007).

En plus de son rôle d'indicateur de la progression du cancer du sein, la quantification des précurseurs endothéliaux dans le sang peut être utilisée afin de déterminer l'efficacité des thérapies anticancéreuses et anti-angiogéniques et d'évaluer le potentiel de survie des patientes (Dellapasqua *et al.*, 2008; Furstenberger *et al.*, 2006; Mancuso *et al.*, 2006; Munoz *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2006; Torrisi *et al.*, 2008).

Introduction

Ces différents éléments sont développés en détail dans la revue « Role of endothelial progenitor cells in breast cancer angiogenesis: from fundamental research to clinical implications » présentée en fin d'introduction.

II.C.3 Autres processus impliqués dans la vascularisation tumorale

Au processus d'angiogenèse et de vasculogenèse peuvent s'ajouter d'autres processus contribuant à la formation des vaisseaux intratumoraux. On peut énumérer principalement les mécanismes d'intussusception, de mimétisme vasculogénique, de co-opton et d'angiogenèse gloméroïde (Auguste *et al.*, 2005; Dome *et al.*, 2007).

II.C.3.a L'intussusception

Ce mécanisme, indépendant de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales, consiste en l'insertion d'un pilier tissulaire au niveau de la lumière du vaisseau, entraînant le partitionnement de cette lumière en deux ou plusieurs canaux indépendants. Pendant l'intussusception, les membranes des cellules endothéliales en opposition entrent en contact, formant une jonction interendothéliale. La pression au niveau des points de contact, exercée essentiellement par les péricytes et le cytoplasme des cellules, entraîne généralement une séparation de la lumière des vaisseaux en deux, indépendantes l'une de l'autre (Figure 18).

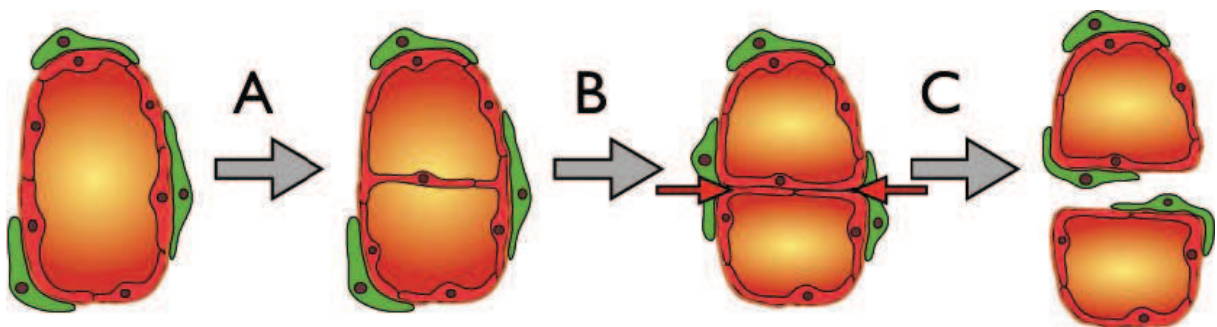


Figure 18. L'intussusception.

Deux cellules endothéliales en opposition peuvent former, dans un premier temps, un pilier transluminal (A). La pression exercée, notamment par les péricytes au niveau du pilier, entraîne une réorganisation de l'endothélium conduisant à une séparation partielle (B), puis totale (C) et à la formation de deux lumières, et donc de deux vaisseaux, indépendants.

Introduction

II.C.3.b Le mimétisme vasculogénique et les vaisseaux en mosaïque

Le mimétisme vasculogénique est un processus de vascularisation assez particulier que l'on rencontre dans nombre de cancers tels que ceux de l'ovaire, de la prostate, du sein ou du poumon (Hendrix *et al.*, 2003; Shirakawa *et al.*, 2002c). Certaines cellules cancéreuses acquièrent une morphologie de cellule endothéliale et expriment différents gènes se révélant être spécifiques aux cellules endothéliales. Ceci peut être expliqué, soit par une transdifférenciation de cellules cancéreuses en cellules pseudo-endothéliales, soit à une différenciation de cellules souches cancéreuses en cellules pseudo-endothéliales (Bertolini *et al.*, 2009; Dome *et al.*, 2007). Ce mimétisme vasculogénique aboutit à la formation d'un réseau capillaire dont l'endothélium est composé essentiellement de cellules cancéreuses au phénotype endothélial, en lieu et place des cellules endothéliales. Par ailleurs, il peut y avoir également formation de vaisseaux sanguins dont l'endothélium est composé de cellules endothéliales et de cellules cancéreuses transdifférenciées. Dans ce cas de figure, on parle de vaisseaux en mosaïque.

II.C.3.c La co-option et l'angiogenèse gloméroïde

La co-option des vaisseaux consiste en une capture des vaisseaux préexistants dans le stroma tumoral. Ce stroma étant fortement angiogène, ces vaisseaux subissent d'importants remodelages. L'angiogenèse gloméroïde, quant à elle, correspond à un agrégat plus ou moins anarchique de capillaires entourés, de manière variable, par la membrane basale et des péricytes (Figure 19). Ces structures sont appelées corps glomérulaires en raison de leur forte similarité avec les glomérules présents dans les reins. Ces corps sont caractéristiques des glioblastomes mais sont également retrouvés dans les cancers invasifs du sein (Brat and Van Meir, 2001). Il a été rapporté que la présence de corps gloméroïdes est associée à un mauvais pronostic (Straume *et al.*, 2002).

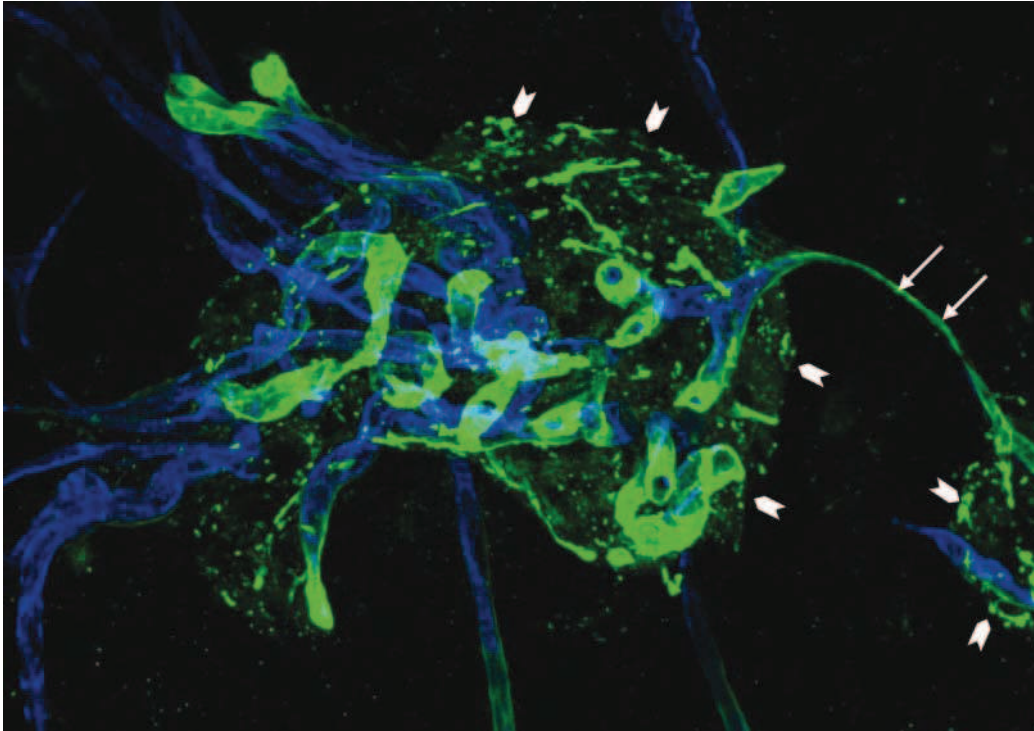


Figure 19. L'angiogenèse gloméroïde.

Cette photographie représente un corps glomérulaire situé dans une métastase localisée au niveau du cerveau et obtenue 28 jours après injection intracarotidienne de cellules de mélanome humain chez une souris. Les cellules endothéliales sont marquées en bleu (marquage de CD31) et la membrane basale en vert (marquage de la laminine) (Dome et al., 2007). Le corps glomérulaire se présente sous la forme d'un réseau de capillaires, complètement désorganisé, encapsulé partiellement par la membrane basale. Les contours de la métastase sont clairement visibles en raison du marquage intense de la laminine des cellules cancéreuses (pointe des flèches).

De manière générale, ces deux formes de vascularisation tumorale sont le plus souvent retrouvées dans le cadre de la formation de métastases (Dome et al., 2007).

II.C.4 Thérapie anti-angiogénique dans le cancer du sein

Etant donné l'importance de la vascularisation dans la croissance, le maintien et la dissémination métastatique de la tumeur, l'angiogenèse, la vasculogénèse et la résultante de ces deux processus, les néo-vaisseaux, constituent de nouvelles cibles thérapeutiques étudiées et exploitées depuis maintenant quelques années (Kim et al., 1993). De plus, le fait que les cellules endothéliales soient, dans une grande majorité, en état de quiescence à la différence des cellules endothéliales intratumorales, explique en partie les effets secondaires plus faibles rencontrés lors des thérapies anti-angiogéniques (Fayette et al., 2005). Un grand nombre d'agents anti-angiogéniques, qui vont cibler pour la plupart l'axe VEGF/récepteur, sont développés et testés en clinique.

Introduction

II.C.4.a Principaux agents ciblant l'axe VEGF – Récepteur dans le cancer du sein

- **Les anticorps monoclonaux : le bevacizumab**

Le bevacizumab, connu aussi sous le nom d'Avastin™ (Genetech), est un anticorps monoclonal humanisé, composé d'un site de liaison au VEGF murin associé à une structure humaine d'IgG (représentant 93% de l'anticorps). Cet anticorps permet de neutraliser l'ensemble des isoformes du VEGF-A, prévenant ainsi la fixation du VEGF à son récepteur. La stimulation de la vascularisation tumorale et, par conséquent, de la croissance tumorale sont alors inhibées ; cette inhibition a été illustrée expérimentalement dans le cadre du cancer du sein (Zhang *et al.*, 2002).

Le bevacizumab est généralement associé à des drogues conventionnelles comme le paclitaxel ou la cyclophosphamide. L'utilisation du bevacizumab, généralement associé à des chimiothérapies conventionnelles, a été approuvée par la Food and Drug Association (FDA) américaine dans le cadre des traitements de première et seconde lignes du cancer colorectal métastatique, en association avec une chimiothérapie basée sur le 5-fluorouracil (2004), du traitement en seconde ligne du cancer du colon en association avec le paclitaxel (2006) ou du traitement en seconde ligne du glioblastome (2008, source National Cancer Institute). L'utilisation du bevacizumab, en association avec le paclitaxel, dans le cadre du traitement en première ligne du cancer métastatique du sein HER2-négatif fut également approuvée en 2008 suite aux essais cliniques précédemment réalisés, dont principalement l'essai de phase 3 E2100 (Miller, 2003; Sachdev and Jahanzeb, 2008).

- **Les inhibiteurs de tyrosine kinase**

En parallèle du bevacizumab, différents inhibiteurs de récepteurs tyrosine-kinases, plus ou moins spécifiques des récepteurs au VEGF, sont développés afin de bloquer les voies de signalisation induites par ces récepteurs. La majorité de ces molécules se révèlent être des inhibiteurs à large spectre affectant généralement l'activité de VEGFR1/2/3, PDGFR, FGFR, c-kit ou encore flt-3. Parmi elles, on distingue le ZD6474/vandetanib, le PTK787/ZK222584, le SU6668 et le SU011248/sunitinib. Il existe également un inhibiteur plus spécifique des récepteurs au VEGF, le SU5416/semaxanib. Malheureusement, une grande partie de ces molécules se révèle être soit inefficace dans le cadre du cancer du sein, comme le vandetanib (Morabito *et al.*, 2009), soit faiblement efficace, comme le sunitinib (Polyzos,

Introduction

2008) ou le semaxanib (compte tenu des problèmes cardiaques survenus après association du semaxanib avec la doxorubicine)(Overmoyer *et al.*, 2007).

II.C.4.b Chimiothérapies métronomiques comme stratégie anti-angiogénique

Nous avons remarqué que les différents agents anti-angiogéniques sont généralement associés à différentes drogues employées en chimiothérapie. Ces drogues, telles que la cyclophosphamide, le paclitaxel, la doxorubicine et la vincristine, peuvent exercer des effets anticancéreux en interférant dans la formation et le maintien des vaisseaux intratumoraux, lorsqu'elles sont prescrites à doses dites métronomiques, ce traitement correspondant à l'administration de faibles concentrations de drogues mais administrées ponctuellement (Kerbel and Kamen, 2004). En plus de réduire la toxicité, les chimiothérapies à doses métronomiques entraînent, à terme, des dommages au niveau de l'endothélium des vaisseaux, conduisant à une réduction de la croissance tumorale (Bosco and Knudsen, 2007; Colleoni *et al.*, 2006; Colleoni *et al.*, 2002).

La chimiothérapie métronomique induit également une réduction importante du nombre de cellules endothéliales précurseurs et circulantes. Il fut tout d'abord démontré que ce type de thérapie est particulièrement efficace expérimentalement chez les souris immunodéficientes injectées avec des cellules de cancer du sein résistantes à de multiples drogues et cela grâce à une activité anti-angiogénique des drogues (Browder *et al.*, 2000; Klement *et al.*, 2002; Man *et al.*, 2002). L'effet anti-angiogénique de drogues, telles que le paclitaxel, la vinblastine ou la cyclophosphamide, fut d'ailleurs démontré *in vitro* et *in vivo* dans le modèle d'injection sous-cutanée de matrigel contenant un facteur angiogénique chez la souris immunodéficiente ou encore dans le modèle de membrane chorionique allantoïdienne de poulet (Belotti *et al.*, 1996; Bocci *et al.*, 2002; Grant *et al.*, 2003; Vacca *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003). Enfin, il a été démontré qu'en plus des effets anti-angiogéniques et anti-tumoraux consécutifs au traitement à faibles doses métronomiques chez les souris immunodéficientes injectées avec des cellules de cancer du sein, il survient également une diminution des taux de précurseurs endothéliaux viables circulant dans le sang (Shaked *et al.*, 2005a; Shaked *et al.*, 2005b; Shaked *et al.*, 2005c). Cette modalité de traitement permet également d'inhiber le recrutement massif de cellules endothéliales précurseurs consécutif à la destruction des vaisseaux intratumoraux par un agent de disruption vasculaire (Daenen *et al.*, 2009).

III. LES NEUROTROPHINES ET LEURS RECEPTEURS

Les neurotrophines représentent une famille de protéines connues en premier lieu pour leurs effets dans le système nerveux, notamment dans la croissance des axones, la plasticité synaptique, la myélinisation, la nociception ainsi que la différenciation et la survie des neurones. Ces différents effets vont être médiés par les récepteurs Trk ainsi que le récepteur p75^{NTR} (Chao, 2003; Huang and Reichardt, 2003; Lu *et al.*, 2005). Au fil des années, de nombreux travaux ont montré que les neurotrophines sont également impliquées dans de nombreux cancers, dont le cancer du sein (Descamps *et al.*, 1998; Descamps *et al.*, 2001a), ainsi que dans l'angiogenèse (Calza *et al.*, 2001; Cantarella *et al.*, 2002).

III.A. Les neurotrophines

III.A.1 Découverte

Le NGF, qui est la neurotrophine la plus intensément étudiée, fut découverte pour la première fois par l'équipe de Rita Levi-Montalcini dans les années 50. Il fut caractérisé comme étant une molécule stimulant la croissance, la différenciation et la survie des neurones pendant le développement ou à la suite d'un dommage (Cohen *et al.*, 1954; Levi-Montalcini and Hamburger, 1951). Ainsi, le NGF devint le premier facteur de croissance décrit et isolé en 1954 par Cohen (Cohen *et al.*, 1954) ce qui lui vaudra, avec Rita Levi-Montalcini, le prix Nobel de médecine en 1986. Dans les années 80, Barde identifia et purifia, à partir de tissu de cerveau, une nouvelle neurotrophine qu'il nomma BDNF (Barde *et al.*, 1982). Tout comme le NGF, le BDNF stimule la survie ainsi que la croissance des neurites des neurones sensitifs (Hofer and Barde, 1988). Grâce à une analyse des homologues entre les structures primaires du NGF et du BDNF, le troisième membre de la famille des neurotrophines, la NT-3, fut identifié en 1990 par Jones et Reichardt (Jones and Reichardt, 1990). Enfin, la NT-4/5 fut identifiée par Ip en 1992 (Ip *et al.*, 1992).

III.A.2 Expression et structure

Issus de la duplication d'un même gène ancestral, les gènes des neurotrophines sont très conservés (Hallbook *et al.*, 1991). Les neurotrophines présentent des poids moléculaires et des points isoélectriques (pI de 9-10) similaires pour une conservation de structure primaire de l'ordre de 50% (Tableau 5).

Neurotrophine	Localisation Chromosomique	Taille de l'ARN (pb)	N° d'accèsion NCBI	Poids moléculaire (KDa)	N° d'accèsion 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

Tableau 5. 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'accèsion dans les banques NCBI et swissprot.

Il existe plusieurs formes au NGF, la forme α , la forme β et la forme γ . Le α -NGF est décrit comme n'ayant aucune activité. Le β -NGF est quant à lui responsable de l'activité biologique de la neurotrophine (c'est la forme présentée dans la Tableau 5). Enfin, le γ -NGF est une sérine protéase de 26 KDa très spécifique, qui peut intervenir dans la maturation du NGF (Sofroniew *et al.*, 2001).

La synthèse des neurotrophines se fait par un processus de maturation, où un seul exon codant est traduit en un précurseur protéique 30-35 kDa nommé prépro-neurotrophine. Cette protéine est composée d'un prépro-domaine, d'un pro-domaine et d'un domaine mature qui sont clivés successivement afin d'obtenir une neurotrophine mature de 12-13 kDa. Ainsi, le pré-domaine (comportant le peptide signal) est clivé dans le réticulum endoplasmique et le pro-domaine est glycosylé/glycosulfaté pour donner une pro-neurotrophine (Seidah *et al.*, 1996a). Ce sont ces modifications qui permettent le contrôle du trafic de la pro-neurotrophine dans le réticulum endoplasmique. Le pro-domaine est alors clivé en un site d'acide aminé dibasique par des protéases intracellulaires telles que la furine ou des proconvertases (Bresnahan *et al.*, 1990; Seidah *et al.*, 1996a; Seidah *et al.*, 1996b). Les neurotrophines matures sont alors sécrétées par les cellules.

Introduction

L'équipe de Lee (Lee *et al.*, 2001) a décrit pour la première fois que les pro-neurotrophines, telles que le pro-BDNF (Mowla *et al.*, 2001), pouvaient également être sécrétées par les cellules et pouvaient être maturées dans le milieu extracellulaire par des protéases extracellulaires comme la plasmine et certaines métalloprotéases telles que les MMP-3 et -7 (Lee *et al.*, 2001; Mowla *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2004).

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 disulfures. L'hétérodimérisation des neurotrophines fut montrée possible *in vitro* (Arakawa *et al.*, 1994; Jungbluth *et al.*, 1994) mais les hétérodimères se révèlent être reversés vers leurs homodimères respectifs. De plus, le rôle biologique des hétérodimères de neurotrophines *in vivo* demeure incertain.

III.B. Les récepteurs aux neurotrophines

La recherche des récepteurs aux neurotrophines a conduit à la découverte de 2 grandes classes de récepteurs : les tropomyosin-related kinase ou Trk et le neurotrophin receptor p75 ou p75^{NTR} (Johnson *et al.*, 1986; Kaplan *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1991). Dans le système nerveux, l'activation des récepteurs Trk est associée à une activation des voies de survie alors que l'activation de p75^{NTR} est associée, sauf exception, à une induction de l'apoptose des cellules neuronales.

III.B.1 Les Tropomyosin Kinase Receptors

III.B.1.a Découverte

Le premier récepteur Trk fut découvert en 1986 (Martin-Zanca *et al.*, 1986) lors du clonage d'un oncogène impliqué dans un cancer du côlon, celui-ci contenant les 7 premiers des 8 exons de la tropomyosine fusionnés avec les domaines transmembranaires et cytoplasmiques d'une tyrosine kinase, d'où le nom de tropomyosin-related kinase. Le NGF fut ensuite identifié comme étant le ligand de ce premier Trk nommé TrkA (Johnson *et al.*, 1986; Kaplan *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1991). Feront suite les découvertes de TrkB, liant le BDNF et la NT-4/5, et de TrkC, récepteur de la NT-3. En 1994, il est démontré que la NT-3 peut se lier à TrkA et TrkB mais avec une affinité réduite (Clary and Reichardt, 1994; Strohmaier *et al.*, 1996)(Figure 20).

Introduction



Figure 20. Spécificité de liaison des neurotrophines à leurs récepteurs tyrosine-kinases.

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).

III.B.1.b Expression des récepteurs Trk

A l'image des neurotrophines, les gènes des récepteurs Trk présentent de fortes homologies de séquences et de structures, suggérant que les gènes des Trk ont été formés lors d'événements similaires à ceux des neurotrophines. La Tableau 6 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'accèsion NCBI	Poids moléculaire (KDa)	N° d'accèsion 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

Tableau 6. Caractéristiques géniques des récepteurs Trk.

Récepteurs tyrosine-kinases TrkA, TrkB, TrkC et leur localisation chromosomique, leur taille de transcrit, leur poids moléculaire protéique et leurs numéros d'accèsion dans les banques NCBI et swissprot.

Par des jeux d'épissages alternatifs, chacun des 3 récepteurs tyrosine-kinases se présente sous des isoformes de fonctions biologiques diverses. Ces épissages peuvent affecter les interactions entre les récepteurs Trk et leurs ligands respectifs par insertion de petites séquences d'acides aminés au niveau de la région juxtamembranaire du domaine extracellulaire de TrkA, TrkB et TrkC (Meakin *et al.*, 1992; Shelton *et al.*, 1995). Par exemple, l'insertion d'une séquence de 6 acides aminés codée par un petit exon va entraîner la liaison de la neurotrophine non spécifique NT3 aux récepteurs TrkA (Clary and Reichardt, 1994) et TrkB (Strohmaier *et al.*, 1996).

Les épissages alternatifs conduisent à des variations dans la séquence en acides aminés du domaine intracellulaire des récepteurs Trk, modulant les voies de signalisation activées

Introduction

après fixation du ligand sur le récepteur Trk. A titre d'exemple, il existe des isoformes de TrkB et de TrkC dépourvus de domaine à activité tyrosine-kinase. Ces récepteurs tronqués ont généralement le rôle de dominant négatif (Eide *et al.*, 1996). Enfin, l'épissage de certains exons peut aussi conduire à une activation des récepteurs Trk en absence de ligand. C'est le cas par exemple d'une isoforme oncogénique de TrkA (TrkA-III) qui peut induire une signalisation indépendante du ligand NGF et promouvoir un comportement tumorigène des cellules de neuroblastome (Tacconelli *et al.*, 2004).

III.B.1.c Structure des récepteurs Trk

Les récepteurs Trk appartiennent à la classe des protéines transmembranaires de type 1 (un seul domaine transmembranaire avec l'extrémité N-term extracellulaire et l'extrémité C-term intracellulaire), pour une séquence longue d'environ 800 acides aminés hautement glycosylés (Figure 21). La structure des récepteurs se révèle être hautement conservée, avec 80% d'homologie de séquence au niveau du domaine à activité tyrosine-kinase. Par contre, le domaine extracellulaire ne présente que 30% d'homologie de séquence, permettant ainsi une reconnaissance spécifique du ligand.

Le domaine extracellulaire des récepteurs Trk, long d'environ 400 acides aminés, contient 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 de type IgG (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 des récepteurs et préviennent leur activation spontanée en absence de ligand (Watson *et al.*, 1999). Le domaine intracellulaire est composé d'une large région tyrosine-kinase comportant plusieurs sites tyrosines phosphorylables tels que, sur le récepteur TrkA, les tyrosines Y490, Y670, Y674/675, Y751 et Y785 qui sont essentielles à l'initiation des cascades de signalisation (Huang and Reichardt, 2003) et la tyrosine Y695 qui est impliquée dans le trafic et l'activation du récepteur (de Pablo *et al.*, 2008).

Introduction

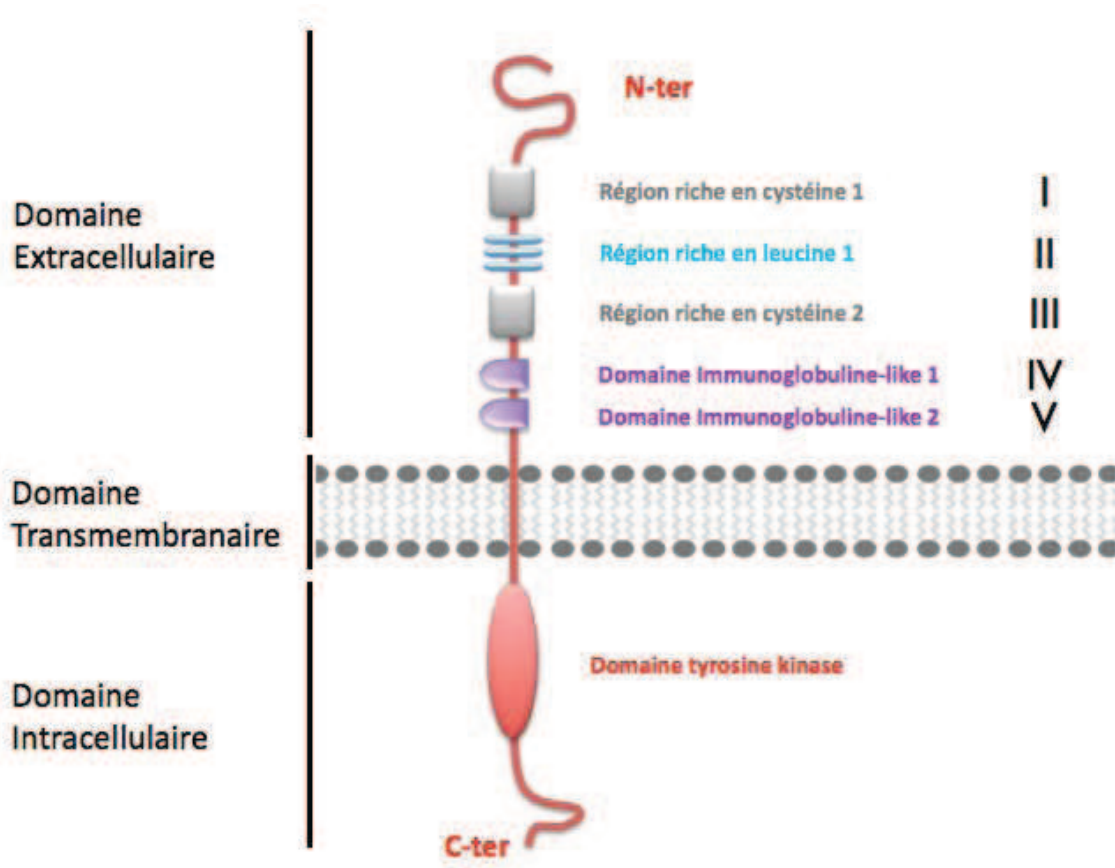


Figure 21. Structure des récepteurs Trk.

Les récepteurs Trk sont composés 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. Adapté de (Reichardt, 2006).

Des expériences de délétion ont montré que le domaine V (IgG-like 2) des récepteurs Trk est responsable de la liaison spécifique du dimère de neurotrophine avec son récepteur spécifique (Perez *et al.*, 1995; Ultsch *et al.*, 1999; Urfer *et al.*, 1995). La neurotrophine se lie au récepteur Trk par l'intermédiaire de deux régions. Le « conserved patch », ainsi nommé en raison de sa conservation entre les neurotrophines, correspond à la zone entre la partie C-terminale des domaines 5 des Trk et la partie centrale des neurotrophines. Le « specificity patch », positionné en N-terminal est, à l'opposé, spécifique à chaque neurotrophine et constitue probablement l'élément déterminant de la spécificité de la neurotrophine et de son récepteur (Wiesmann *et al.*, 1999).

Enfin, les différentes régions du domaine extracellulaire des récepteurs 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,

Introduction

prouvant leur implication dans l'inhibition des dimérisations en absence de ligand (Arevalo *et al.*, 2000).

III.B.2 Le récepteur p75^{NTR}

III.B.2.a Découverte

C'est en 1973 que, pour la première fois, fut identifié p75^{NTR} comme étant le récepteur du NGF. p75^{NTR} fut appelé, à cette époque, NGF Receptor (Herrup and Shooter, 1973). Son clonage en 1986, et des expériences de transfection, ont révélé que le récepteur p75 liait le NGF avec de faibles affinités. Il fut alors nommé low affinity NGF receptor ou récepteur de faible affinité du NGF (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 se liaient à p75 avec la même affinité (10^{-9} M) et cela dans tous les types cellulaires. Le récepteur prit alors le nom de p75 Neurotrophin Receptor ou p75^{NTR} (Rodriguez-Tebar *et al.*, 1990; Squinto *et al.*, 1991)

III.B.2.b Expression du récepteur p75^{NTR}

Le gène *p75ntr* humain du récepteur p75^{NTR} se situe en 17q12-q22 et couvre une région d'environ 23 kb comptant 6 exons. Ce gène code pour un ARNm de 3,8 kb (Johnson *et al.*, 1986). La séquence du promoteur de *p75ntr* 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, 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 ou les facteurs activateurs d'expression NeuroD ou bHLH (Chiaramello *et al.*, 1995). Enfin d'autres régions du promoteur de *p75ntr* ont été démontrées comme étant impliquées dans la régulation par l'acide rétinoïque, la vitamine D3 et la testostérone ; cependant les éléments impliqués dans la régulation de l'expression de p75^{NTR} *in vivo* restent inconnus (Metsis *et al.*, 1992; Naveilhan *et al.*, 1996).

Il peut y avoir épissage alternatif de l'exon 3 du gène de p75^{NTR}, générant une isoforme dépourvue des régions riches en cystéines 2, 3 et 4 du domaine extracellulaire (Figure 22). p75^{NTR} ne peut alors plus fixer les neurotrophines (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.

Introduction

III.B.2.c Structure du récepteur p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} humain est une protéine glycosylée de 399 acides aminés, composée d'un domaine extracellulaire de 222 acides aminés, d'un domaine transmembranaire de 22 acides aminés et d'un domaine intracellulaire de 155 acides aminés (Figure 24). Il est obtenu après clivage du peptide signal de 28 acides aminés et différentes modifications post-traductionnelles.

- **Domaines transmembranaire et extracellulaire**

p75^{NTR} appartient à la superfamille des récepteurs au TNF. Cette famille est caractérisée par la présence de domaines riches en cystéine (Cystein Rich Domain, CRD) consistant en une répétition de 6 cystéines chargées négativement, situées dans le domaine extracellulaire (Baldwin *et al.*, 1992; Yan and Chao, 1991). 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 glycosylation, notamment dans le domaine juxtamembranaire, faisant passer la masse moléculaire du récepteur de 45 à 75 kDa. Enfin, le domaine transmembranaire du récepteur p75^{NTR} est constitué d'une hélice transmembranaire unique à la séquence en acides aminés hautement conservée (Chao and Hempstead, 1995).

- **Domaine intracellulaire**

Le domaine intracellulaire de p75^{NTR} est très conservé entre les espèces. Il est unique, ne possède pas d'activité catalytique et dispose d'un site de palmitoylation à la cystéine 279 ainsi que des sites de phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine (Grob *et al.*, 1985; Roux and Barker, 2002). La fonction de ces modifications post-traductionnelles n'est pas totalement élucidée mais elles pourraient participer dans les interactions protéine-protéine, à la maturation et à 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).

Introduction

Comme tous les membres de la famille des récepteurs au TNF, p75^{NTR} contient dans son domaine cytoplasmique un domaine de mort ou DD. Ce domaine 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). 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 acides aminés localisé dans la partie intracellulaire juxtamembranaire. Ce domaine fut baptisé Chopper, en référence à un célèbre criminel australien, puisqu'il fut démontré comme étant nécessaire et suffisant à l'initiation de la mort cellulaire. Chopper 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, présent à l'extrémité C-terminale intracellulaire du récepteur p75^{NTR} et conservé chez les différentes espèces, est un site consensus de liaison à des domaines PDZ. Les protéines contenant des domaines PDZ tels que FAP-1, sont des protéines adaptatrices permettant la formation de complexes protéiques de signalisation intracellulaire (Sheng and Sala, 2001).

Notons que p75^{NTR} est également le récepteur des pro-neurotrophines. Bien que la liaison entre la pro-neurotrophine et p75^{NTR} se fasse avec une plus grande affinité, l'interaction entre ces deux protéines s'effectue par l'intermédiaire des acides aminés du domaine « mature » de la pro-neurotrophine, présent également chez les neurotrophines matures.

La spécificité des pro-neurotrophines pour p75^{NTR} est liée au fait que la liaison des neurotrophines avec leurs récepteurs Trk respectifs 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, empêchant l'interaction entre les récepteurs Trk et les pro-neurotrophines. Ne faisant pas intervenir cette extrémité, la liaison à p75^{NTR} reste donc possible. Cela suggère, par conséquent, que les pro-neurotrophines activent préférentiellement le récepteur p75^{NTR}, alors que les neurotrophines matures activent leurs

Introduction

récepteurs Trk respectifs (Chao, 2003). Cependant, des travaux plus récents remettent en cause ce dogme de la sélectivité stricte des pro-neurotrophines pour le récepteur $p75^{\text{NTR}}$, en montrant la fixation possible du pro-NGF et du pro-BDNF, respectivement aux récepteurs TrkA et TrkB, avec certes une affinité moindre par rapport au NGF et au BDNF mature, permettant l'activation de voies de signalisation et la différenciation des PC12 avec, là aussi, une efficacité moindre (Fahnestock *et al.*, 2004; Fayard *et al.*, 2005). Néanmoins, une nouvelle étude dans des cellules PC12 montre que la forte affinité des pro-neurotrophines pour $p75^{\text{NTR}}$ ne permet pas leur fixation dans des conditions physiologiques.

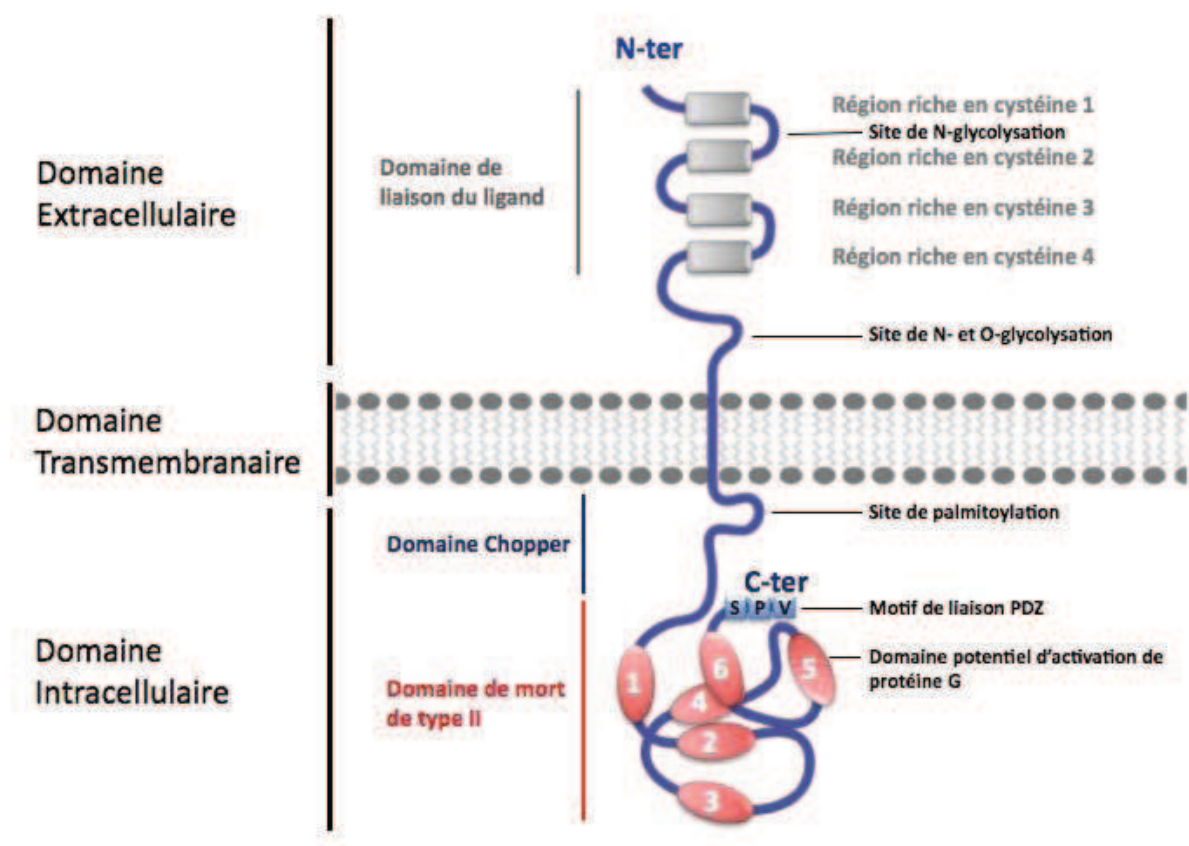


Figure 22. Structure du récepteur $p75^{\text{NTR}}$.

Le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ est constitué d'un domaine extracellulaire comprenant 4 régions riches en cystéine et plusieurs sites de glycosylation, d'un domaine transmembranaire unique et d'un domaine intracellulaire comprenant un domaine Chopper juxtamembranaire et un domaine de mort caractéristique des récepteurs de mort, ainsi qu'un domaine potentiel d'activation de protéine G et un domaine SPV en C-terminal. Adapté de (Roux and Barker, 2002).

Enfin, le récepteur entier $p75^{\text{NTR}}$ peut être clivé par des protéases extracellulaires, comme l'ADAM10 ou l'ADAM17, libérant un fragment extracellulaire composé des 4 régions riches en cystéines. Ce fragment, nommé $p75^{\text{NTR}}$ -ECD, est soluble et se révèle être toujours capable

Introduction

de lier les neurotrophines. L'autre partie du récepteur, comportant les domaines transmembranaire et intracellulaire est appelée p75^{NTR}-CTF. Ce premier clivage est un pré-requis à un second, réalisé sur le CTF par un complexe γ secrétase intracellulaire, le presenilin dépendent γ secrétase. Il génère un fragment intracellulaire actif, le p75^{NTR}-ICD. Cet ICD peut se lier à différents adaptateurs, comme la protéine TRAF6, afin de participer à la signalisation cellulaire (Chao, 2003; Roux and Barker, 2002).

III.B.3 Signalisation des récepteurs TrkA et p75^{NTR}

III.B.3.a Signalisation des récepteurs 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 les récepteurs tyrosine-kinases Trk, et en particulier TrkA, que nous prendrons comme exemple, sont la voie MAPK/p38 MAPK, la voie PI3K/Akt et la PLC γ dans les cellules neuronales (Huang and Reichardt, 2003).

La voie des MAPK/p38 MAPK (Figure 23) :

Lorsque le récepteur TrkA est activé, l'autophosphorylation en Y490 conduit au recrutement de Shc/Grb2/SOS), permettant l'activation de la petite protéine G Ras (Nimnual *et al.*, 1998). L'activation de Ras conduit à l'activation de c-Raf/MEK/ERK, sachant que cette activation se révèle être transitoire (Marshall, 1995). De plus, une boucle de rétrocontrôle négatif entraîne la phosphorylation de SOS, via MEK, et par conséquent la désolidarisation du complexe Grb2/SOS (Kao *et al.*, 2001). Il peut également y avoir une activation prolongée de la voie MAPK dépendant d'une autre cascade d'adaptateurs. Ainsi, le recrutement de FRS2 en Y490 phosphorylé entraîne la fixation en cascade de la protéine adaptatrice Crk, de la guanine nucléotide exchange factor C3G, de l'ARMS, de la petite GTPase Rap 1 et de la SHP-2 et conduit à l'activation de B-Raf et donc à une activation prolongée de la voie MAPK (Kao *et al.*, 2001).

L'activation de la voie MAPK conduit au recrutement de divers facteurs de transcription tels que CREB, MEF2 et Elk1 (Lonze and Ginty, 2002; Pearson *et al.*, 2001). L'activation de la voie MAPK peut également aboutir à l'activation de p38 MAPK. De plus, le recrutement de Src conduit également, après différentes cascades de phosphorylation impliquant notamment

Introduction

MEKK1-4/MKK4, à l'activation de p38 MAPK (Yung *et al.*, 2008). L'activation de la voie MAPK/p38 MAPK va permettre la stimulation de la différenciation neuronale et la prolifération cellulaire.

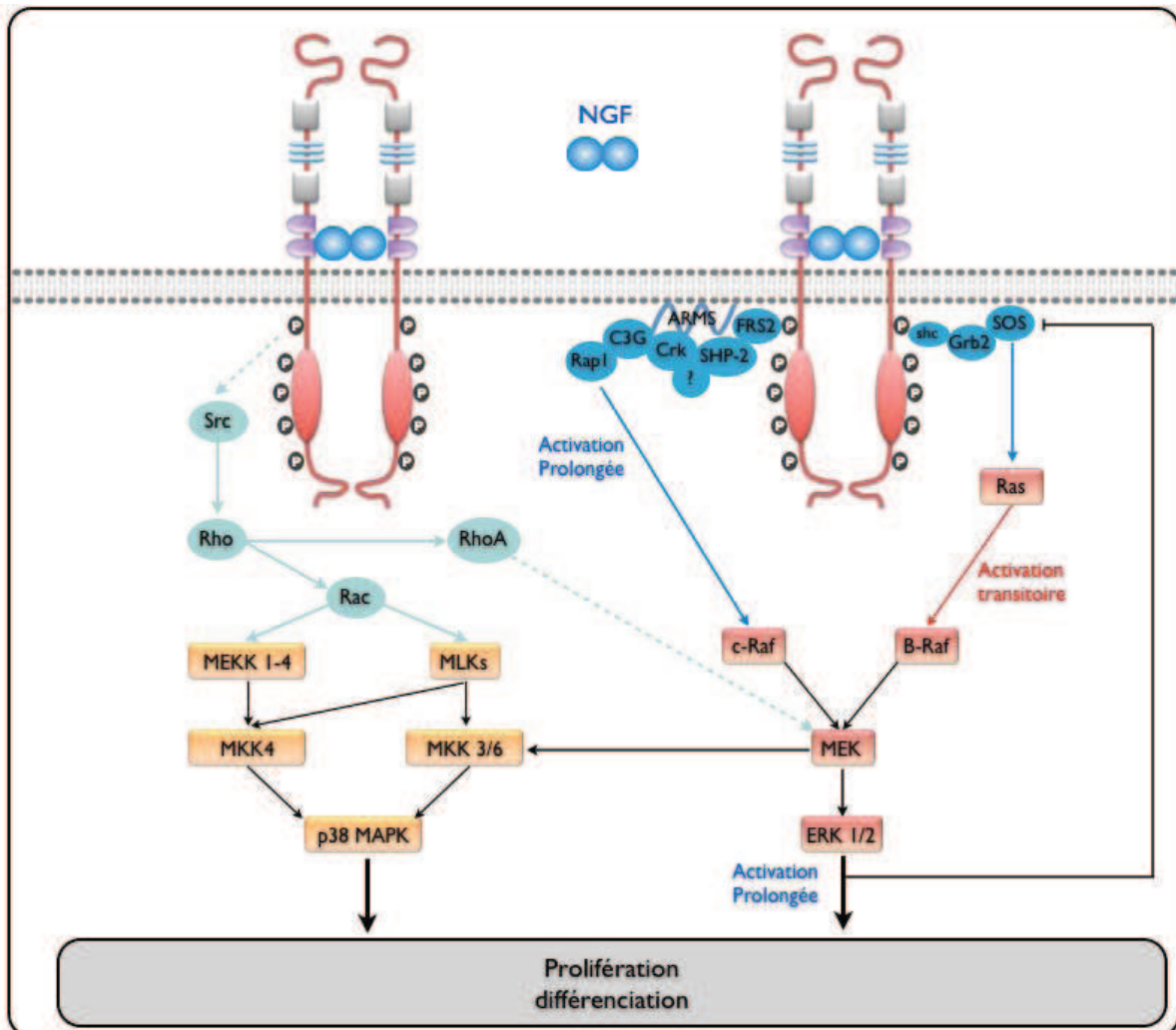


Figure 23. Activation de la voie MAPK/p38 MAPK suite à l'activation de TrkA.

Adapté de (Caporali and Emanuelli, 2009; Chao, 2003; Reichardt, 2006; Wehrman et al., 2007).

La voie PI3 Kinase/AKT (Figure 24):

Cette voie est engagée par Ras ou *via* des protéines GAB recrutées par le complexe protéique shc-Grb2 lié à TrkA (Yamada *et al.*, 1999). La PI3K ainsi activée induit la formation de phosphatidyl inositol 3,4-biphosphate, qui active en collaboration avec des PDK, la protéine Akt. Celle-ci entraîne la transcription de gènes décrits pour leur implication dans la survie cellulaire par l'intermédiaire, notamment, de NF- κ B, mais peut également agir directement avec des protéines de la cascade apoptotique telles que Bad ou encore la caspase 9.

Introduction

La voie PLC γ / PKC (Figure 24):

La PLC γ se fixe à TrkA après autophosphorylation en Y785 (site qui est également retrouvé sur les autres récepteurs Trk). L'activation de PLC γ conduit à la production d'IP3 et de DAG à partir de phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate. L'IP3 induit une libération de calcium dans le cytoplasme de la cellule. Le DAG active des PKC en synergie avec le calcium libéré (Obermeier *et al.*, 1993). Ces voies conduisent à l'activation de la voie MAPK, de p38 MAPK et de 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.

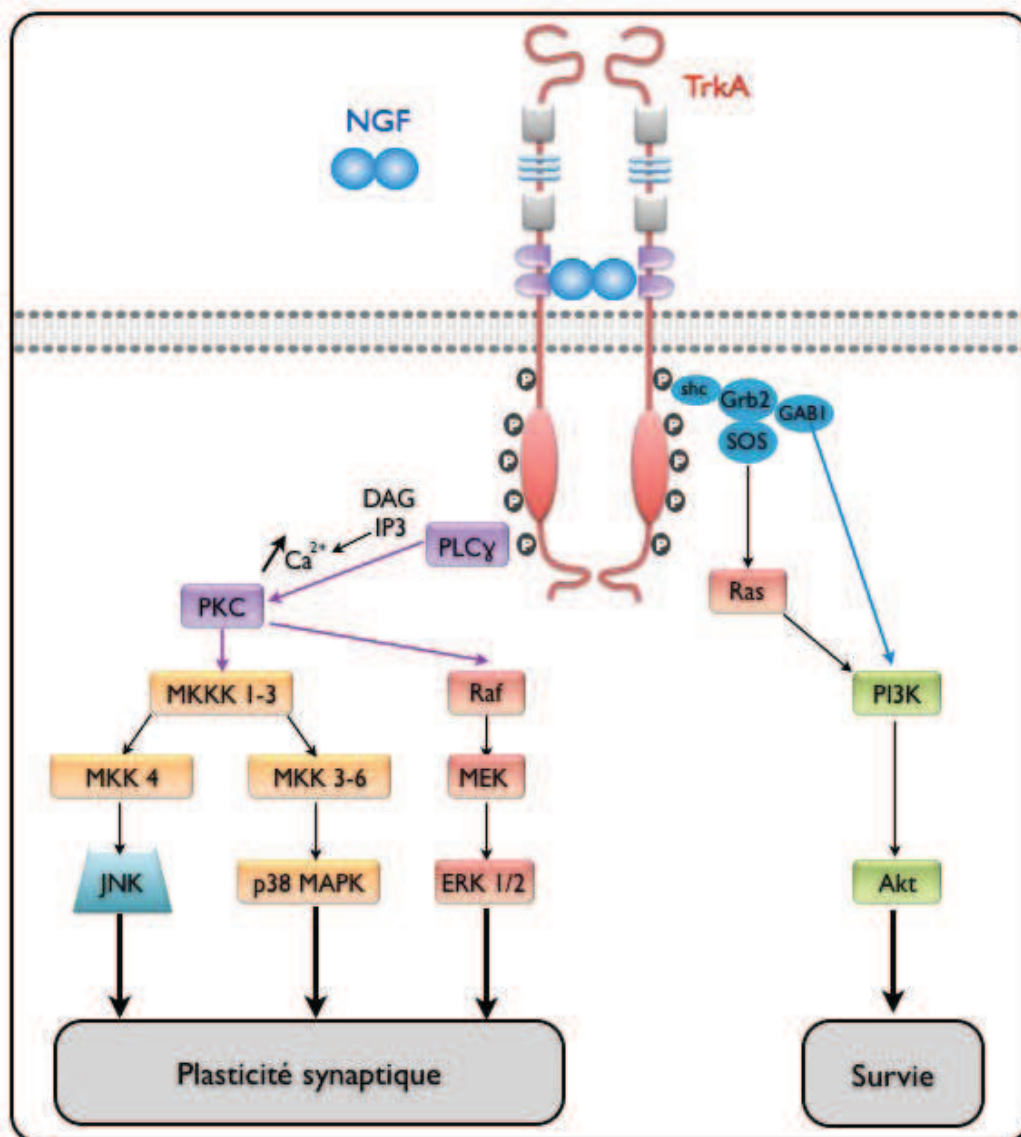


Figure 24. Activation des voies PI3K/Akt et PLC γ suite à l'activation de TrkA.

(Caporali and Emanuelli, 2009; Chao, 2003; Reichardt, 2006; Wehrman *et al.*, 2007)

III.B.3.b Signalisation du récepteur P75^{NTR}

- **Interactions Ligand-récepteurs**

Contrairement aux autres membres de la superfamille des récepteurs au TNF qui lient des ligands trimériques, p75^{NTR} fixe les neurotrophines en dimère suggérant un mécanisme de reconnaissance ligand-récepteur différent des autres membres de la superfamille. Un premier modèle proposé fut basé sur une interaction p75^{NTR}-NGF avec un rapport asymétrique 2:1, c'est-à-dire 2 molécules de NGF associées à une molécule p75^{NTR} (He and Garcia, 2004). Cependant, un modèle plus récent réalisé, lui, sur le domaine extracellulaire de p75^{NTR} humain et N-glycosylé montre le même mode de liaison du NGF à p75^{NTR} mais il met clairement en avant un ratio 2 : 2 du complexe p75^{NTR}-NGF dans les conditions expérimentales (Aurikko *et al.*, 2005). Les différences observées entre ces études suggèrent un rôle important de la glycosylation du récepteur p75^{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).

- **Signalisation induite 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. 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.

Les voies menant à la mort cellulaire par apoptose (Figure 25) :

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). La fixation de ces adaptateurs conduit à l'activation, via Rac, de la kinase JNK permettant l'initiation de nombreux acteurs de l'apoptose tels que c-jun, p53, Bad et Bim, ainsi qu'à la translocation mitochondriale de Bax, suivies de la libération de

Introduction

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

Parmi ceux ci, nous pouvons citer NRIF et Sc-1, tous deux des répresseurs transcriptionnels recrutés au domaine juxtamembranaire de p75^{NTR} activé puis transloqué dans le noyau (Geetha *et al.*, 2005; Kendall *et al.*, 2003). Ces deux adaptateurs peuvent bloquer le cycle cellulaire. De plus, la translocation de NRIF au noyau peut se faire en complexe avec TRAF6 et le p75-ICD libéré dans le cytosol suite au clivage de p75^{NTR} (Kenchappa *et al.*, 2006). NRAGE et NADE (uniquement en présence de NGF) sont également d'autres adaptateurs se fixant au niveau du domaine juxtamembranaire de p75^{NTR} (Park *et al.*, 2000; Salehi *et al.*, 2000). En plus d'activer JNK, NRAGE peut également induire une accumulation de cytochrome c, une activation de la voie des caspases ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire par activation de p53 (Salehi *et al.*, 2000; Wen *et al.*, 2004), tandis que NADE peut activer la voie des caspases en association avec des protéines 14-3-3 (Kimura *et al.*, 2001).

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, entraînant l'hydrolyse des sphingomyélines en phosphatidylcholines et en céramides (Dobrowsky *et al.*, 1994). Les céramides agissent comme second messager afin d'induire des effets apoptotiques ou trophiques en fonction de leur niveau intracellulaire (Blochl and Blochl, 2007).

Notons ici le cas particulier de l'adaptateur TRADD. 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 JNK pour activer les caspases (Roux and Barker, 2002; Wang *et al.*, 2001).

Introduction

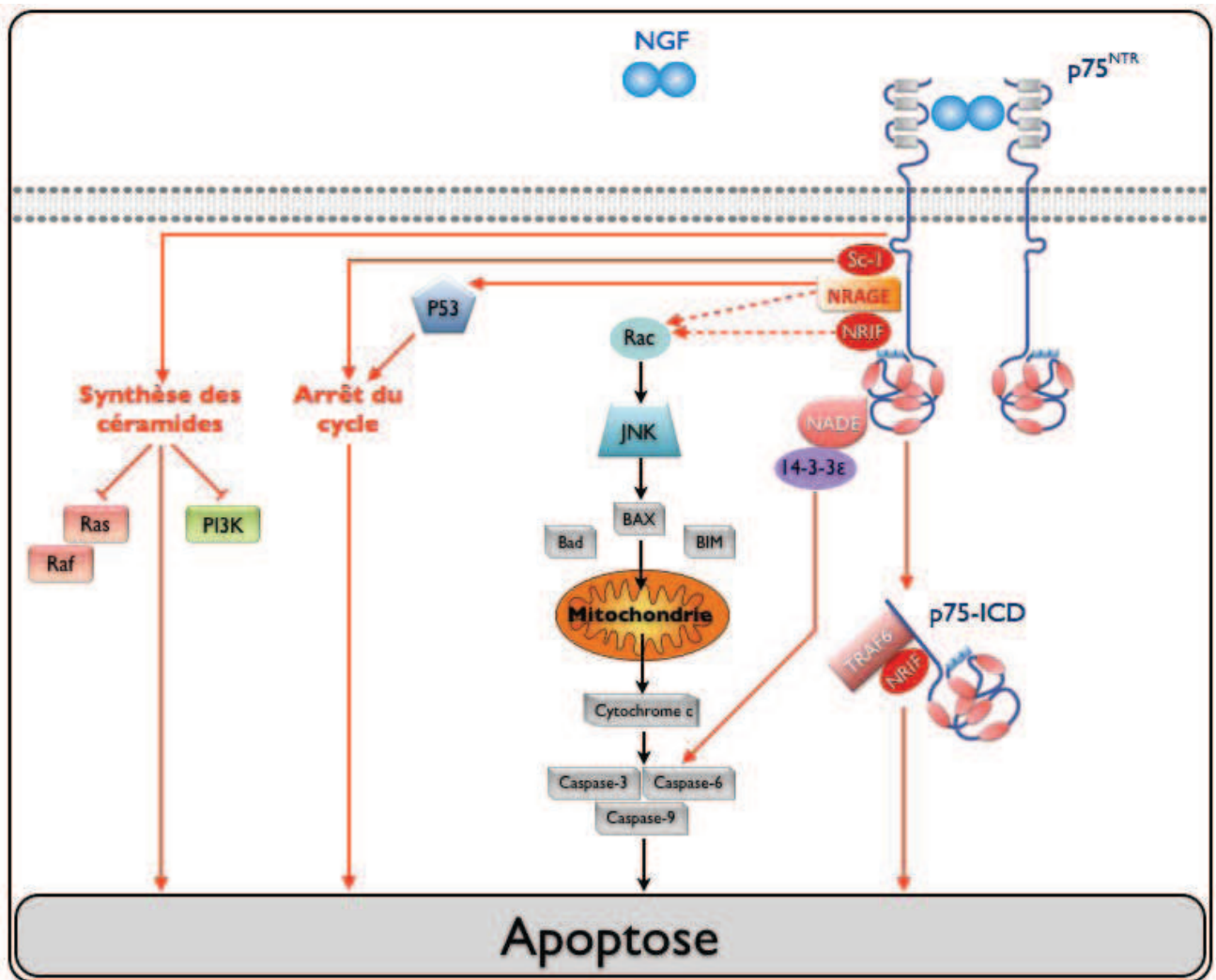


Figure 25. Les voies menant à l'apoptose suite à l'activation de p75^{NTR}

(Caporali and Emanuelli, 2009; Chao, 2003; Reichardt, 2006; Roux and Barker, 2002; Wehrman et al., 2007)

Les voies menant à la survie cellulaire (Figure 26) :

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-κB (Hamanoue et al., 1999). D'une part, NF-κB 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 Bcl-1/A1 ou Bcl-2. D'autre part, NF-κB 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).

Introduction

L'activation de NF- κ B par p75^{NTR} peut se faire *via* l'action de la PI3K 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 de p75^{NTR} activé (Khursigara *et al.*, 1999) 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 recrute alors son substrat, IKK- β qui va être activé par le complexe. Enfin, IKK- β phosphoryle I κ B, inhibiteur du facteur de transcription de NF- κ B qui est alors libéré, permettant l'expression de 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 NF- κ B comme TRAF6, TRAF4 bloque au contraire cette activation (Ye *et al.*, 1999).
- RIP-2 se fixe au domaine de mort de p75^{NTR} et active la voie de survie de NF- κ B (Khursigara *et al.*, 2001). De plus, RIP-2 est capable d'interagir avec les TRAF afin d'activer NF κ B (Yeiser *et al.*, 2004).
- FAP-1 est recruté par le domaine d'interaction PDZ de l'extrémité C-term de p75^{NTR} et augmenterait légèrement la survie *via* NF- κ B. L'implication de FAP-1 dans la survie induite par p75^{NTR} n'est pas totalement clarifiée, cependant, FAP-1 est décrit dans différents tissus comme une scaffolding protéine (Ghiran *et al.*, 2008) et pourrait ici aider à l'assemblage de complexes comprenant p75^{NTR}.

La voie de signalisation de la PI3K/Akt peut également être activée par p75^{NTR} même si celui-ci, contrairement au récepteur Trk, ne possède pas d'activité kinase intrinsèque. En effet, le récepteur p75^{NTR} recruterait des kinases ou bloquerait des mécanismes de déphosphorylation, conduisant à une phosphorylation accrue de p85 (une sous-unité régulatrice de la PI3K) et de shc (Roux *et al.*, 2001). Cette activation permettrait donc, *via* PKB, l'activation de NF- κ B. (Bui *et al.*, 2002). Notons que la PI3K peut également conduire à un signal de survie cellulaire de manière NF- κ B 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 PI3K/Akt, jouant un rôle majeur dans la voie de survie régulée par TrkA, appartient également à la signalisation de p75^{NTR}

Introduction

menant à la survie, et constitue donc un point de contact important entre la signalisation des deux récepteurs.

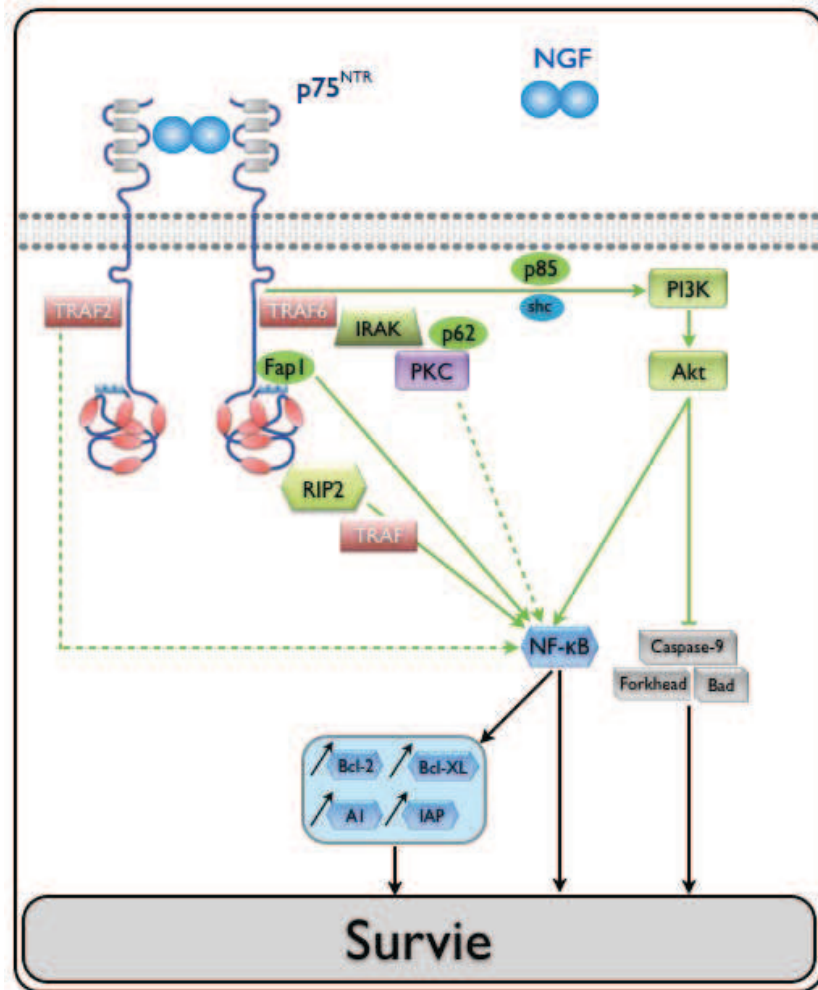


Figure 26. Les voies menant à la survie suite à l'activation de p75^{NTR}.

(Caporali and Emanuelli, 2009; Chao, 2003; Reichardt, 2006; Roux and Barker, 2002; Wehrman et al., 2007)

III.C. Rôle des neurotrophines et de leurs récepteurs dans le cancer

Les neurotrophines et leurs récepteurs sont connus pour être impliqués dans le développement et le maintien du système nerveux. Ils peuvent être impliqués dans des pathologies cérébrales, telles que la schizophrénie, les œdèmes cérébraux ou la maladie d'Alzheimer (Schor, 2005), mais également dans des pathologies non-cérébrales. En effet, les neurotrophines et leurs récepteurs, comme le NGF et ses récepteurs TrkA et p75^{NTR}, peuvent être exprimés dans des tissus non-neuronaux et sont retrouvés impliqués dans des maladies comme l'asthme mais aussi dans de nombreux cancers.

III.C.1 Effet Anti-tumoral

L'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs peut avoir des effets anti-tumoraux venant influencer négativement la progression du cancer en affectant la croissance, l'invasion ou la métastatisation. Par exemple, p75^{NTR} est identifié comme étant un suppresseur de tumeurs dans les cancers hépatiques, gastriques et prostatiques. Ainsi, la surexpression de p75^{NTR} dans les cancers hépatiques (Yuanlong *et al.*, 2008), gastriques (Jin *et al.*, 2007b) et l'expression normale de p75^{NTR} dans le cancer de la prostate (Krygier and Djakiew, 2001; Krygier and Djakiew, 2002) conduit essentiellement à une inhibition de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* par arrêt du cycle cellulaire en G0 et dans le cancer gastrique, en particulier, à une inhibition de l'invasion et de la formation de métastases (Jin *et al.*, 2007a). On peut noter que l'expression de p75^{NTR}, qui est exprimé par les cellules normales, diminue avec la progression du cancer de la prostate alors que TrkA, qui lui n'est pas exprimé dans les cellules normales, voit son expression augmenter, favorisant cette progression (Papatsoris *et al.*, 2007).

III.C.2 Effet Pro-tumoral

L'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs peut contribuer à la progression tumorale, les effets pro-tumoraux pouvant se traduire en termes de stimulation de la croissance, de la métastatisation voire même de l'angiogenèse comme nous le verrons plus tard. L'expression ou la surexpression de TrkA et/ou P75^{NTR} associé(s) au NGF peut promouvoir la progression du cancer du pancréas, de la thyroïde, de l'ovaire et du mélanome.

Ainsi, pour prendre l'exemple du cancer de l'ovaire, les cellules ovariennes normales expriment le NGF ainsi que ses récepteurs (Campos *et al.*, 2007) afin de participer au développement de l'ovaire, notamment en régulant la sécrétion d'œstrogènes et en stimulant l'expression du récepteur à l'hormone folliculante FSH (Dissen *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2002; Salas *et al.*, 2006). Or, des études ont montré que l'expression du récepteur à la FSH 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 pTrkA, lui, est corrélé à un mauvais pronostic.

Introduction

De plus, on observe dans les cellules endothéliales la présence de pTrkA suggérant un rôle de l'axe NGF/TrkA dans l'angiogenèse du cancer ovarien (Davidson *et al.*, 2003; Odegaard *et al.*, 2007).

Enfin, l'axe NGF/TrkA/p75^{NTR} a un rôle essentiel dans le 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). De plus, nous avons observé que les niveaux d'expression de TrkA et pTrkA dans les biopsies de tissus cancéreux sont supérieurs à ceux observés dans les tissus mammaires normaux (Lagadec *et al.*, 2009). D'autre part, la forme active de TrkA est 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.*, 2003; Dolle *et al.*, 2005b). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou d'anticorps bloquants, dans les cellules de cancer du sein MCF-7, a permis d'attribuer l'action mitogène du NGF à l'activation de TrkA et de la voie MAPK tandis que l'activité anti-apoptotique passerait par p75^{NTR} et l'induction de la voie NF- κ B (Descamps *et al.*, 2001b). De plus, l'inhibition du NGF (Anticorps neutralisant, siRNA) et de TrkA (K252a) induit une forte réduction de la croissance et de l'angiogenèse tumorale dans des modèles de xénogreffes (Adriaenssens *et al.*, 2008). Afin d'être plus proche des niveaux d'expression de TrkA retrouvés dans les biopsies, nous avons également étudié l'impact de la surexpression de TrkA dans les lignées de cellules cancéreuses de sein sur le développement tumoral. Ainsi la surexpression de TrkA conduit à une auto activation du récepteur en absence de son ligand. Cette surexpression promeut la croissance cellulaire, la migration et l'invasion *in vitro* due à l'activation des voies de signalisation MAPK, p38 MAPK et PI3K/Akt. Enfin, la surexpression de TrkA conduit à une augmentation de la croissance tumorale, de l'angiogenèse et de la métastatisation *in vivo* (Lagadec *et al.*, 2009).

III.D. Effet angiogénique des neurotrophines

En plus du rôle essentiel des neurotrophines dans le développement et le maintien du système nerveux ou dans le développement de nombreux cancers, dont le cancer du sein, les neurotrophines se révèlent être également des facteurs angiogéniques. Par exemple, le NGF fut la première neurotrophine identifiée comme étant potentiellement angiogénique dans le cadre d'expériences sur la régénération du nerf sciatique chez la souris (Santos *et al.*, 1991) ainsi que sur la néovascularisation cérébrale (Calza *et al.*, 2001).

III.D.1 Expression des neurotrophines et de leurs récepteurs par les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales telles que les HUVEC, expriment le NGF, le BDNF ainsi que leurs récepteurs TrkA, TrkB et P75^{NTR} (Cantarella *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Nakahashi *et al.*, 2000). On peut noter que l'expression du BDNF et de son récepteur TrkB peut être augmentée suite à l'activation de la voie HIF en condition d'hypoxie (Kim *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006a).

Les cellules mononucléaires CD34⁺ issues de sang provenant de personnes adultes et de cordon ombilical, pouvant se différencier en cellules endothéliales précurseurs/matures en présence des stimuli adéquats, expriment fortement le récepteur TrkA et faiblement le récepteur p75^{NTR} (Bracci-Laudiero *et al.*, 2003). De plus, les cellules de la moelle osseuse dont sont issues les cellules souches hématopoïétiques et les précurseurs expriment les différents récepteurs aux neurotrophines (Labouyrie *et al.*, 1999).

III.D.2 Effets angiogéniques des neurotrophines

III.D.2.a Le NGF

Le NGF a été décrit comme pouvant stimuler certaines étapes impliquées dans les processus d'angiogenèse. Ainsi, le NGF stimule la prolifération des HDMEC (Park *et al.*, 2007; Raychaudhuri *et al.*, 2001), des HUVEC (Cantarella *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2007), des cellules endothéliales de la choroïde (Steinle and Granger, 2003) ou des cellules endothéliales de cerveau de rat (Moser *et al.*, 2004). Cette stimulation dépend de l'activation du récepteur TrkA et de la voie de signalisation MAPK (Cantarella *et al.*, 2002) et PI3K/Akt (Steinle and Granger, 2003). Le NGF stimule également la migration et l'invasion des cellules

Introduction

endothéliales, parmi lesquelles nous pouvons compter les cellules endothéliales de la choroïde (Steinle and Granger, 2003), les cellules endothéliales de l'aorte de cochon (Rahbek *et al.*, 2005) et d'humain (Dolle *et al.*, 2005a) ainsi que les HUVEC et les HDMEC (Park *et al.*, 2007). En revanche, tous les auteurs ne sont pas en accord en ce qui concerne les voies de signalisation impliquées dans la migration et l'invasion induites par le NGF. L'activation de TrkA est nécessaire à la stimulation de ces deux processus, par contre certains montrent que les voies PI3K/Akt et MAPK sont nécessaires à cet effet stimulateur (Rahbek *et al.*, 2005) alors que d'autres montrent que seule la voie PI3K/Akt est essentielle (Park *et al.*, 2007; Steinle and Granger, 2003). Dans ce cas de figure, la voie PI3K/Akt permet la stimulation de l'expression de la MMP2 via le facteur de transcription AP-2, sachant que cette métalloprotéase est nécessaire et suffisante à la stimulation de l'invasion (Park *et al.*, 2007). Enfin, le NGF stimule également la tubulogenèse des cellules endothéliales HUVEC et HDMEC (Park *et al.*, 2007). Par contre, l'activation du récepteur p75^{NTR} par le NGF conduit à l'apoptose des cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2004). De plus, une surexpression de p75^{NTR} (soit par transfection, soit à la suite d'une ischémie due au diabète chez la souris) dans les cellules endothéliales conduit également à l'apoptose des cellules endothéliales et à l'inhibition de l'angiogenèse, cela pouvant être nécessaire dans la morphogenèse des capillaires (Caporali *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2008). En fait, l'effet pro-angiogénique du NGF *via* le récepteur trkA est prépondérant par rapport à l'effet anti-angiogénique *via* le récepteur p75^{NTR}, à cause des faibles niveaux d'expression de p75^{NTR} comparés à ceux de TrkA dans les cellules endothéliales, dans des conditions normales (Bracci-Laudiero *et al.*, 2003; Caporali *et al.*, 2008).

Le NGF stimule également l'angiogenèse *in vivo* dans différents modèles tels que dans la membrane chorionique allantoïdienne de poulet (Cantarella *et al.*, 2002), dans la cornée de rat (Seo *et al.*, 2001; Yoo *et al.*, 2004), dans les extrémités de membres ischémiés de souris (Emanuelli *et al.*, 2002; Salis *et al.*, 2004) et dans le modèle d'injection de matrigel en sous-cutané chez la souris (Park *et al.*, 2007). Ces modèles sont basés sur l'injection d'une matrice, telle que le matrigel, contenant un facteur de croissance chez l'animal afin de tester ses effets angiogéniques.

Enfin, le NGF exerce des effets angiogéniques directs sur les cellules endothéliales mais peut également stimuler l'angiogenèse de manière indirecte. Ainsi, le NGF peut stimuler l'expression du VEGF-A et parfois de son récepteur (VEGFR-2) via l'activation du récepteur

Introduction

TrkA, dans différents contextes tels que le membre ischémié de souris (Emanuelli *et al.*, 2002; Graiani *et al.*, 2004; Salis *et al.*, 2004), le système nerveux central (Calza *et al.*, 2001; Hansen-Algenstaedt *et al.*, 2006), dans le cancer de l'ovaire (Campos *et al.*, 2007) et la granulosa (Julio-Pieper *et al.*, 2009). Ainsi, dans le modèle de membrane chorionique allantoïdienne de poulet, la neutralisation du VEGF à l'aide d'un anticorps neutralisant entraîne une diminution de l'effet angiogénique du NGF, suggérant un effet indirect du NGF via l'axe VEGF/Récepteurs (Cantarella *et al.*, 2002). Cependant, des résultats contradictoires viennent remettre en cause l'idée d'un effet indirect du NGF, comme par exemple dans le modèle de membrane chorionique allantoïdienne ou sur la migration des cellules endothéliales, certes assez particulières comme les RAMEC. L'inhibition du récepteur VEGFR-2 à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique (SU-5416) n'affecte pas, dans ces expériences, l'angiogenèse induite par le VEGF (Dolle *et al.*, 2005a; Lazarovici *et al.*, 2006).

Nous constatons donc que le NGF est un stimulateur important du processus d'angiogenèse, même si certains de ses mécanismes d'action demeurent un sujet de controverse. D'autant plus que le NGF semble être impliqué dans la vascularisation tumorale, comme par exemple dans le cancer de l'ovaire (Campos *et al.*, 2007; Davidson *et al.*, 2003) ou le cancer du sein (Adriaenssens *et al.*, 2008; Lagadec *et al.*, 2009).

III.D.2.b Les autres neurotrophines

Le BDNF exerce aussi des effets angiogéniques en stimulant notamment la survie et la tubulogenèse *via* l'activation du récepteur TrkB et de la voie PI3K/Akt dans les cellules endothéliales de cerveau de rat (Kim *et al.*, 2004) et dans les cellules microvasculaires cardiaques de souris (Donovan *et al.*, 2000). Il a été également montré que le BDNF stimule la prolifération *via* la voie MAPK ainsi que la migration (et aussi la tubulogenèse) *via* les voies MAPK et PI3K/Akt/NO synthase dans les cellules endothéliales HUVEC (Wang *et al.*, 2006b; Wang *et al.*, 2008). Le BDNF peut de même stimuler l'angiogenèse *in vivo* dans le modèle d'injection de matrigel en sous-cutané, et dans le modèle d'injection d'un vecteur adénoviral permettant d'exprimer le BDNF au niveau de l'oreille ou de l'extrémité d'un membre ischémié de souris. De surcroît, le BDNF semble permettre la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques CD45⁺ Sca-1⁺, même si la contribution dans l'angiogenèse induite par le BDNF n'est pas démontrée (Kermani *et al.*, 2005).

Introduction

De manière similaire au NGF, le BDNF stimule l'expression du VEGF-A dans les cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2004). Cette stimulation, s'effectuant via l'activation de TrkB et de la voie de signalisation PI3K/Akt et via la présence de la sous-unité HIF-1 α , a également été observée chez les cellules de neuroblastome (Nakamura *et al.*, 2006). Inversement, il est décrit que le VEGF-A peut stimuler l'expression du BDNF chez les cellules endothéliales (Chen *et al.*, 2005b; Weston *et al.*, 2002), et cela grâce à la production de NO suite à l'activation par le VEGF de la voie NO Synthase (Chen *et al.*, 2005a). Enfin, Le BDNF joue un rôle important dans la vascularisation tumorale dans le cancer de l'ovaire ; son rôle est d'autant plus intéressant qu'il est dû en partie à une augmentation d'expression du VEGF induite par le BDNF dans les cellules cancéreuses (Au *et al.*, 2009).

Concernant les autres neurotrophines, il semble que le NT-4/5 peut induire l'angiogenèse. Cela fut illustré *in vivo* dans le modèle d'injection de matrigel en sous-cutané chez la souris (Kermani *et al.*, 2005).

Revue

**Rôle des cellules endothéliales progénitrices
dans l'angiogenèse du cancer du sein : de la
recherche fondamentale à l'application
clinique**

Cette revue a eu pour but de présenter les connaissances actuelles sur l'implication des cellules endothéliales précurseur dans l'angiogenèse du cancer du sein. Et également discuté les différentes attentes et espoirs envers les cellules endothéliales précurseurs comme biomarqueur et cible thérapeutique dans le cadre de tests cliniques.

Role of endothelial progenitor cells in breast cancer angiogenesis: from fundamental research to clinical ramifications

Xuefen Le Bourhis · Rodrigue Romon ·
Hubert Hondermarck

Received: 3 November 2009 / Accepted: 10 December 2009
© Springer Science+Business Media, LLC. 2009

Abstract Blood vessel formation (neovascularization) in tumors can occur through two mechanisms: angiogenesis and vasculogenesis. Angiogenesis results from proliferation and sprouting of existing blood vessels close to the tumor, while vasculogenesis is believed to arise from recruitment of circulating cells, largely derived from the bone marrow, and de novo clonal formation of blood vessels from these cells. Increasing evidence in animal models indicate that bone marrow-derived endothelial precursor cells (EPC) can contribute to tumor angiogenesis. This review aims to collate existing literature and provide an overview on the current knowledge of EPC involvement in breast cancer angiogenesis. We also discuss recent attempts to use EPC as biomarker and therapeutic target in clinical trials.

Keywords Endothelial precursor cells ·
Tumor angiogenesis · Breast cancer · Biomarker

Neovascularization in breast cancer

Breast cancer-induced angiogenesis is first observed at the preinvasive stage of high-grade ductal carcinoma in situ by the formation of microvessels around the ducts that are filled with proliferating epithelial cells [1]. As the tumor

progresses, so does the degree of neovascularization. The new vessels not only help to meet the growing metabolic demands of the tumor but also favor tumor dissemination and metastasis. Poor breast cancer prognosis has been shown to correlate with increased microvascular density or production of proangiogenic factors, some of which have been used as therapeutic targets [2]. However, tumor neovascularization can occur not only by angiogenesis (the sprouting of new vessels from existing vessels), but also by vasculogenesis, the embryonic process where blood vessels are formed de novo from bone marrow-derived endothelial precursor cells (EPC). In the later process, EPC is mobilized from the bone marrow, transported through the blood stream to the tumor site where they differentiate into mature endothelial cells to form vascular sprouts and cellular networks, before incorporation into a functional microvasculature (Fig. 1).

Discovery and characterization of EPC

Endothelial precursor cells were initially identified and isolated from the blood of healthy donors in 1997 by Asahara et al. [3]. These cells were found to coexpress both the vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) and CD34, and to differentiate to mature endothelial cells in culture. Soon after, by using a fluorescent in situ hybridization approach in human recipients of gender-mismatched bone marrow transplants, which allowed to distinguish EPC from the marrow of donor-derived cells and circulating endothelial cells from vessel walls of host-derived cells. Lin et al. [4] found that more than 90% of endothelial cells in the blood were of host origin. When cultured in vitro, donor-derived endothelial cells expanded about 1,000-fold, whereas host-genotype endothelial cells

X. Le Bourhis · R. Romon · H. Hondermarck
INSERM U908 “Growth factor signaling in breast cancer.
Functional proteomics”, University of Lille, IFR147,
Villeneuve d’Ascq, France

X. Le Bourhis (✉)
INSERM U908, Bâtiment SN3, University of Lille,
59655 Villeneuve d’Ascq, France
e-mail: xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr

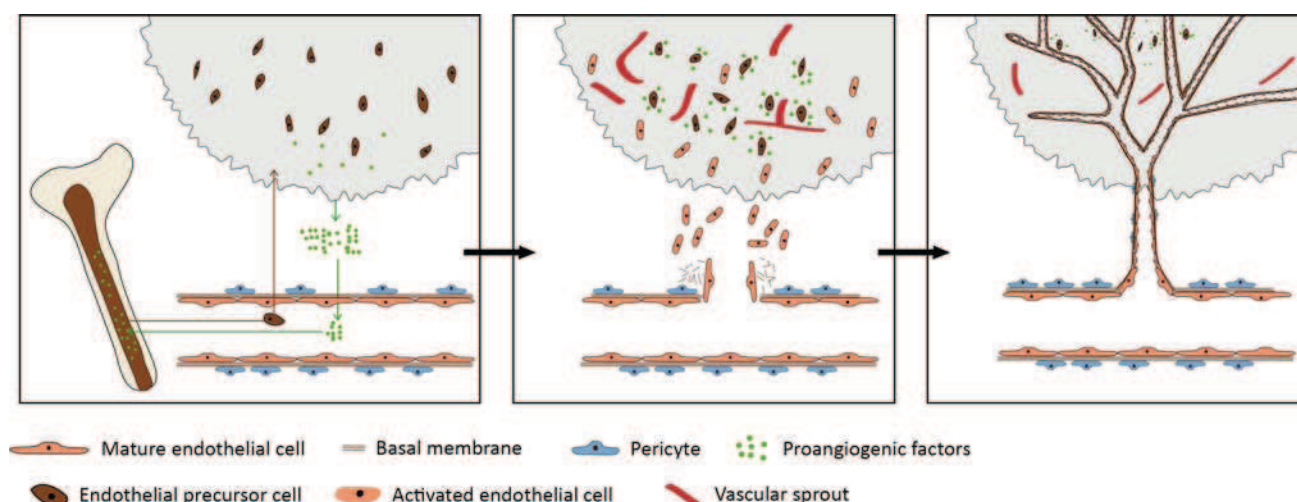


Fig. 1 Schematic representation of neovascularization in tumors. Under low oxygen tension or hypoxia condition, tumor cells secrete a number of proangiogenic factors which activate endothelial cells of existing vessels in neighboring areas to proliferate, migrate, leading to the formation of new vessels from existing vessels. Proangiogenic

factors can also initiate the mobilization of bone marrow-derived endothelial precursor cells to the tumor site, where they differentiate into mature endothelial cells to form vascular sprouts and cellular networks before incorporation into a functional microvasculature

expanded only about 20-fold, thus illustrating the high proliferative potential of EPC. Since then, many studies have been performed to determine the phenotypical and functional characteristics of EPC [5–8]. However, as EPC, endothelial cells and haematopoietic stem cells share many cell surface markers including CD45, CD34, CD133 (CD117 for mouse), CD146, CD31, CD105, CD144, vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and von Willebrand factor (vWF) [6, 9–15] (Table 1), the term EPC may therefore encompass ranging from relative primitive haemangioblasts to more differentiated endothelial cells. As CD133 is expressed in stem cells and/or progenitors of different tissues [16], it is currently accepted that early EPC (localized in the bone marrow or

immediately after migration into the circulation) are CD133+/CD34+/VEGFR2+/CD45– cells, whereas circulating EPC are CD133low/CD34+/VEGFR2+/CD45– and begin to express cell surface markers typical to mature endothelial cells, including CD31 and vWF. The majority of circulating EPC resides in the bone marrow in close association with hematopoietic stem cells and the bone marrow stroma that provides an optimal microenvironment. Clearly, putative precursors and the exact differentiation lineage of EPC remain to be determined. Further and more detailed molecular characterization of EPC could emerge from transcriptomic and proteomic analysis, as illustrated by recent publications [17, 18]. It is also to be noted that proteomics of breast tumors might equally reveal

Table 1 Marker profile of endothelial cell lineage, platelet, and lymphocyte

Markers	Hematopoietic stem cell	Endothelial precursor cell	Circulating endothelial cell	Mature endothelial cell	Endothelial cell microparticle	Platelet	Lymphocyte
DNA	+	+	+	+	–	–	+
CD45	+	–	–	–	–	–	+
CD34	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	–
CD133	+	+	–	–	–	–	–
CD117	+	+	–	–	–	–	–
CD146	–	+/-	+	+	+	–	+/-
CD31	+/-	+/-	+	+	+	+/-	–
CD105	+/-	+/-	+	+	–	–	–
CD144	+/-	+/-	+	+	+	–	–
VEGFR2	+/-	+	+	+	+	–	–
vWF	–	+/-	+	+	+	–	–

Adapted from Bertolini et al. [6]

important molecular trends related to angiogenesis and EPC intervention [19].

Contribution of EPC to mammary tumor vascularization in animal models

The contribution of EPC to tumor vascularization has been mainly evaluated by using tumors grown in chimeric mice which were previously lethally irradiated and reconstituted with LacZ⁺ or GFP⁺ tagged bone marrow-derived cells. The first proof-of-principle of bone marrow-derived EPC contribution to cancer-associated blood vessels was reported in 2001 by Lyden et al. [20], by using an angiogenesis-defective Id-mutant mice model. The Id proteins interact with other helix–loop–helix transcription factors, thereby modulating cellular differentiation in early fetal development [21]. Adult mice with reduced Id gene dosages cannot support neo-angiogenesis when challenged with tumor [22]. Bone marrow transplantation from wild-type mice, not from Id-mutant mice, restored the tumor growth and neovascularization in Id-mutant mice [20]. These findings were later confirmed by a clinical study of cancer patients, who developed cancers after bone marrow transplantation with donor cells derived from individuals of the opposite sex [23]. By using fluorescence in situ hybridization with sex chromosome-specific probes, the authors found that the percentage of bone marrow-derived endothelial cells in the tumor vasculatures ranged from 1% to 12% according to tumor types.

An excellent demonstration of EPC as a major determinant of nascent mammary tumor neovascularization was recently reported by Nolan et al. [24]. The authors used MMTV-PyMT transgenic mice, in which the PyMT oncogene was expressed under the transcriptional control of the mouse mammary tumor virus promoter/enhancer specifically in the mammary epithelium [25]. The PyMT transgene activates pathways similar to that induced by ErbB2 [26], and importantly, this murine tumor model recapitulates human breast cancer progression from early nonmalignant hyperplasia (6 weeks of age) and adenoma (8–9 weeks of age), to early and late malignant adenocarcinoma (8–12 weeks of age) [27]. They examined the contribution of bone marrow-derived EPC and luminally incorporated endothelial cells at various stages of these mammary tumors developing in animals previously transplanted with GFP⁺ bone marrow. They found that early adenomas contained foci of bone marrow-derived GFP⁺ cells including EPC and exhibited increased vessel density, with 5–10% of host vessels having incorporated bone marrow-derived GFP⁺ endothelial cells. These findings indicate that bone marrow-derived EPC contribute to neovascularization in early stages of breast tumor

progression. In the same study, the authors obtained similar results using other transplanted tumors including lung carcinoma, lymphoma, and melanoma, thus highlighting the general relevance of these cells in tumor neovascularization. The contribution of EPC in mammary tumor neovascularization has also been studied using other animal models [28–31] (Table 2). In general, the percentage of EPC incorporation in neovessels is relatively low (0.5–3.5%). However, Duda et al. [29] reported that as high as 58% of tumor vessels were bone marrow-derived endothelial cells-positive when TG-1 mammary carcinoma cells were injected superficially under the pial surface of mouse brain, while only 1.5% of tumor vessels were from bone marrow-derived endothelial cells when MCA8 breast cancer cells were injected subcutaneously or at mammary fat pad, suggesting that the extent of vasculogenesis may also depend on the specific tumor-stroma/microenvironment interaction.

In addition to the physical contribution of EPC to newly formed capillaries, the angiogenic cytokine release of EPC may improve neovascularization in a paracrine manner [32]. This idea is supported by a recent report by Gao et al. [33] who found that although only 12% of the new blood vessels showed incorporation of EPC, blocking EPC mobilization caused severe angiogenesis inhibition and significantly impaired lung tumor progression. Moreover, in the same study, gene expression analysis of EPC revealed up-regulation of a variety of key proangiogenic genes including vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor receptor 1, chemokine ligands and receptors. Similarly, Suriano et al. [31] reported that 17 β -estradiol mobilizes bone marrow-derived EPC to orthotopically implanted mammary tumors. The homing of EPC in tumor tissues was associated with enhanced expression of several proangiogenic factors which might contribute to stimulate vessel formation and support tumor growth.

Endothelial precursor cells are not only involved in primary tumor development, but also in metastase formation. This has been recently evidenced by Gao et al. [33]. The authors transplanted syngeneic GFP⁺ bone marrow into MMTV-PyMT transgenic mice, which develop spontaneous mammary carcinoma and lung metastase. They found that lung metastases initially formed micrometastases which were poorly vascularized, but as the metastatic tumors grew over time (16 weeks), vessels became increasingly abundant and up to 12% of the tumor vascular endothelium contained BM-GFP⁺CD31⁺ EPC. Similar results were obtained after implantation of Lewis lung carcinoma cells into syngeneic mice reconstituted with bone marrow-derived cells expressing green fluorescent protein (BM-GFP⁺). Importantly, the blockade of EPC mobilization by short hairpin RNA, directed against the Id1

Table 2 Contribution of EPC in neovessels of mammary primary tumors and metastases

Tumor model	Mice	Time point analysis after BMT	% of EPC incorporation in vessels	EC markers	References
MMTV-PyMT Spontaneous mammary carcinoma	MMTV-PyMT mice	10–12 weeks	1.3	LacZ, CD31	[28]
MCa8 breast cancer cells MMTV-PyMT Spontaneous mammary carcinoma	C57BL6 mice MMTV-PyMT mice	3 months 10 weeks	<1 5–10	GFP, CD31 CD31, GFP, CD144	[29] [24]
MT1A2 and TG1-1 mouse mammary carcinoma cells	FVB mice	>4 weeks	2.5–3.5	LacZ, CD31	[30]
TG1-1 mouse mammary carcinoma cells	Tg(TIE2GFP) 287SATO/J mice	–	0.5–3	GFP, CD133	[31]
MMTV-PyMT Spontaneous mammary carcinoma	MMTV-PyMT mice	12 weeks (lung metastases)	12	GFP, CD31	[33]

BMT Bone marrow transplantation, EC endothelial cells

gene, caused severe angiogenesis inhibition at the micro-metastatic stage and significantly impaired the formation of lethal macrometastases.

Molecular mechanism of EPC mobilization

Although the molecular pathways involved in EPC mobilization remain to be determined, several stimuli including VEGF, stroma cell derived factor-1 α (SDF-1 α), placental growth factor (PIGF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and estrogens were described to be involved in the mobilization of EPC from the bone marrow to tumor sites [31, 34–39]. VEGF can activate matrix metalloproteinase-9 which that cleaves the membrane-bound stem cell cytokine mKit Ligand in bone marrow stromal cells, to liberate soluble sKit Ligand, which then stimulates cKit-positive EPC to migrate from a quiescent bone marrow niche to a permissive microenvironment, activating EPC from a quiescent to a proliferative state [40]. Furthermore, VEGF has been found to upregulate SDF-1 (also known as CXCL12) and CXCR4 (the SDF-1 receptor) [41, 42]. SDF-1 α plays a key role in both the release and the homing process of EPC. SDF-1 α is present at high concentrations in the bone marrow, where it holds the stem cells within their niche. In response to different proangiogenic factors, such as VEGF, the level of SDF-1 α in bone marrow is decreased, leading to the egress of stem cells in the circulation. In contrast, the concentration of SDF-1 α within the tumor is increased in response to VEGF, and the progenitor cells are subsequently trapped in the tumor [36]. Other chemokines, including CCL2 and CCL5, were also reported to be produced by tumor cells to attract the progenitor cells from the circulation [43]. Suriano et al. [31] have reported that bone marrow-derived EPC initiate the neovascularization of TG1-1 mammary cells implanted in

the inguinal mammary gland of Tie-2 GFP transgenic mice. In this study, 17- β estradiol supplementation of ovariectomized mice significantly enhanced EPC-induced neovascularization, which was accompanied by enhanced expression of proangiogenic paracrine factors, such as VEGF, bFGF, angiopoetin-1, angiopoetin-2, thrombospondin-1, and matrix metalloproteinases-2 and -9. Similarly, adiponectin, an adipocyte-specific secretory protein, was reported to stimulate migration and differentiation of EPC [44, 45]. Adiponectin exerts also a biphasic effect on mammary tumor angiogenesis in MMTV-PyMT mouse model, with an increase of EPC mobilization in mice developing more aggressive tumors [46]. Thus, other growth factors and cytokines produced by tumor cells and/or surrounding normal cells could be also involved in EPC mobilization. For example, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was described to promote revascularization of ischemic and nonischemic mouse tissues by both local recruitment of endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors [47]. These findings, together with the recent demonstration of the involvement of nerve growth factor (NGF) and its tyrosine kinase receptor TrkA in breast tumor growth and angiogenesis [48, 49], suggest that neurotrophins-promoted angiogenesis could also involve the mobilization of hematopoietic progenitors such as EPC. Finally, systemic hormones and/or factors which are known to regulate angiogenesis in both physiological situations [50] could also contribute to EPC mobilization.

Clinical applications: EPC as biomarker and therapeutic target?

In light of the aforementioned results, showing the role of EPC in mammary tumor angiogenesis in animal models,

attempts have been made to determine their potential use in clinical oncology. Particularly, several investigations have been undertaken to establish whether variations exist in EPC according to breast cancer type, stage or response to therapy. Higher levels of circulating EPC were found in both preclinical breast cancer xenograft model in mice [51, 52] and in breast cancer patients [53, 54]. As shown in Table 3, 3 of 6 studies failed to show significant difference in EPC among varying stages of breast cancer [53, 55, 56]. In contrast, Richter-Ehrenstein et al. [57] found increased number of EPC in tumors of large size (over 2 cm). Naik et al. [58] showed increased number of EPC in stage 3 and 4 breast cancer patients, compared to stage 1 and 2 breast cancer patients. These conflicting results may be explained by the very limited number of patients analyzed, as well as different markers, used for enumerating EPC (Table 3). Accordingly, a recent report by Mancuso et al. [54], who used a more standardized method, with limited intrareader and interreader variability, showed more EPC in metastatic breast cancers than locally advanced ones. Interestingly, in patients with pediatric solid malignancies, including medulloblastoma, neuroblastoma, sarcoma, and lymphomas [59], the levels of circulating bone marrow-EPC were found to be significantly higher, compared to no metastatic diseases. Furthermore, higher circulating levels of EPC were also seen in patients with advanced unresectable hepatocellular carcinoma when compared to patients with resectable hepatocellular carcinoma [60]. Thus, the significantly higher levels of EPC paralleling clinical severity suggest the possible relevance of these cells in metastatic progression of tumors, and point out their potential use as biomarker and/or target in cancer therapy.

Surprisingly, Shaked et al. [38] found that treatment of tumor-bearing mice with vascular disrupting agents, which target the established but abnormal tumor vasculature, leads to an acute mobilization of EPC. These cells subsequently colonize the viable tumor rim that usually remains after such therapy, and drives “rebound revascularization” and tumor regrowth/recovery. Another study [61] showed

that chemotherapy drugs, such as taxanes administered at maximum tolerated doses, can also induce a rapid EPC mobilization. Prevention of the EPC spike by concurrent treatment with targeted antiangiogenic drugs enhanced the antitumor activity of chemotherapeutic drugs. These findings raise the possibility that therapeutic strategies aiming to reduce EPC mobilization might enhance the efficacy of certain cytotoxic anticancer therapies. Accordingly, addition of an antibody against CXCR4 to block EPC mobilization enhanced the antitumor effect of docetaxel in a murine breast cancer model [62]. In line with this, the efficacy of metronomic chemotherapy was thought to be mainly antiangiogenic [63, 64]. Metronomic chemotherapy is defined as regular administration of a chemotherapeutic drug at relatively low (nontoxic) doses, over prolonged periods, with no extended drug-free break periods [63]. Using different preclinical breast cancer models, several studies showed a strong relationship between decreased number of circulating EPC and efficiency of various metronomic chemotherapy regimens [65–68]. These studies demonstrated that EPC can be used successfully as a surrogate marker in mice for determining the optimal biological dose for various metronomic chemotherapies, thus avoiding empiricism (at least in mice), with respect to determining the optimal biological dose in metronomic chemotherapy regimens. However, clinical studies have yielded promising but still contradictory results, likely due to the choice of patients, therapeutic regime and enumeration technique of EPC. It has been reported that circulating EPC are increased in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy [69]. In contrast, Dellapasqua et al. [70] have not observed any correlation between the number of EPC and clinical outcome in patients with advanced breast cancer receiving metronomic chemotherapy with or without Bevacizumab. Several clinical studies are currently under investigation to determine whether EPC can be used as biomarker for patient selection and for defining the optimal biological dose in metronomic chemotherapies.

Table 3 Circulating EPC and breast cancer

Number of patients	Cancer stages	EPC definition	Result	References
46	–	CD45–/CD133+	Low EPC in healthy donors and breast cancer patients	[55]
19	1/2 vs. 3/4	CD34+/VEGFR2+/CD144+	No difference	[53]
47	1 to 4	CD34+/Flk1+	Increased EPC in tumors \geq 2 cm	[57]
25	1/2 vs. 3/4	CD133+/VEGFR2+	Increased EPC in stage 3/4 vs. stage 1/2	[58]
160	1 to 3/4	CD45–/CD133+/CD34+	No correlation with disease stage	[56]
56	Locally advanced and metastatic breast cancer	DNA+/syto16+/CD31+/CD133+	Increased EPC in metastatic breast cancer	[54]

Conclusion and perspectives

Most recent findings point out the relevance of EPC in tumor progression. Therefore, these cells might serve both as surrogate marker for cancer progression or response to therapy and as target for therapy. Further studies and consensus are required concerning the phenotype and enumeration of these cells, to better define their exact role in clinical oncology. Furthermore, many questions related to EPC biology and functional impact remain to be answered. For instance, what is the exact lineage of EPC in the context of the hematopoietic system in the adult? Can reliable culture and expansion methods be developed to address the origin and functional definition of EPC? To what extent do EPC contribute to neovessel formation and/or vessel maintenance? These issues will be the important subjects of future investigation to dissect out the critical players promoting tumor angiogenesis.

Acknowledgments The work performed in our laboratory is financed by the “Institut National de la Recherche Médicale (INSERM)”, the “Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2009)”, the “Ministère de la Recherche et de l’Education Nationale”.

References

- Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL (1997) Distinct angiogenic patterns are associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast. *J Pathol* 181:207–212
- Fayette J, Soria JC, Armand JP (2005) Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer* 41:1109–1116
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witztzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964–967
- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP (2000) Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105:71–77
- Ribatti D (2004) The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 8:294–300
- Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS (2006) The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer* 6:835–845
- Mancuso P, Colleoni M, Calleri A, Orlando L, Maisonneuve P, Pruneri G, Agliano A, Goldhirsch A, Shaked Y, Kerbel RS, Bertolini F (2006) Circulating endothelial-cell kinetics and viability predict survival in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy. *Blood* 108:452–459
- Bertolini F, Mancuso P, Braidotti P, Shaked Y, Kerbel RS (2009) The multiple personality disorder phenotype(s) of circulating endothelial cells in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1796:27–32
- Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP (1998) Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92:362–367
- Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Ote M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W (2000) In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95:3106–3112
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95:952–958
- Monestiroli S, Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Dell’Agnola C, Gobbi A, Martinelli G, Bertolini F (2001) Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma. *Cancer Res* 61:4341–4344
- Capillo M, Mancuso P, Gobbi A, Monestiroli S, Pruneri G, Dell’Agnola C, Martinelli G, Shultz L, Bertolini F (2003) Continuous infusion of endostatin inhibits differentiation, mobilization, and clonogenic potential of endothelial cell progenitors. *Clin Cancer Res* 9:377–382
- Woywodt A, Blann AD, Kirsch T, Erdbruegger U, Banzet N, Haubitz M, Dignat-George F (2006) Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol. *J Thromb Haemost* 4:671–677
- Widemann A, Sabatier F, Arnaud L, Bonello L, Al-Massarani G, Paganelli F, Poncelet P, Dignat-George F (2008) CD146-based immunomagnetic enrichment followed by multiparameter flow cytometry: a new approach to counting circulating endothelial cells. *J Thromb Haemost* 6:869–876
- Mizrak D, Brittan M, Alison MR (2008) CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 214:3–9
- Williamson AJ, Smith DL, Blinco D, Unwin RD, Pearson S, Wilson C, Miller C, Lancashire L, Lacaud G, Kouskoff V, Whetton AD (2008) Quantitative proteomics analysis demonstrates post-transcriptional regulation of embryonic stem cell differentiation to hematopoiesis. *Mol Cell Proteomics* 7:459–472
- Pula G, Mayr U, Evans C, Prokopi M, Vara DS, Yin X, Astrolakis Z, Xiao Q, Hill J, Xu Q, Mayr M (2009) Proteomics identifies thymidine phosphorylase as a key regulator of the angiogenic potential of colony-forming units and endothelial progenitor cell cultures. *Circ Res* 104:32–40
- Hondermarck H, Tastet C, El Yazidi-Belkoura I, Toillon RA, Le Bourhis X (2008) Proteomics of breast cancer: the quest for markers and therapeutic targets. *J Proteome Res* 7:1403–1411
- Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S (2001) Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7:1194–1201
- Norton JD, Deed RW, Craggs G, Sablitzky F (1998) Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol* 8:58–65
- Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O’Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R (1999) Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 401:670–677
- Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, Lengauer C (2005) Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 11:261–262
- Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S, Heikamp E, McDevitt MR, Scheinberg DA, Benezra R, Mittal V (2007) Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev* 21:1546–1558
- Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ (1992) Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol* 12:954–961

26. Desai KV, Xiao N, Wang W, Gangi L, Greene J, Powell JI, Dickson R, Furth P, Hunter K, Kucherlapati R, Simon R, Liu ET, Green JE (2002) Initiating oncogenic event determines gene-expression patterns of human breast cancer models. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6967–6972
27. Lin EY, Jones JG, Li P, Zhu L, Whitney KD, Muller WJ, Pollard JW (2003) Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am J Pathol* 163:2113–2126
28. Dwenger A, Rosenthal F, Machein M, Waller C, Spyridonidis A (2004) Transplanted bone marrow cells preferentially home to the vessels of in situ generated murine tumors rather than of normal organs. *Stem Cells* 22:86–92
29. Duda DG, Cohen KS, Kozin SV, Perentes JY, Fukumura D, Scadden DT, Jain RK (2006) Evidence for incorporation of bone marrow-derived endothelial cells into perfused blood vessels in tumors. *Blood* 107:2774–2776
30. Ahn GO, Brown JM (2008) Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer Cell* 13:193–205
31. Suriano R, Chaudhuri D, Johnson RS, Lambers E, Ashok BT, Kishore R, Tiwari RK (2008) 17Beta-estradiol mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells to tumors. *Cancer Res* 68:6038–6042
32. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S (2005) Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 39:733–742
33. Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V (2008) Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 319:195–198
34. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM (1999) VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18:3964–3972
35. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T (2002) G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 3:687–694
36. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E (2006) VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124:175–189
37. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP (2006) VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J* 20:1495–1497
38. Shaked Y, Ciarrocchi A, Franco M, Lee CR, Man S, Cheung AM, Hicklin DJ, Chaplin D, Foster FS, Benezra R, Kerbel RS (2006) Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science* 313:1785–1787
39. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegue E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z, Bergers G (2008) HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 13:206–220
40. Heissig B, Werb Z, Rafii S, Hattori K (2003) Role of c-kit/Kit ligand signaling in regulating vasculogenesis. *Thromb Haemost* 90:570–576
41. Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, Emilie D, Terrasa M, Lackner A, Curiel TJ, Carmeliet P, Zou W (2005) CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res* 65:465–472
42. Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C (2007) Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H1–H18
43. Spring H, Schuler T, Arnold B, Hammerling GJ, Ganss R (2005) Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18111–18116
44. Shibata R, Skurk C, Ouchi N, Galasso G, Kondo K, Ohashi T, Shimano M, Kihara S, Murohara T, Walsh K (2008) Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function. *FEBS Lett* 582:1607–1612
45. Nakamura N, Naruse K, Matsuki T, Hamada Y, Nakashima E, Kamiya H, Matsubara T, Enomoto A, Takahashi M, Oiso Y, Nakamura J (2009) Adiponectin promotes migration activities of endothelial progenitor cells via Cdc42/Rac1. *FEBS Lett* 583: 2457–2463
46. Landskroner-Eiger S, Qian B, Muise ES, Nawrocki AR, Berger JP, Fine EJ, Koba W, Deng Y, Pollard JW, Scherer PE (2009) Proangiogenic contribution of adiponectin toward mammary tumor growth in vivo. *Clin Cancer Res* 15:3265–3276
47. Kermani P, Rafii D, Jin DK, Whitlock P, Schaffer W, Chiang A, Vincent L, Friedrich M, Shido K, Hackett NR, Crystal RG, Rafii S, Hempstead BL (2005) Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest* 115:653–663
48. Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, Mougel A, Page A, Romon R, Nurcombe V, Le Bourhis X, Hondermarck H (2008) Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 68:346–351
49. Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, Foveau B, Vanhecke E, Romon R, Toillon RA, Oxombre B, Hondermarck H, Le Bourhis X (2009) TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* 28:1960–1970
50. Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martinez De La Escalera G (2009) Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 89:1177–1215
51. Shirakawa K, Furuhashi S, Watanabe I, Hayase H, Shimizu A, Ikarashi Y, Yoshida T, Terada M, Hashimoto D, Wakasugi H (2002) Induction of vasculogenesis in breast cancer models. *Br J Cancer* 87:1454–1461
52. Shaked Y, Bertolini F, Man S, Rogers MS, Cervi D, Foutz T, Rawn K, Voskas D, Dumont DJ, Ben-David Y, Lawler J, Henkin J, Huber J, Hicklin DJ, D'Amato RJ, Kerbel RS (2005) Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell* 7:101–111
53. Kim HK, Song KS, Kim HO, Chung JH, Lee KR, Lee YJ, Lee DH, Lee ES, Ryu KW, Bae JM (2003) Circulating numbers of endothelial progenitor cells in patients with gastric and breast cancer. *Cancer Lett* 198:83–88
54. Mancuso P, Antoniotti P, Quarna J, Calleri A, Rabascio C, Tacchetti C, Braidotti P, Wu HK, Zurita AJ, Saronni L, Cheng JB, Shalinsky DR, Heymach JV, Bertolini F (2009) Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. *Clin Cancer Res* 15:267–273
55. Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F (2001) Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 97:3658–3661
56. Goon PK, Lip GY, Stonelake PS, Blann AD (2009) Circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in breast cancer: relationship to endothelial damage/dysfunction/apoptosis, clinicopathologic factors, and the Nottingham Prognostic Index. *Neoplasia* 11:771–779

57. Richter-Ehrenstein C, Rentzsch J, Runkel S, Schneider A, Schonfelder G (2007) Endothelial progenitor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 106:343–349
58. Naik RP, Jin D, Chuang E, Gold EG, Tousimis EA, Moore AL, Christos PJ, de Dalmas T, Donovan D, Rafii S, Vahdat LT (2008) Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 107: 133–138
59. Taylor M, Rossler J, Georger B, Laplanche A, Hartmann O, Vassal G, Farace F (2009) High levels of circulating VEGFR2+ Bone marrow-derived progenitor cells correlate with metastatic disease in patients with pediatric solid malignancies. *Clin Cancer Res* 15:4561–4571
60. Ho JW, Pang RW, Lau C, Sun CK, Yu WC, Fan ST, Poon RT (2006) Significance of circulating endothelial progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 44:836–843
61. Shaked Y, Henke E, Roodhart JM, Mancuso P, Langenberg MH, Colleoni M, Daenen LG, Man S, Xu P, Emmenegger U, Tang T, Zhu Z, Witte L, Strieter RM, Bertolini F, Voest EE, Benezra R, Kerbel RS (2008) Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell* 14:263–273
62. Hassan S, Ferrario C, Saragovi U, Quenneville L, Gaboury L, Baccarelli A, Salvucci O, Basik M (2009) The influence of tumor-host interactions in the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 ligand/receptor axis in determining metastatic risk in breast cancer. *Am J Pathol* 175:66–73
63. Kerbel RS, Kamen BA (2004) The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 4:423–436
64. Emmenegger U, Man S, Shaked Y, Francia G, Wong JW, Hicklin DJ, Kerbel RS (2004) A comparative analysis of low-dose metronomic cyclophosphamide reveals absent or low-grade toxicity on tissues highly sensitive to the toxic effects of maximum tolerated dose regimens. *Cancer Res* 64:3994–4000
65. Shaked Y, Emmenegger U, Man S, Cervi D, Bertolini F, Ben-David Y, Kerbel RS (2005) Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity. *Blood* 106:3058–3061
66. Shaked Y, Emmenegger U, Francia G, Chen L, Lee CR, Man S, Paraghamian A, Ben-David Y, Kerbel RS (2005) Low-dose metronomic combined with intermittent bolus-dose cyclophosphamide is an effective long-term chemotherapy treatment strategy. *Cancer Res* 65:7045–7051
67. Munoz R, Man S, Shaked Y, Lee CR, Wong J, Francia G, Kerbel RS (2006) Highly efficacious nontoxic preclinical treatment for advanced metastatic breast cancer using combination oral UFT-cyclophosphamide metronomic chemotherapy. *Cancer Res* 66: 3386–3391
68. Ng SS, Sparreboom A, Shaked Y, Lee C, Man S, Desai N, Soon-Shiong P, Figg WD, Kerbel RS (2006) Influence of formulation vehicle on metronomic taxane chemotherapy: albumin-bound versus cremophor EL-based paclitaxel. *Clin Cancer Res* 12: 4331–4338
69. Furstenberger G, von Moos R, Lucas R, Thurlimann B, Senn HJ, Hamacher J, Boneberg EM (2006) Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *Br J Cancer* 94:524–531
70. Dellapasqua S, Bertolini F, Bagnardi V, Campagnoli E, Scarano E, Torrisi R, Shaked Y, Mancuso P, Goldhirsch A, Rocca A, Pietri E, Colleoni M (2008) Metronomic cyclophosphamide and capecitabine combined with bevacizumab in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 26:4899–4905

Chapitre 2

Objectif de la thèse

Objectif de la thèse

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). Subséquemment, l'effet mitogène du NGF sur les cellules cancéreuses mammaires fut attribué à l'activation du récepteur TrkA et de la voie MAPK, 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). En outre, 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). Le rôle du NGF dans la croissance des cellules de cancer du sein a été confirmé *in vivo*, dans des modèles de xénogreffes en souris immunodéficientes, où l'inhibition du NGF par des anticorps bloquants ou des siRNA diminue fortement la croissance tumorale, l'angiogenèse 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). Afin d'être plus poche des niveaux d'expression de TrkA observés dans les biopsies, nous avons montré que la surexpression de TrkA dans les cellules de cancer du sein conduit à une stimulation de la croissance cellulaire, de la migration et de l'invasion *via* l'activation des voies de signalisation MAPK, p38 MAPK et PI3K/Akt. De plus, la surexpression de TrkA conduit à une augmentation de la croissance tumorale, de l'angiogenèse et de la métastatisation dans les modèles de xénogreffes en souris immunodéficientes (Lagadec *et al.*, 2009).

Cela fait maintenant plusieurs décennies qu'a été clairement établi le rôle essentiel de la vascularisation tumorale dans le cancer du sein. Au vu des premières évidences quant à l'effet angiogénique du NGF, je me suis attaché, dans le cadre de ma thèse, à déterminer l'implication de ce facteur neurotrophique dans l'angiogenèse du cancer du sein et les mécanismes mis en jeu.

Dans le cadre de mes travaux, je me suis d'abord appliqué à démontrer que le NGF constitue un facteur essentiel dans l'angiogenèse induite par les cellules de cancer du sein. Les effets pléiotropiques du NGF sur l'angiogenèse, de même que les différentes voies de

Introduction

signalisation et les effecteurs impliqués dans l'invasion des cellules endothéliales sont par la suite décryptés. Enfin, j'ai démontré la stimulation par le NGF de l'expression et la sécrétion du facteur pro-angiogénique VEGF ainsi que sa contribution dans l'angiogenèse induite par le NGF. Les résultats obtenus au cours de ces recherches sont présentés sous forme d'une publication intitulée «Le NGF promeut l'angiogenèse du cancer du sein par de multiples mécanismes».

Je me suis intéressé, au cours de mon travail, au processus de vasculogenèse potentiellement induit par le NGF dans la formation des vaisseaux intratumoraux dans le cancer du sein. Des tentatives de mise au point des outils nécessaires pour cette étude ont été effectuées à cette occasion ; cependant, en raison des nombreuses difficultés rencontrées, elles n'ont pour le moment pas abouti à l'obtention de résultats exploitables.

Enfin, j'ai également entrepris, au cours de ma thèse, l'étude des effets du NT-4/5 sur l'angiogenèse ; effets qui ont jusqu'alors été peu décrits dans la bibliographie à l'inverse de ceux du BDNF qui ont déjà fait l'objet de plusieurs publications. Je me suis aussi attaché à identifier, entre autres, les voies de signalisation nécessaires à la stimulation de l'invasion induite par le NT-4/5.

Chapitre 3

Résultats

Article

Le NGF promeut l'angiogenèse du cancer du sein en activant de multiples voies de signalisation

Ces travaux ont eu pour but de déterminer quelle était l'implication du NGF dans l'angiogenèse du cancer du sein et quels étaient les mécanismes mis en jeu. Nous avons montré que le NGF est un puissant facteur angiogénique ayant un rôle essentiel dans la vascularisation tumorale dans des modèles expérimentaux chez la souris SCID. De plus, le NGF exerce des effets pléiotropiques sur les cellules endothéliales *in vitro*. Ce facteur stimule, avec une intensité similaire au VEGF, la croissance, la migration, l'invasion, la tubulogenèse et la perméabilité des cellules endothéliales. Par ailleurs, l'effet stimulateur du NGF sur l'invasion des cellules endothéliales dépend de l'activation de son récepteur à activité tyrosine kinase TrkA et des voies de signalisation en aval telles que les voies PI3K/Akt et NO synthase. Enfin, nous avons montré que l'effet angiogénique du NGF est dévolu en partie à une activité du VEGF, puisque la neutralisation du VEGF à l'aide d'un anticorps conduit à une diminution de l'angiogenèse induite par le NGF. Ceci peut s'expliquer par le fait que le NGF augmente la sécrétion du VEGF par les cellules endothéliales et les cellules de cancer du sein. En conclusion, notre travail montre que le NGF est un puissant facteur angiogénique dont les effets stimulateurs passent par de multiples mécanismes.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'un article qui sera soumis prochainement.

Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways

Rodrigue Romon, Eric Adriaenssens, Chann Lagadec, Emmanuelle Germain, Hubert Hondermarck and Xuefen Le Bourhis

Authors' Affiliations: INSERM U908 "Growth factor signaling in breast cancer. Functional proteomics", University of Lille, Villeneuve d'Ascq, France.

Requests for reprints: Xuefen Le Bourhis, INSERM U908, Bâtiment SN3, University of 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

Running title: Angiogenic effect of NGF in breast cancer

Keywords: angiogenesis, breast cancer, NGF, VEGF, signaling.

Abstract

Purpose: The objective of the present study is to determine the involvement of nerve growth factor (NGF) in breast cancer angiogenesis and the underlying molecular mechanisms.

Experimental Design: The angiogenic effect of NGF was determined by measuring endothelial cell behavior *in vitro* and blood vessel formation *in vivo* using Matrigel plug assay. Signaling pathways involved in NGF-mediated angiogenic effect were determined using pharmacological inhibitors and Western blot analysis. Involvement of vascular endothelial growth factor (VEGF) in NGF-mediated angiogenic effect was evaluated using a neutralizing anti VEGF antibody. VEGF was quantified by ELISA assay.

Results: Both recombinant NGF and NGF produced by breast cancer cells stimulated angiogenesis in Matrigel plugs in immunodeficient mice. NGF strongly increased invasion, cord formation and the monolayer permeability of endothelial cells. Moreover, NGF-stimulated invasion was under the control of its tyrosine kinase receptor (TrkA) and the downstream signaling pathways such as PI3K and ERK, leading to the activation of matrix metalloprotease 2 and nitric oxide synthase. Interestingly, NGF increased the secretion of VEGF in both endothelial and breast cancer cells. Inhibition of VEGF, with a neutralizing antibody, reduced about half of NGF-induced endothelial cell invasion and angiogenesis *in vivo*.

Conclusion: NGF exerts pleiotropic effects on endothelial cells. NGF could stimulate breast cancer angiogenesis in concert with VEGF in an autocrine/paracrine manner.

Translational Relevance

Although some antiangiogenic therapies have been approved in the treatment of cancer, the survival benefits of such therapies are relatively modest. Understanding the mechanism governing angiogenesis and finding new drugs are therefore essential for therapeutic improvements. We provided direct evidence that NGF could be an important stimulator for breast cancer angiogenesis. Moreover, NGF-promoted angiogenesis is partially mediated by VEGF. These data, together with our previous findings of NGF overexpression in breast cancer, suggest that NGF could favour breast cancer angiogenesis in concert with VEGF in an autocrine/paracrine manner. Furthermore, we identified new signaling pathways, such as NO synthase and ERK, in NGF-induced invasion of endothelial cells. Thus, NGF, as well as the activated signaling pathways, should represent new targets of anti-angiogenic therapy against breast cancer.

Introduction

It is well established that tumor growth beyond the size of 1–2 mm is dependent upon angiogenesis (1). This process is regulated by numerous proangiogenic factors which are secreted by tumor or surrounding stromal cells. Among these proangiogenic factors, vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a pivotal role in tumor angiogenesis. VEGF promotes angiogenesis *via* its ability to stimulate permeability, growth, migration and invasion of endothelial cells (2), and to mobilize endothelial precursor cells from bone marrow (2, 3). Inhibition of VEGF reduces angiogenesis and tumor growth *in vivo* (4). Conversely, VEGF overexpression is associated with increased microvessel density, tumor metastasis, and poor prognosis (5-7). Among several VEGF isoforms, VEGF-A is the most predominant angiogenic factor, as its level is strongly associated with tumor progression and poor clinical outcome in many types of cancers including breast cancer (8-10).

NGF has been studied most extensively for its role in regulating growth, development, survival and regeneration of the nervous system. NGF exerts its effects through two membrane receptors: the tyrosine kinase receptor TrkA and the neurotrophin receptor p75^{NTR}, a common receptor for all neurotrophins and pro-neurotrophins. NGF binding to TrkA induces TrkA receptor dimerisation and autophosphorylation of cytoplasmic tyrosines, leading to the activation of various signaling pathways, including the Ras/MAPK pathway, the PLC γ pathway, and the PI3K/Akt pathway (11, 12). NGF has also been reported to promote angiogenesis and/or induces the expression of proangiogenic molecules in several tissues, such as muscle and cornea (13-15). On the other hand, NGF has been increasingly described to regulate tumor growth and progression of non-neuronal cancers including medullar thyroid carcinoma (16), lung (17), pancreatic (18), prostatic (19) and breast carcinomas (20-22). In breast cancers, we have previously shown that NGF and its tyrosine kinase receptor TrkA are overexpressed compared to normal breast tissues (23, 24). Inhibition of NGF with neutralizing antibodies or small interfering RNA strongly reduces angiogenesis and tumor development in immunodeficient mice (23). Conversely, TrkA overexpression in breast cancer cells leads to a constitutive activation of its tyrosine kinase,

resulting in increased tumorigenicity as well as enhanced angiogenesis (24). Similar link between NGF and angiogenesis has also been suggested in ovarian carcinomas (25).

The objective of the present study is to better determine the involvement of NGF in breast cancer angiogenesis, as well as the underlying molecular mechanisms. We show that NGF secreted by breast cancer cells can stimulate tumor angiogenesis *in vivo*. NGF increases growth, migration, invasion, tubular formation and permeability of endothelial cells. We also demonstrate the involvement of multiple pathways such as PI3K-Akt, ERK, MMP2, and NO synthase as well as VEGF in the angiogenic effect of NGF.

Materials and Methods

Reagents

Human recombinant NGF and VEGF, neutralizing antibodies against NGF, VEGF and the corresponding isotype control antibodies were purchased from R&D Systems. Growth factor-reduced Matrigel was from BD Biosciences. The antibody used for immunohistochemistry against CD31 was purchased from Novus Biologicals and the corresponding biotinylated anti-rat secondary antibody was from BD Pharmingen.

Cell Culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) from Lonza were maintained at 37°C with humidified 95% air / 5% CO₂ in endothelial growth medium (EGM) containing 2% fetal bovine serum (FBS) and other compounds of the EGM singlequots provided with the medium (Lonza). For different experiments, HUVEC were cultured in starved medium composed of endothelial basal medium (EBM) containing 0.5% FBS and GA-1000 (provided in the EGM singlequots). MDA-MB-231 human breast cancer cells from American Type Culture Collection were maintained in Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with 20 mM HEPES, 2 g/l sodium bicarbonate, 2 mM L-glutamine, 1% of non-essential amino acids, 10% fetal calf serum (FCS), 40 units/ml penicillin-streptomycin, 40 µg/ml gentamycin.

***In vivo* Angiogenesis**

Six-week-old female severe combined immunodeficient (SCID) mice were from Institut Pasteur de Lille, France. Mice were maintained in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee procedures and guidelines. Angiogenesis was analyzed by Matrigel plug assay, as described below.

Matrigel plug assay. To determine the influence of endogenously produced NGF in breast cancer angiogenesis, cold Matrigel was mixed with MDA-MB-231 breast cancer cells in the presence of 40 µg/ml isotype control, or 80 µg/ml anti NGF neutralizing antibodies. To determine the influence of recombinant NGF in angiogenesis, cold Matrigel was mixed with PBS (as control), 7.5 µg/ml NGF, 3.5 µg/ml proNGF, or 375 ng/ml VEGF. In some

experiments, cold Matrigel was also mixed with 7.5 µg/ml NGF and 40 µg/ml isotype control or 10 µg/ml anti VEGF neutralizing antibodies. A total of 500 µl of the mixed Matrigel was subcutaneously injected into SCID mice in the middle lateral dorsal region. Seven days later, the animals were sacrificed and the Matrigel plugs were harvested. Pictures of Matrigel plug were taken with a Sony DSC-W5 numerical camera.

Hemoglobin quantification. The Matrigel plugs were homogenized in 500 µl water on ice and cleared by centrifugation at 200 g for 6 min at 4°C. The supernatant was collected and used in triplicate to measure hemoglobin content with Drabkin's reagent (Sigma-Aldrich) according to manufacturer instruction. The absorbance was measured at 540 nm in an ELISA plate reader.

Microvascular density analysis. Matrigel plugs were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin and sections cut at 3 – 4 µm intervals. Detection of the specific marker of endothelial cell CD31 by immunohistochemistry was performed with the Renaissance TSA Biotin System kit (PerkinElmer). The reaction was developed with DAB substrate (Sigma-Aldrich) and sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma-Aldrich). The microvessel density was quantified in 10 vascular hot-spot fields by determining the area covered by CD31-positive staining, by image analysis, as previously described (26).

Endothelial cell behaviour assays in culture

Endothelial cell growth Assay. HUVEC (10^5 cells/well) were seeded in six well plates in 2 ml EBM/0.5% FBS and cultured for 24 h. Cells were then treated with 100 ng/ml NGF or 10 ng/ml VEGF for 48 h. They were harvested by trypsinization and counted using a hemocytometer (Coulter Z2, Beckman-Coulter).

Endothelial cell migration and invasion. BD Falcon inserts with a polyethylene terephthalate (PET) membrane/8 µm pores (BD Biosciences) were used for migration and invasion assays. The inserts were pre-coated with diluted Matrigel (1:100 for migration and 1:10 for invasion). HUVEC ($5 \cdot 10^4$ cells/insert) were seeded into the inserts in EBM/0.5% FBS. Six hours (for migration) or 24 h (for invasion) later, the inserts were 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 in 10 random fields at 200x magnification under Nikon Eclipse Ti-U fluorescent microscope.

Endothelial cell cord formation assay. Matrigel (250 μ l) was added into wells of 24-well plates, and polymerized for 30 min at 37°C. HUVEC were then seeded on the surface of polymerized Matrigel ($5 \cdot 10^4$ cells/well) and cultured in the presence of NGF (100 ng/ml) or VEGF (10 ng/ml) for 18 h. Tubular networks in each well were photographed using Nikon Eclipse Ti-U inverted microscope before measurement of tubular lengths using NIS element Basic Research (Nikon).

Endothelial cell monolayer permeability assay. HUVEC ($2 \cdot 10^5$ cells/well) were seeded on BD Falcon inserts with a PET membrane/0.4 μ m pores (BD Biosciences) in EGM. When cells reached confluence, they were treated with NGF (100 ng/ml) or VEGF (10 ng/ml) in EBM/0.5% FBS for 6 h. The medium was then replaced with EBM/0.5% FBS containing FITC-labeled dextran (70 kDa, 250 μ g/ml, Sigma-aldrich). To determine the fluorescence intensity of FITC-Labeled dextran that passed through the insert, 100 μ l medium was collected from each well every 15 min during 1 h, and the fluorescence was measured using a fluorescence multi-well plate reader FLx800 (Bio-Tek Instrument) at 483 nm as excitation, and 517 nm as emission, wavelengths.

Pharmacological inhibition

Inhibition was performed with 10 nM K252a (tyrosine inhibitor of TrkA receptor), 10 μ M LY294002 (inhibitor of PI3K), 10 μ M PD98059 (inhibitor of MEK 1/2), 10 μ M GM6001 (broad spectrum inhibitor of matrix metalloprotease), 5 μ M MMP 2 inhibitor I (inhibitor of Matrix Metalloprotease 2) or 0.1 mM L-NAME (inhibitor of nitric oxide synthase). Control cells were treated with DMSO. The concentrations used were based upon the absence of toxicity in HUVEC, as determined by blue Trypan assay in EBM/0.5 % FBS for 24 h. All the inhibitors were from Calbiochem, except L-NAME (Sigma-Aldrich).

Western blot

Cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 0.25% sodium desoxycholate, 1:100 protease inhibitor cocktail and 1 mM sodium orthovanadate, all from Sigma-Aldrich) and proteins were separated by SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membrane (Protran 0.45 μ m, Whatman) or polyvinylidene fluoride membrane (Immobulon-P 0.45 μ m, Millipore) by liquid transfer.

Blots were blocked in 5% BSA, or 3% non fat skimmed milk, in Tris-Buffer Saline Tween-20 (TBST, 20 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature, and then followed by incubation overnight at 4°C with the primary antibodies against phospho TrkA (Tyr490), TrkA (Clone 763), phospho NOS (ser1177), NOS, phospho ERK (Thr202/Tyr204), ERK, phospho Akt (Ser473) and Akt. All the antibodies were from Cell Signaling and used at 1:1 000 dilution, except anti TrkA (1:500 dilution, Santa Cruz Biotechnology). After several washes with TBST, membranes were incubated with the horseradish peroxidase-linked anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (1:10 000 dilution, Jackson Immunoresearch) in 5% BSA in TBST for 1 h at room temperature. Immunoblots were visualized by enhanced chemiluminescence (Supersignal West Pico, Perbio) using chemiluminescence film (Amersham) or Fuji LAS-4000 Mini, according to manufacturers' protocol.

Nitric oxide (NO) quantification with DAF-2DA

NO quantification was performed as previously described (27). Briefly, HUVEC were seeded in 96 well-plates ($3 \cdot 10^4$ cells/well) and cultured for 24 h. Cells were then pretreated in EBM/0.5% FBS with or without the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NAME for 30 min at 37°C. Cells were then loaded with DAF-2DA (5 μ M final concentration, Sigma-Aldrich) for 20 min. After 2 washes, HUVEC were treated with NGF (100 ng/ml) or VEGF (10 ng/ml) in presence or absence of L-NAME (Sigma) for 2 h. The fluorescence intensity was measured with a multiwell plate reader FLx80 (Bio-tek instrument) using 490 nm as excitation and 520

nm as emission wavelengths. For the fluorescence imagery, cells were seeded on 8 well-Labtek chamber slides ($5 \cdot 10^4$ cells/well). Following experiment, cells were fixed and mounted and pictures were taken with Nikon Eclipse Ti-U fluorescent microscope.

Gelatin zymography analysis

The presence and activity of MMP-2 in conditioned medium from HUVEC were analyzed by zymography in 10% SDS-polyacrylamide gel/0.1% gelatin (Sigma-aldrich), according to manufacturer's protocol.

ELISA detection of secreted VEGF

HUVEC or MDA-MB-231 cells were seeded on 60 mm dishes in complete media. The following day, HUVEC were cultured in 2 ml EBM/0.5% FBS and MDA-MB-231 in 2 ml serum-free MEM in the presence of NGF (100 ng/ml) for 6 h or 24 h. The conditioned media were collected and concentrated with Amicon Ultra-4 10K (Millipore) according to the manufacturer's instruction. Protein content was then measured with BCA method before ELISA quantification of VEGF165 isoform according to manufacturer's instructions (Human VEGF DuoSet kit from R&D Systems).

Statistical analysis

Statistical differences were determined with two-tailed Student's t-tests. All p values were two sided.

Results

NGF contributes to stimulate breast cancer angiogenesis *in vivo*

To determine the potential effect of NGF in breast cancer angiogenesis, we first performed Matrigel plug assay in SCID mice (Fig. 1 A and B). Seven days after the experiment, MDA-MB-231 breast cancer cells strongly induced capillary vessel formation in Matrigel plugs, as revealed by hemoglobin content (Fig. 1A) and microvascular density in Matrigel plugs (Fig. 1B). The presence of a neutralizing antibody anti NGF in the Matrigel plugs decreased more than half the quantity of hemoglobin and microvascular density, suggesting that NGF is strongly involved in breast cancer angiogenesis (Fig. 1A and B). Moreover, recombinant NGF induced angiogenesis as efficiently as recombinant VEGF, while proNGF did not induce angiogenesis compared to control (Fig. 1C)

NGF exerts pleiotropic effects on human umbilical endothelial cells (HUVEC)

The strong involvement of NGF in breast cancer angiogenesis prompted us to determine the effects of NGF on endothelial cells in terms of proliferation, migration, invasion, cord formation and permeability, as all these processes are known to be involved in tumor angiogenesis. We used the well known prototypic angiogenic factor VEGF as positive control. To clarify the presentation, we show only results obtained with optimal concentrations (100 ng/ml NGF or 10 ng/ml VEGF). As shown in Fig. 2A and B, NGF stimulated proliferation and migration of HUVEC, but not as strongly as VEGF. In contrast, NGF stimulated HUVEC invasion (Fig. 2C) and cord formation as strongly as VEGF (Fig. 2D). Similar to VEGF, NGF increased also the permeability of HUVEC monolayer (Fig. 2E).

NGF-stimulated invasion of HUVEC involves the activation of TrkA and multiple downstream pathways

As invasion of endothelial cells is an important step in angiogenesis, and as NGF stimulated HUVEC invasion, we decided to determine different signaling pathways involved in NGF-stimulated invasion. As shown in Fig. 3A, upon NGF treatment, TrkA phosphorylation was increased within 10 minutes. Concomitantly, the levels of phospho Akt (pAkt) and phospho

ERK (pERK) were increased within 10 minutes and remained high even after 2 h of treatment with NGF. Furthermore, pharmacological inhibition of TrkA (K252a), PI3K (LY294002) and MEK 1/2 (PD98059) (Fig. 3B) totally abolished NGF-stimulated invasion (Fig. 3C). This suggested that NGF-stimulated invasion of HUVEC was mediated by its tyrosine kinase TrkA and the downstream pathways including PI3K and ERK.

Matrix metalloproteases (MMPs) are essential in matrix degradation during cell invasion. We therefore used the MMP broad spectrum inhibitor (GM6001) and the specific inhibitor of MMP2 (MMP2 inhibitor I) to determine the involvement of MMPs in NGF-stimulated invasion of HUVEC. As shown in Fig. 4A, the two inhibitors totally abolished NGF-stimulated invasion. Concomitantly, gelatin zymography analysis (Fig. 4B and C) showed that NGF did increase the levels of MMP2 active form in conditioned medium from HUVEC; treatment of HUVEC with GM6001 or MMP2 inhibitor I totally abolished NGF-induced activation of MMP2 (Fig. 4B). In addition, inhibitors of TrkA (K252a), PI3K (LY294002) and MEK 1/2 (PD98059) abolished the NGF-induced active form of MMP2 (Fig. 4C). Together, these findings indicated that NGF-stimulated invasion of HUVEC involved MMPs, particularly MMP2, which was under the control of PI3K and ERK pathways.

PI3K/Akt pathway has been reported to phosphorylate NO synthase (NOS), thus increasing NO production which is responsible for VEGF-induced endothelial cell migration (28, 29). Here, we showed that NGF also increased the levels of both phospho NOS (pNOS) (Fig. 5A) and NO in HUVEC (Fig. 5B and C). Moreover, NOS inhibition with L-NAME drastically decreased NGF-induced NO production (Fig. 5 B and C) as well as NGF-stimulated invasion of HUVEC (Fig. 5D). These data indicated that NGF-stimulated invasion of HUVEC implied the activation of NOS.

NGF-stimulated breast cancer angiogenesis partially involves VEGF

It has been described that NGF can stimulate the expression VEGF in several types of cells including endothelial cells (14), as well as epithelial ovarian cancer cells (30). As VEGF165 isoform is known to be the major member of VEGF family involved in breast cancer

angiogenesis (9, 10), we decided to determine the potential implication of VEGF165 in NGF-stimulated angiogenesis. As revealed by ELISA assay (Fig. 6A), NGF strongly increased the levels of secreted VEGF in both HUVEC and MDA-MB-231 breast cancer cells. Upon 24 h of treatment with NGF, an increase of 63 % and 43% of secreted VEGF was observed in HUVEC and MDA-MB-231 cells, respectively. We then determined the involvement of VEGF165 in NGF-stimulated angiogenesis both *in vitro* and *in vivo* by using an anti VEGF165 neutralizing antibody. Although anti VEGF was able to totally abolish VEGF-induced invasion, neutralization of VEGF led to 50% decrease of NGF-induced invasion of HUVEC (Fig. 6B). Interestingly, similar result was obtained when angiogenesis was determined using Matrigel plugs in SCID mice (Fig. 6C). Collectively, these results demonstrated that NGF-induced angiogenesis was partially mediated by VEGF.

Discussion

Here, we presented *in vivo* and *in vitro* data that give new insights into mechanisms of the involvement of NGF in breast cancer angiogenesis. Using an *in vivo* matrigel model, we showed that strong angiogenesis was set up as early as 7 days after subcutaneous injection of MDA-MB-231 breast cancer cells in SCID mice. Importantly, neutralization of NGF with an antibody against NGF reduced more than half of breast cancer cells-induced angiogenesis. These results reinforced our previous findings that treatment of established xenografted mammary tumors with a neutralizing antibody against NGF could reduce the number of endothelial cells in the tumors (23). Moreover, we found that the *in vivo* angiogenic effect of NGF was similar to that elicited by VEGF₁₆₅; this is consistent with data reported by Cantarella et al. (14) who used chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) as *in vivo* angiogenesis assay. As VEGF is considered as one of the most efficient proangiogenic factors in breast cancer angiogenesis (5, 9), and NGF is found to be overexpressed in breast cancer (23), therefore, our present findings highlight the importance of NGF as a proangiogenic factor in breast cancer.

Tumor angiogenesis involves several processes, including endothelial activation, proliferation, migration and tissue infiltration from preexisting blood vessels that are triggered by specific proangiogenic growth factors produced by tumor cells and the surrounding stroma (31). These include VEGF (32) and bFGF (33) which have been shown to activate their specific receptor tyrosine kinases, thereby initiating intracellular signaling to drive the angiogenic process. The effects of NGF on endothelial cells have been found to vary according to tissue origin. NGF stimulates proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) and choroidal endothelial cells (14, 34-36). In contrast, NGF has no effect on either proliferation or migration of retinal endothelial cells (34). Here, we showed that NGF strongly enhanced invasion and cord formation of HUVEC with moderate effects on proliferation and migration. Of importance, we showed for the first time that NGF increased the permeability of endothelial cell monolayer *in vitro*. The increased permeability of intratumoral blood vessels

is thought to favor tumor cell extravasation during metastasis and to play a crucial role in tumor stroma formation due to leak of plasma fibrinogen (37, 38).

As invasion of endothelial cells is one of the important processes during angiogenesis, we decided to determine the signaling pathways involved in NGF-stimulated invasion of HUVEC. We demonstrated that NGF-stimulated invasion was regulated *via* its tyrosine kinase receptor TrkA; this was reinforced by the observation that ProNGF, which acts *via* other receptors (p75^{NTR} and sortilin) than TrkA, had no effect on angiogenesis. Moreover, NGF-stimulated invasion was regulated by TrkA downstream signaling pathways including PI3K and ERK, leading to the activation of MMP2. These findings are partially in agreement with data reported by Park et al (36) in that they observed only the involvement of PI3K, but not ERK, in NGF-induced HUVEC invasion and MMP2 activation. The reason of such a discrepancy is not known; one hypothesis might be the difference of culture medium or HUVEC origin, as these cells are derived from different donors.

Another interesting finding of our work was the involvement of NO synthase (NOS) in NGF-induced invasion. NOS is responsible for the production of nitric oxide (NO), a highly diffusible signaling molecule, known to mediate a number of functions such as angiogenesis, immune responses and nervous system development (39). Endothelial NOS (eNOS), is particularly expressed by vascular endothelial cells or surrounding stromal cells and therefore has been a focus of attention in angiogenesis. Thus, using eNOS^{-/-} mice, it has been found that NO mediates branching and longitudinal extension of blood vessels in B16 melanomas and that this process is predominantly mediated by eNOS (40). In cell culture models, eNOS has been described to be involved in migration of endothelial cells (28, 29). eNOS is also involved in the proangiogenic effect of VEGF and prostaglandin E2 (41, 42). VEGF has been reported to stimulate endothelial cell migration by activating Akt which in turn phosphorylates Ser1177 residue of eNOS (29, 43). Here, we found that NGF induced a rapid and persistent increase of phosphorylation of NOS at Ser1177, accompanied by an increase of NO production, suggesting that NGF-induced phosphorylation of eNOS could also involve PI3K/Akt pathway as previously described for VEGF (29, 43).

NGF has been described to increase the expression of VEGF in various tissues and cells such as ischemic hindlimb (15, 44), nervous system (45, 46), epithelial ovarian cancer cells (30) and endothelial cells (46). Therefore, NGF may exert its proangiogenic effect *via* VEGF. Indeed, we showed NGF can increase the secretion of VEGF in both HUVEC and MDA-MB-231 breast cancer cells. Moreover, NGF-promoted angiogenesis is partially mediated by VEGF, as neutralizing antibody anti VEGF inhibited about half of NGF-induced HUVEC invasion, as well as angiogenesis, *in vivo*. These data, together with our previous findings of NGF overexpression in breast cancer, suggest that NGF could favour breast cancer angiogenesis in concert with VEGF in an autocrine/paracrine manner.

In conclusion, we provided direct evidence that NGF could be an important stimulator for breast cancer angiogenesis. NGF not only stimulates proliferation, migration, invasion and tubule formation of endothelial cells, but also increases the permeability of endothelial cell monolayer. Furthermore, our study allows for the identification of new pathways, such as NO synthase and ERK, in NGF-induced invasion of endothelial cells. Thus, NGF, as well as the activated signaling pathways, should be taken into account for the design of future anti-angiogenic therapeutic approaches against breast cancer.

Footnote

Grant support: INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2009), le Ministère de l'Education Nationale and la Région Nord-Pas-de-Calais.

References

1. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339: 58-61.
2. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23: 1011-27.
3. Furstenberger G, von Moos R, Lucas R, *et al.* Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *Br J Cancer* 2006;94: 524-31.
4. Kim KJ, Li B, Winer J, *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362: 841-4.
5. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 2000;5 Suppl 1: 37-44.
6. Lee JC, Chow NH, Wang ST, Huang SM. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur J Cancer* 2000;36: 748-53.
7. George DJ, Halabi S, Shepard TF, *et al.* Prognostic significance of plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated on Cancer and Leukemia Group B 9480. *Clin Cancer Res* 2001;7: 1932-6.
8. Cheung N, Wong MP, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum Pathol* 1998;29: 910-4.
9. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1998;16: 3121-8.
10. Stimpfl M, Tong D, Fasching B, *et al.* Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8: 2253-9.
11. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361: 1545-64.
12. Caporali A, Emanuelli C. Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiol Rev* 2009;89: 279-308.
13. Seo K, Choi J, Park M, Rhee C. Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas. *J Vet Sci* 2001;2: 125-30.

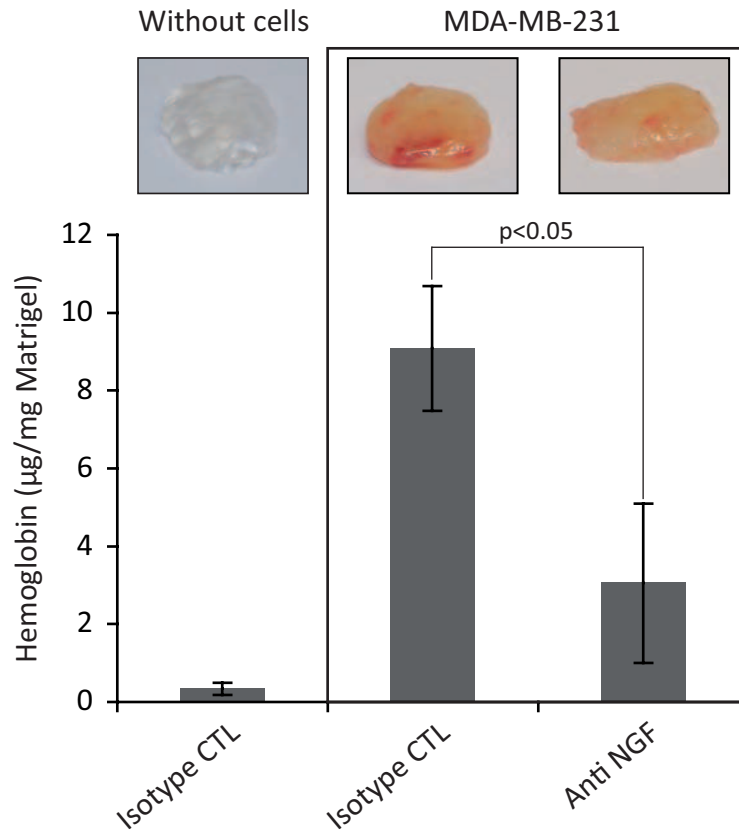
14. Cantarella G, Lempereur L, Presta M, *et al.* Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB J* 2002;16: 1307-9.
15. Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, Madeddu P. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation* 2002;106: 2257-62.
16. 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.
17. Ricci A, Greco S, Mariotta S, *et al.* Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25: 439-46.
18. Zhu Z, Friess H, diMola FF, *et al.* Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 1999;17: 2419-28.
19. Weeraratna AT, Arnold JT, George DJ, DeMarzo A, Isaacs JT. Rational basis for Trk inhibition therapy for prostate cancer. *Prostate* 2000;45: 140-8.
20. 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.
21. Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V, Hondermarck H. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22: 5592-601.
22. Dolle L, Adriaenssens E, El Yazidi-Belkoura I, Le Bourhis X, Nurcombe V, Hondermarck H. Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4: 463-70.
23. 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.
24. Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, *et al.* TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* 2009;28: 1960-70.
25. 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.
26. Liu Z, Kobayashi K, van Dinther M, *et al.* VEGF and inhibitors of TGFbeta type-I receptor kinase synergistically promote blood-vessel formation by inducing alpha5-integrin expression. *J Cell Sci* 2009;122: 3294-302.
27. Sugimoto K, Fujii S, Takemasa T, Yamashita K. Detection of intracellular nitric oxide using a combination of aldehyde fixatives with 4,5-diaminofluorescein diacetate. *Histochem Cell Biol* 2000;113: 341-7.

28. Murohara T, Witzendichler B, Spyridopoulos I, *et al.* Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19: 1156-61.
29. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 2000;477: 258-62.
30. 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.
31. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6: 389-95.
32. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9: 669-76.
33. Javerzat S, Auguste P, Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med* 2002;8: 483-9.
34. Steinle JJ, Granger HJ. Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation. *Auton Neurosci* 2003;108: 57-62.
35. Rahbek UL, Dissing S, Thomassen C, Hansen AJ, Tritsarlis K. Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK-dependent migration. *Pflugers Arch* 2005;450: 355-61.
36. Park MJ, Kwak HJ, Lee HC, *et al.* Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and AP-2 transcription factor. *J Biol Chem* 2007;282: 30485-96.
37. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237: 97-132.
38. Nagy JA, Feng D, Vasile E, *et al.* Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. *Lab Invest* 2006;86: 767-80.
39. Fukumura D, Jain RK. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17: 77-89.
40. Kashiwagi S, Izumi Y, Gohongi T, *et al.* NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineered blood vessels. *J Clin Invest* 2005;115: 1816-27.
41. Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, *et al.* Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10: 2694-704.

42. Namkoong S, Lee SJ, Kim CK, *et al.* Prostaglandin E2 stimulates angiogenesis by activating the nitric oxide/cGMP pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Exp Mol Med* 2005;37: 588-600.
43. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399: 601-5.
44. Salis MB, Graiani G, Desortes E, Caldwell RB, Madeddu P, Emanuelli C. Nerve growth factor supplementation reverses the impairment, induced by Type 1 diabetes, of hindlimb post-ischaemic recovery in mice. *Diabetologia* 2004;47: 1055-63.
45. Calza L, Giardino L, Giuliani A, Aloe L, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactive factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98: 4160-5.
46. Hansen-Algenstaedt N, Algenstaedt P, Schaefer C, *et al.* Neural driven angiogenesis by overexpression of nerve growth factor. *Histochem Cell Biol* 2006;125: 637-49.

Fig. 1. Angiogenesis assay using Matrigel plugs in SCID mice. Matrigel containing a mixture of MDA-MB-231 breast cancer cells and the indicated antibodies (A and B) or containing recombinant proNGF, NGF and VEGF (C) was subcutaneously injected into SCID mice as described in materials and methods. Angiogenesis was analyzed by quantification of hemoglobin (A and C) and microvessel density (B) as described in materials and methods. Five mice were used for each group and results are the mean of three independent experiments. * $p < 0.01$, *versus* control.

A



B

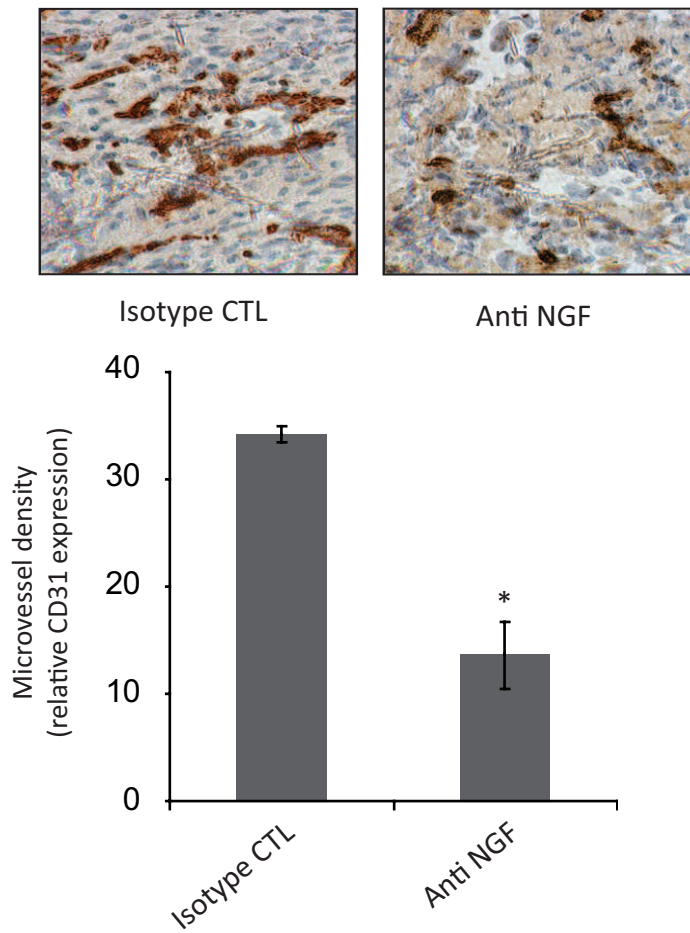


Figure 1 A and B

C

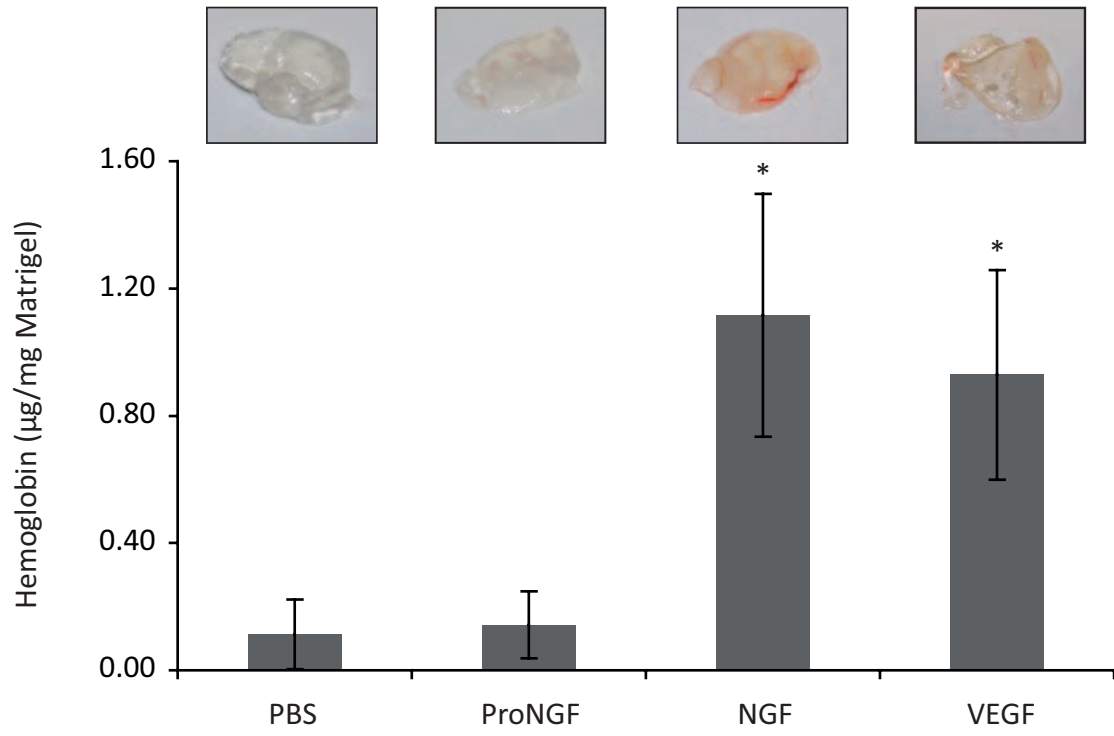
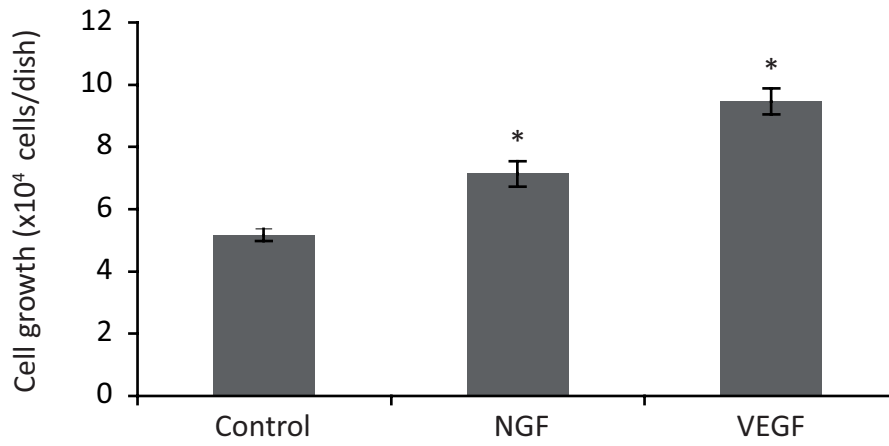


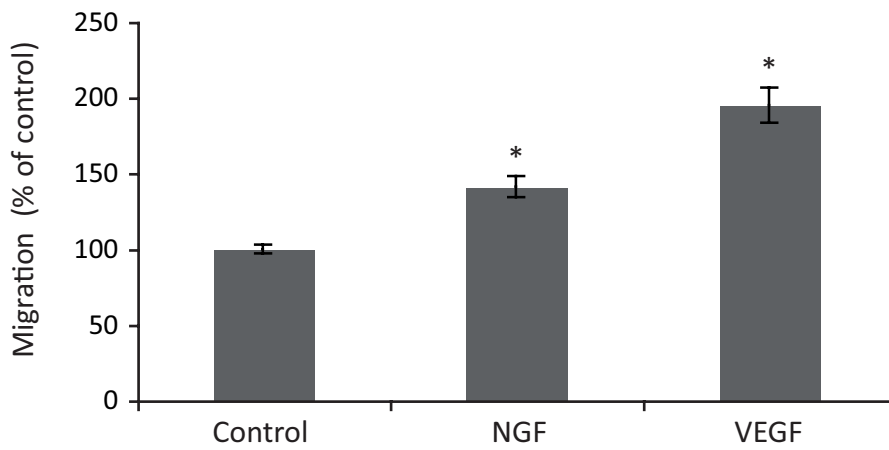
Figure 1 C

Fig. 2. Pleiotropic effects of NGF on HUVEC. (A) Growth assay. HUVEC cultured on standard culture plastic were treated with NGF or VEGF for 48 h. (B and C) Migration and invasion assay using Transwells. (D) Cord formation assay on matrigel-coated 24-well dishes. (E) Endothelial cell monolayer permeability assay. The kinetic of 70 kDa Dextran-FITC having passed through the monolayer of endothelial cells was determined by measurement of fluorescence in the lower chambers at different time points. Results are the mean of at least three independent experiments, each in triplicate. * $p < 0.01$; # $p < 0.05$ versus control.

A



B



C

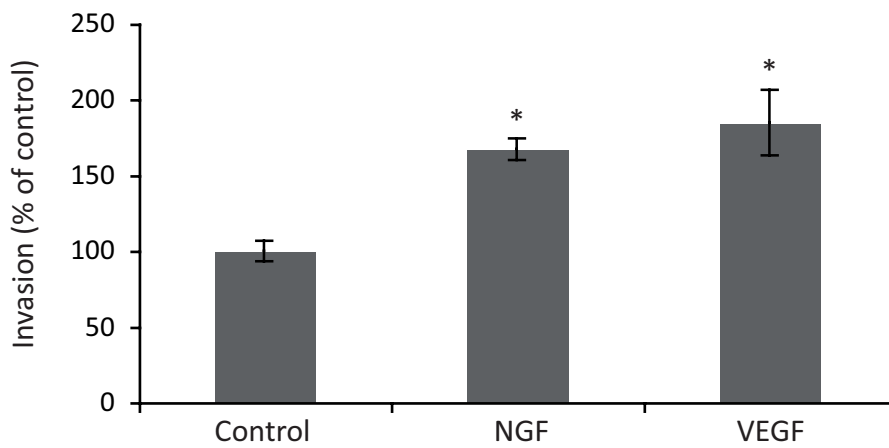
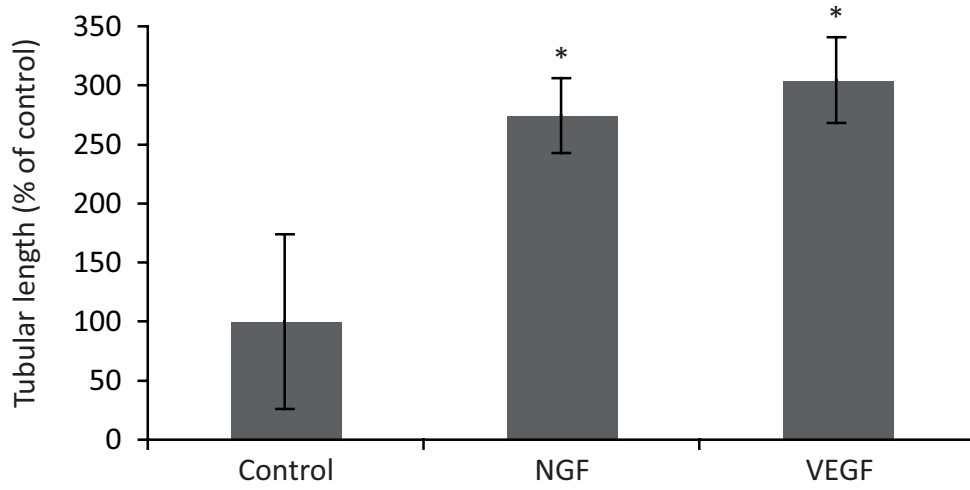
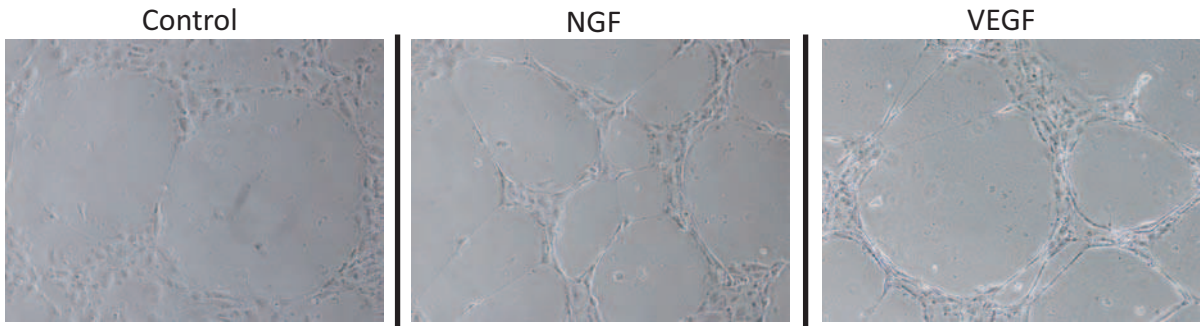


Figure 2 A - C

D



E

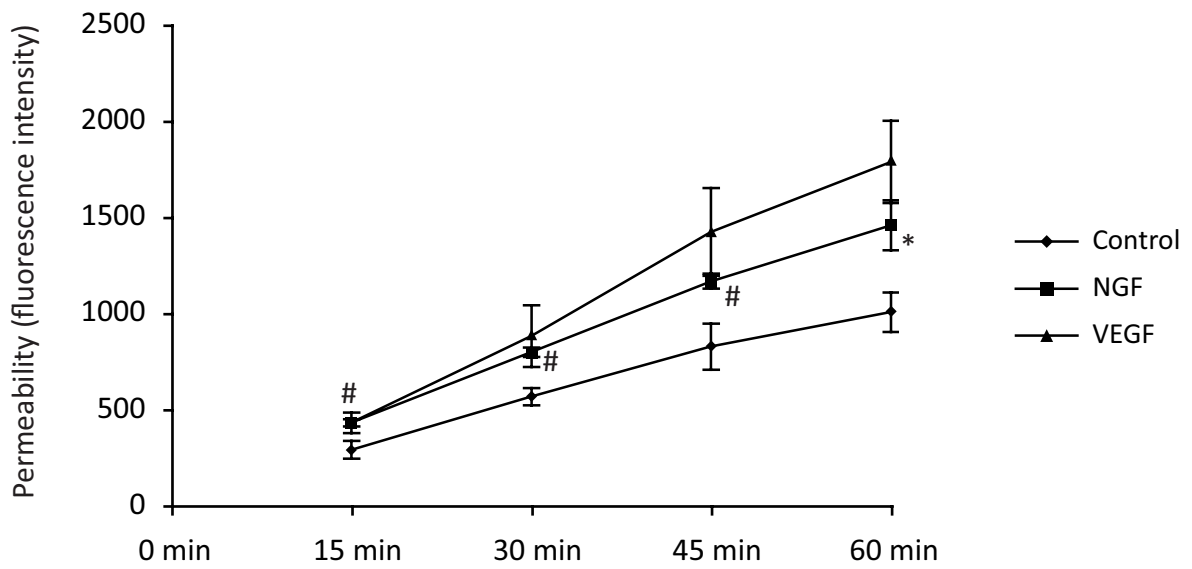
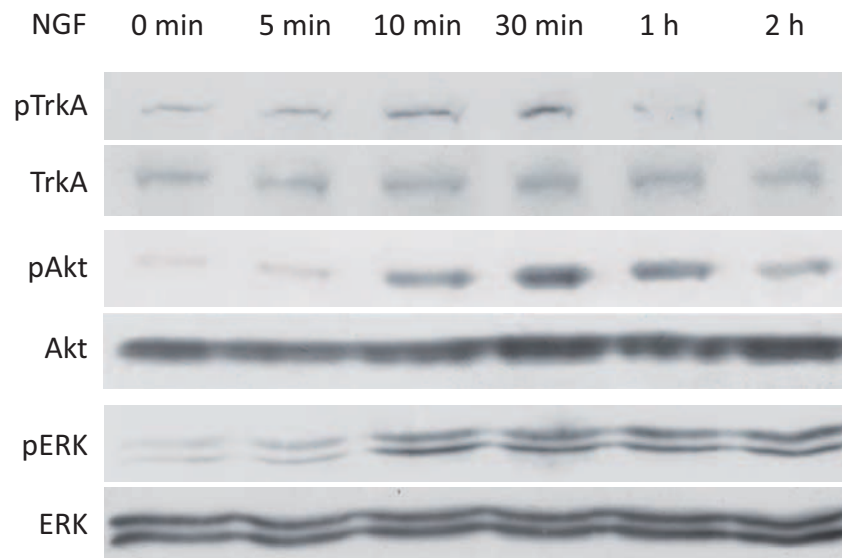


Figure 2 D and E

Fig. 3. Involvement of TrkA, PI3K/Akt and MAPK pathways in NGF-stimulated invasion of HUVEC. (A) Western blot analysis of phospho TrkA (pTrkA), pAkt, and pERK upon NGF stimulation. (B) Inhibition of pTrkA, pAkt and pERK by specific pharmacological inhibitors. HUVEC were treated or not with NGF in the absence or presence of K252a, LY294002 or PD98059 for 20 min. For both A and B, results are representative of at least two independent experiments. (C) Invasion assay using Transwells. HUVEC were pretreated with the indicated pharmacological inhibitors and then treated with NGF for 24 h. Results are the mean of three independent experiments each in triplicate. * $p < 0.01$, *versus* control.

A



B

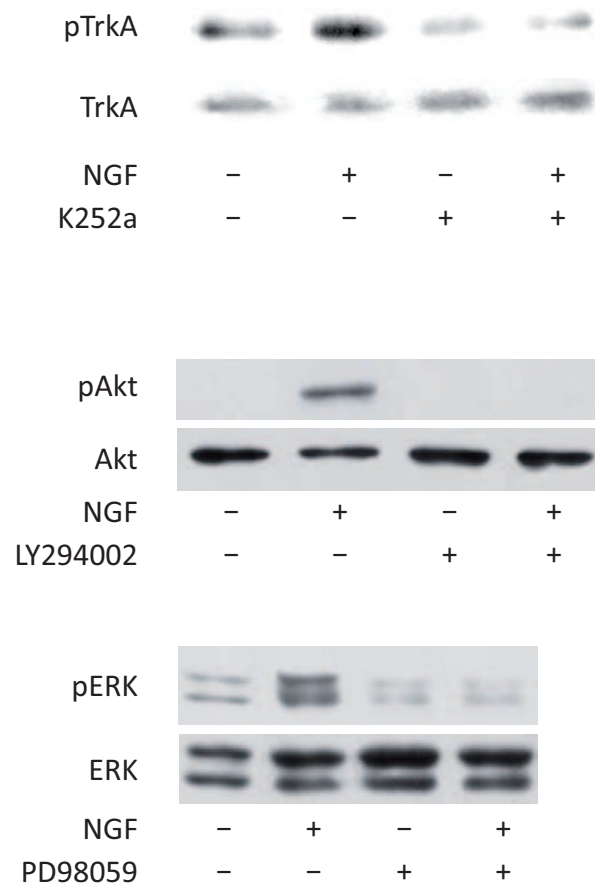


Figure 3 A and B

Romon *et al.*

C

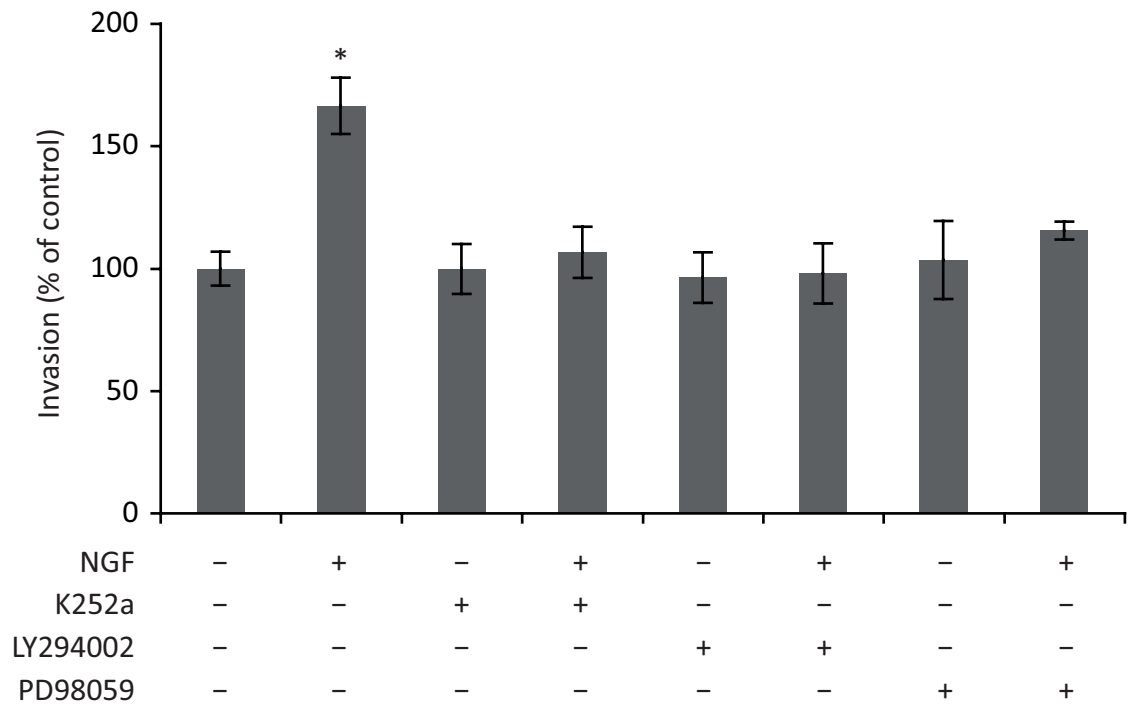
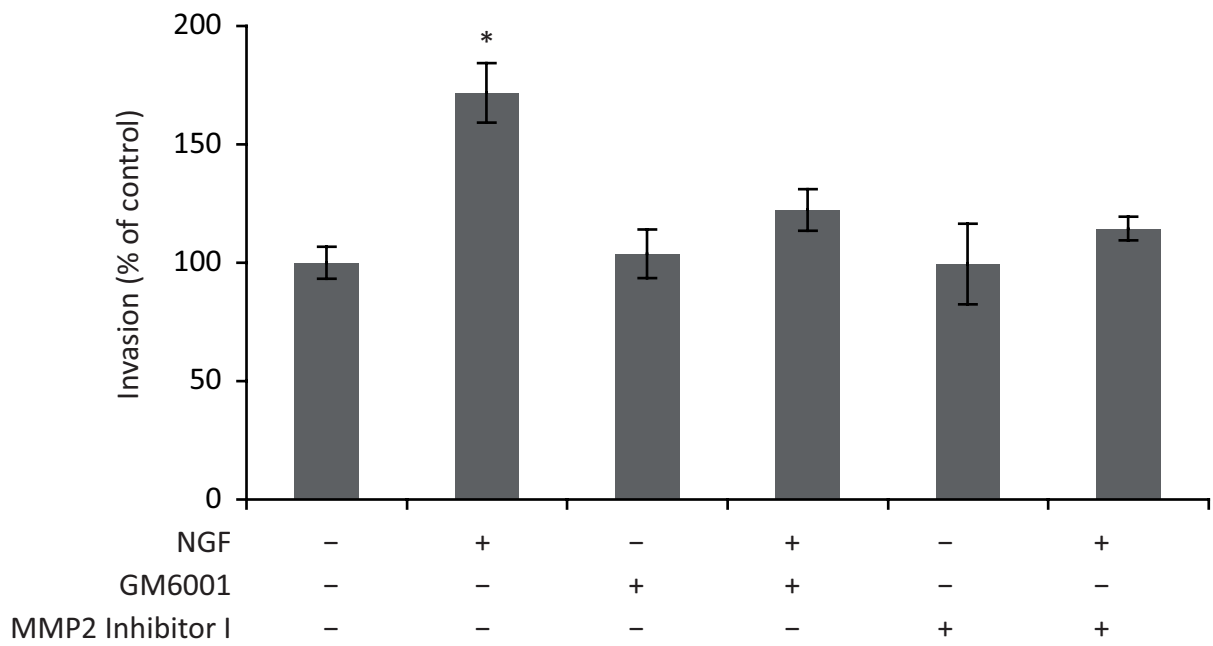


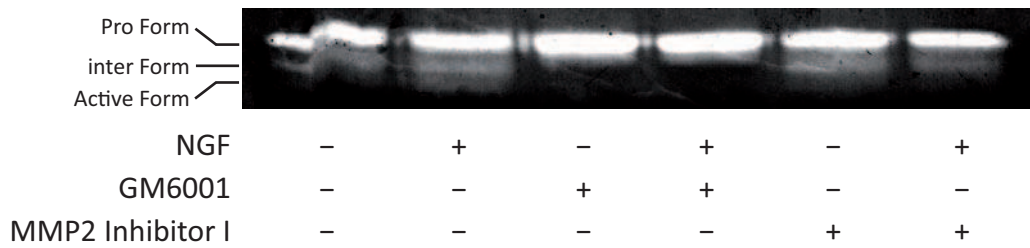
Figure 3 C

Fig. 4. Involvement of MMPs in NGF-stimulated invasion. (A) Invasion assay using Transwells. HUVEC were pretreated with the broad spectrum inhibitor of MMPs GM6001 or the specific inhibitor of MMP2 (MMP2 Inhibitor I) and then treated with NGF for 24 h. Results are the mean of three independent experiments each in triplicate. * $p < 0.01$, *versus* control. (B and C) Zymography analysis of MMP2. HUVEC were treated with NGF in the presence of different pharmacological inhibitors for 24 h before zymography analysis, as described in materials and methods. Results are representative of two independent experiments.

A



B



C

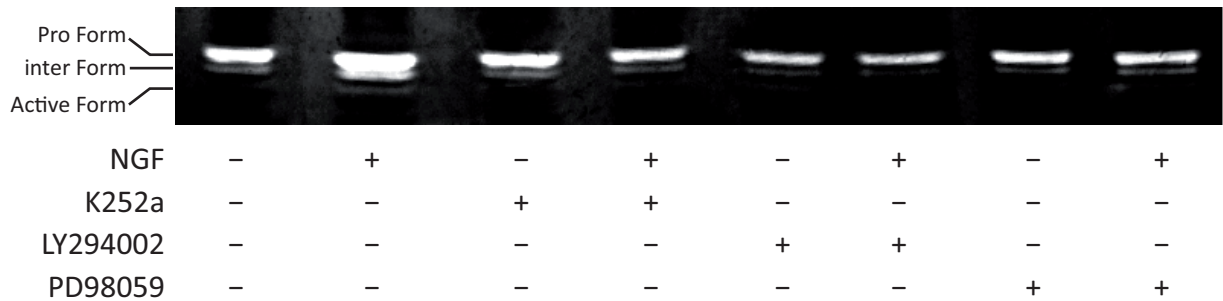
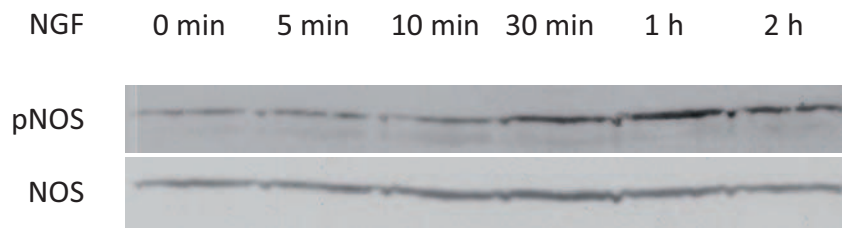


Figure 4

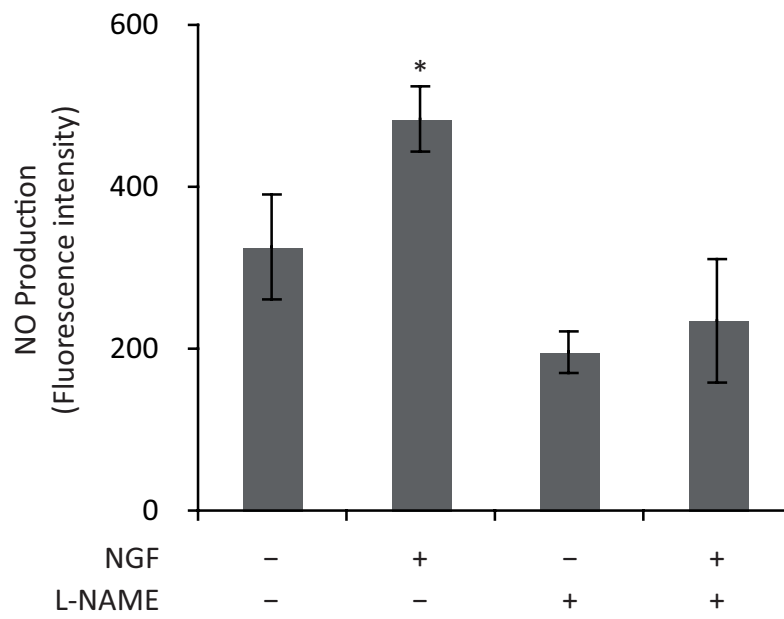
Romon *et al.*

Fig. 5. Involvement of NO synthase in NGF-stimulated invasion. (A) Western blot analysis of phospho NO Synthase (pNOS) upon NGF treatment. Results were representative of two independent experiments. (B) Quantification of NO levels in HUVEC. Cells were treated with NGF in the presence or absence of NO synthase inhibitor (L-NAME). (C) Illustration of fluorescence intensity which represent the levels of NO in HUVEC under different conditions. (D) Invasion assay using Transwells. HUVEC were pretreated with L-NAME and then treated with NGF for 24 h. For both B and D, results are the mean of at least three independent experiments each in triplicate. * $p < 0.01$, *versus* control.

A



B



C

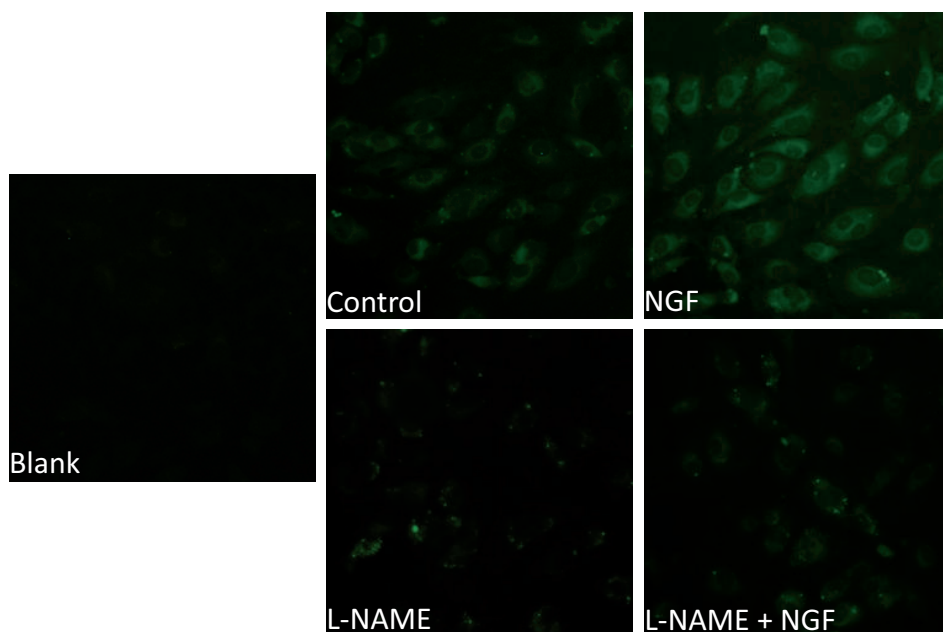


Figure 5 A - C

D

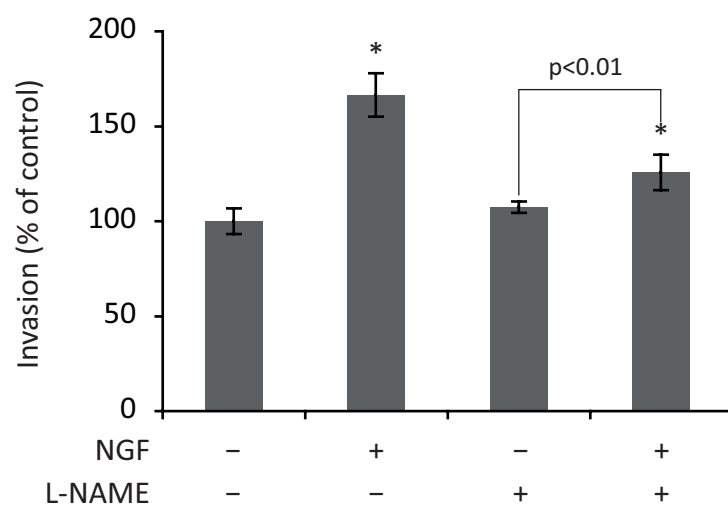


Figure 5 D

Fig. 6. Involvement of the VEGF165 in NGF-stimulated angiogenesis. (A) ELISA quantification of VEGF165 isoform in conditioned media from HUVEC and MDA-MB-231 cells. Cells were treated with NGF for 6 h or 24 h, conditioned media were concentrated before ELISA assay, as described in materials and methods. (B) Invasion assay using Transwells. HUVEC were treated with NGF or VEGF in the presence of isotype control or anti VEGF neutralizing antibodies for 24 h. (C) *In vivo* angiogenesis assay. Matrigel containing a mixture of NGF and isotype control or anti VEGF neutralizing antibodies was subcutaneously injected into SCID mice (five mice per group) as described in materials and methods. Hemoglobin in Matrigel plugs was quantified by Drabkin method 7 days after injection. Results are the mean of three independent experiments. * $p < 0.01$; # $p < 0.05$ versus control.

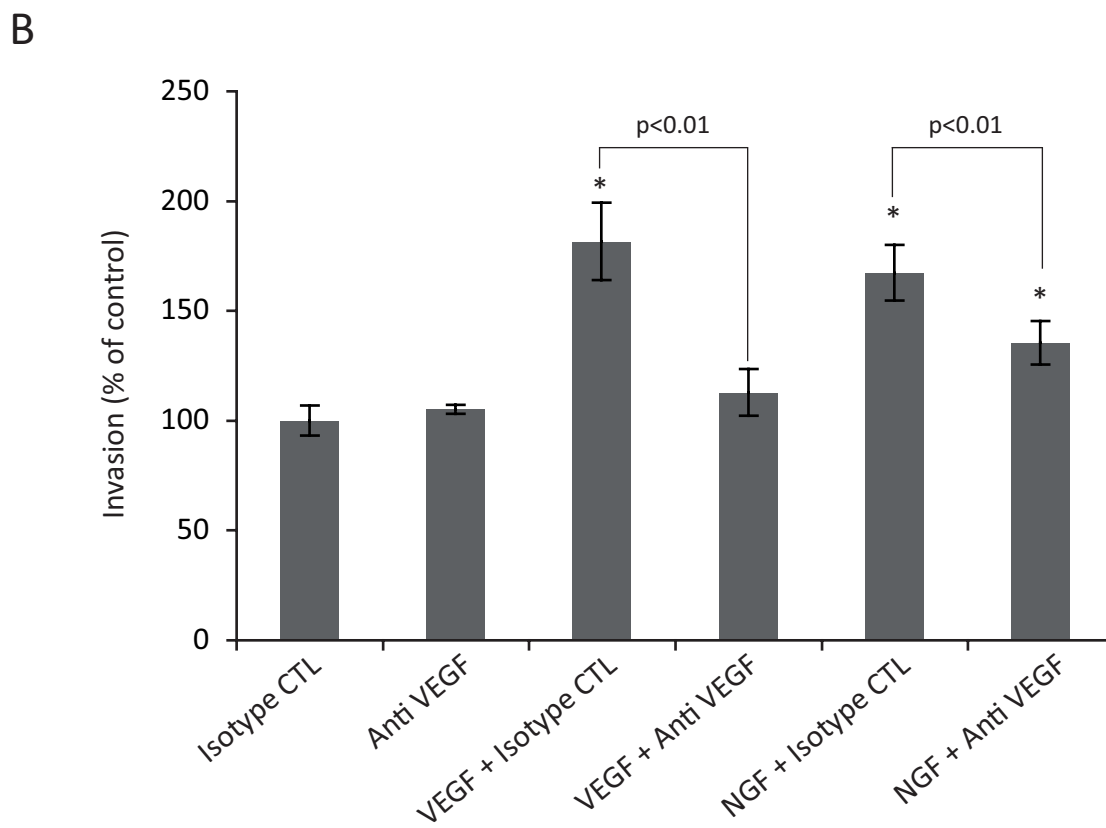
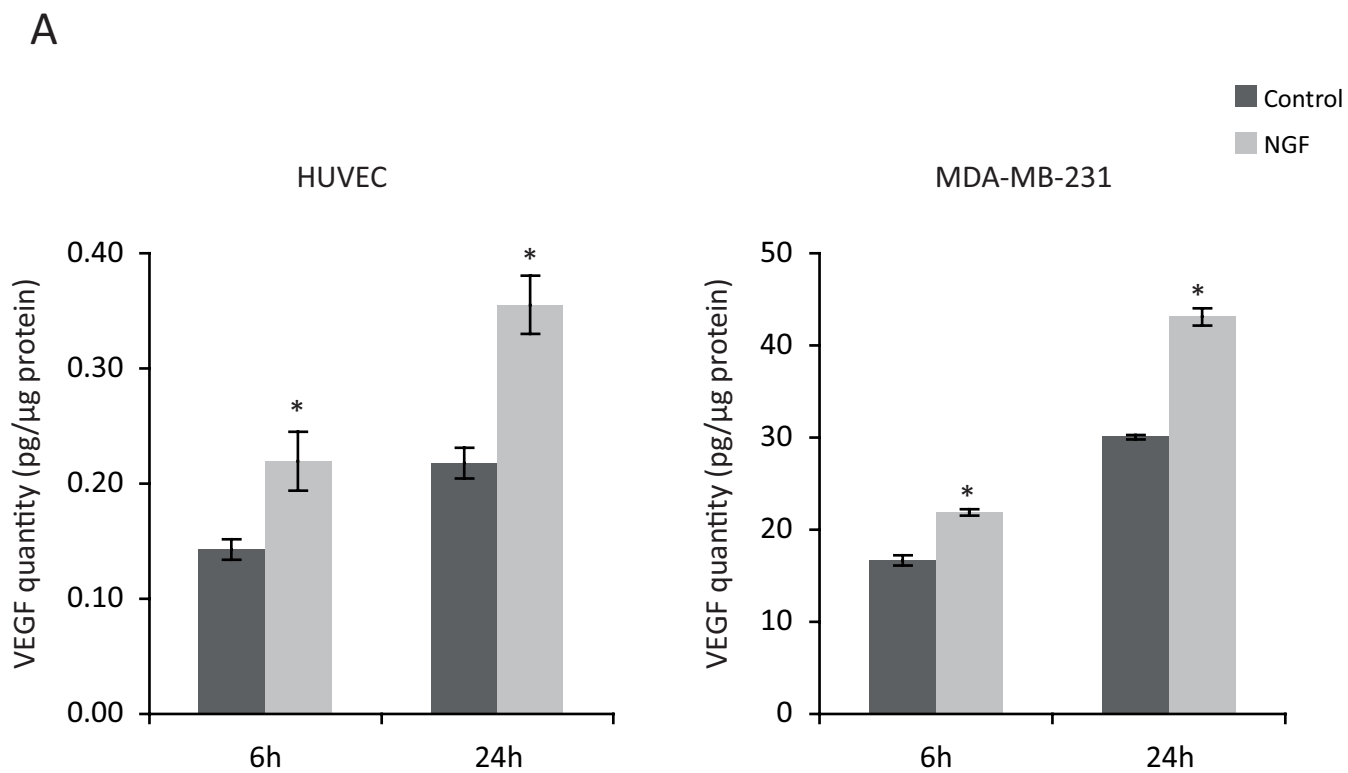


Figure 6 A - B

C

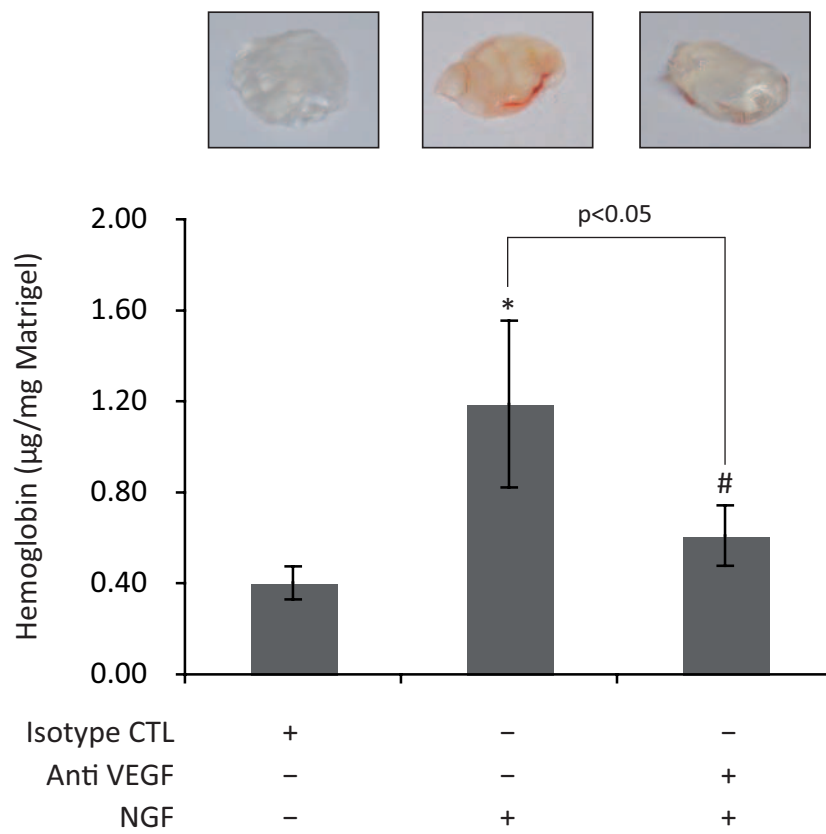


Figure 6 C

Travaux supplémentaires

**Effet du NT4 sur l'angiogenèse :
premiers éléments**

Résultats

Nous avons montré, au sein de notre laboratoire, que les cellules de cancer du sein pouvaient exprimer et sécréter d'autres neurotrophines telles que le NGF. Parmi celles-ci, nous pouvons citer le NT-4/5 et le BDNF (données non publiées). Nous avons vu en introduction que ces deux neurotrophines ont la possibilité de stimuler l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro* pour le BDNF en particulier. Les effets biologiques du NT-4/5 ainsi que les voies de signalisation impliquées dans la stimulation de l'angiogenèse induite par ce facteur ont jusqu'alors été peu décrits. C'est pourquoi nous avons débuté une étude des effets du NT-4/5 sur l'angiogenèse grâce à une approche similaire à celle employée dans l'étude des effets du NGF sur l'angiogenèse dans cancer du sein présentée dans l'article « NGF promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways ». Les différentes méthodes et matériels employés ne seront donc pas décrits dans ce chapitre. Des expériences d'effets doses ont été effectuées (100 ng/ml, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 10 ng/mL) sur la croissance et l'invasion des cellules endothéliales HUVEC. Pour des raisons de clarté, nous présentons les résultats obtenus avec la dose optimale de 25 ng/ml.

Nous avons d'abord cherché à déterminer les effets du NT-4/5 sur différentes étapes majeures de l'angiogenèse *in vitro* sur les cellules endothéliales HUVEC (Figure 27). Nous pouvons ainsi noter que le NT-4/5 exerce, au même titre que le NGF, des effets pléiotropiques sur les cellules endothéliales en termes de croissance, de migration, d'invasion et de tubulogenèse. En revanche, il apparait clairement que les effets du NT-4/5 sur ces différentes étapes de l'angiogenèse sont de moindre intensité que ceux induits par le NGF et plus faibles encore que ceux induits par le VEGF. Malheureusement, nous n'avons pu apprécier l'effet du NT-4/5 sur la perméabilité des monocouches de cellules endothéliales.

L'étude préliminaire des différentes voies de signalisation impliquées dans l'effet stimulateur du NT-4/5 sur l'invasion des cellules endothéliales semble indiquer que, tout comme pour le NGF, cette stimulation est dépendante de l'activation des voies MAPK, PI3K/Akt et NO Synthase (Figure 28). De même, l'invasion induite par le NT-4/5 semble nécessiter une activité des MMP (Figure 29).

Introduction

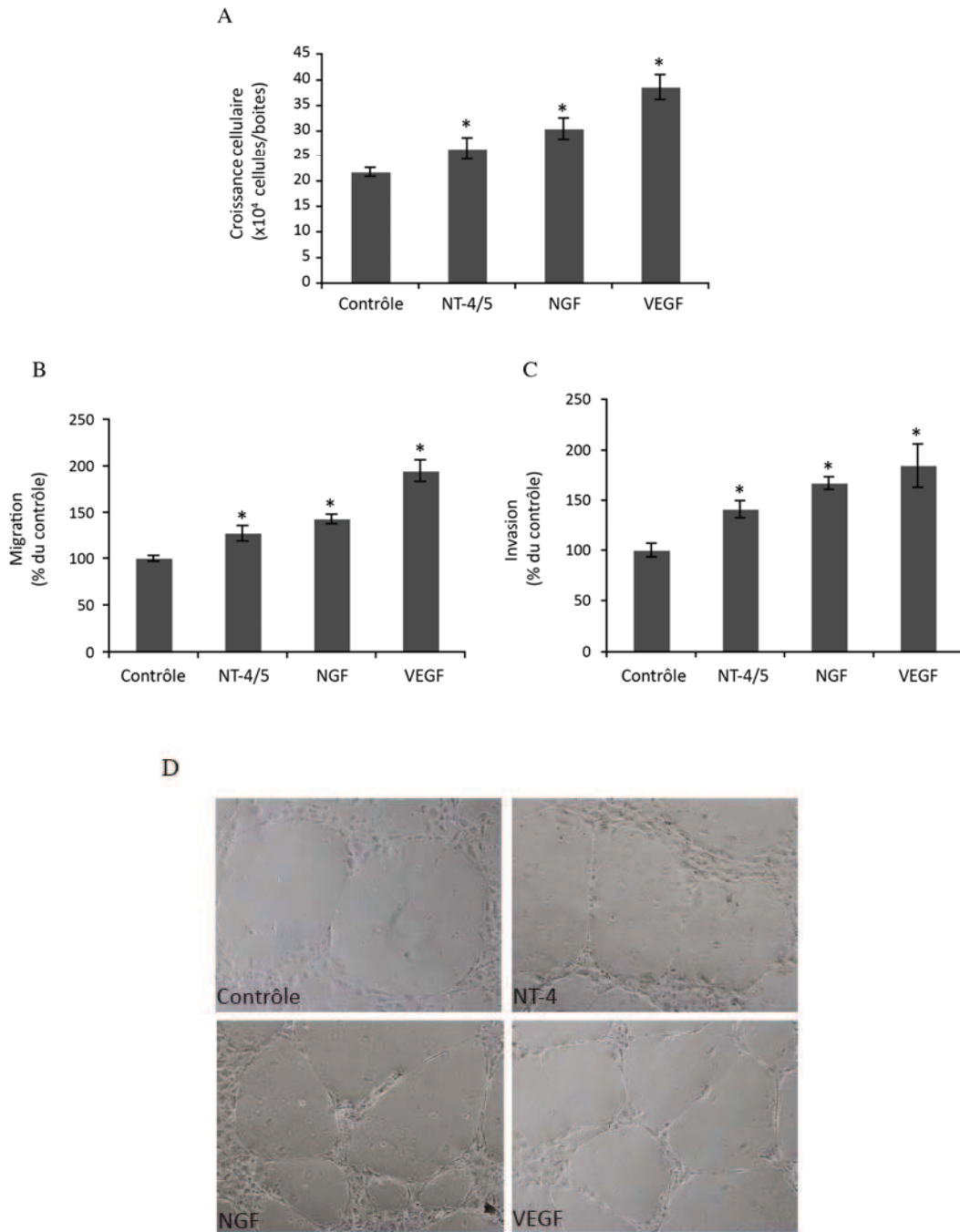


Figure 27. Effets pléiotropiques du NT-4/5 sur l'angiogenèse *in vitro*.

(A) Croissance des HUVEC. Les cellules sont comptées après 2 jours de traitement au NT-4/5 (25 ng/ml), au NGF (100 ng/ml) ou au VEGF (10 ng/ml). (B) Migration et (C) invasion des HUVEC. Les cellules sont ensemencées sur les membranes poreuses de chambre de Bowden préalablement traitées au GFR Matrigel dilué au 1/100 pour la migration et 1/10 pour l'invasion. Après traitement (6 h pour la migration et 24 h pour l'invasion) au NT-4/5, au NGF ou au VEGF, les cellules présentes sur la surface inférieure des membranes poreuses sont comptées afin d'apprécier la migration et l'invasion. (D) Tubulogenèse des HUVEC. Les photographies sont présentées après 18 h de culture sur une fine couche de GFR matrigel en présence de NT-4/5, NGF ou VEGF. Les résultats représentent la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. * $p < 0,01$ comparé au contrôle.

Résultats

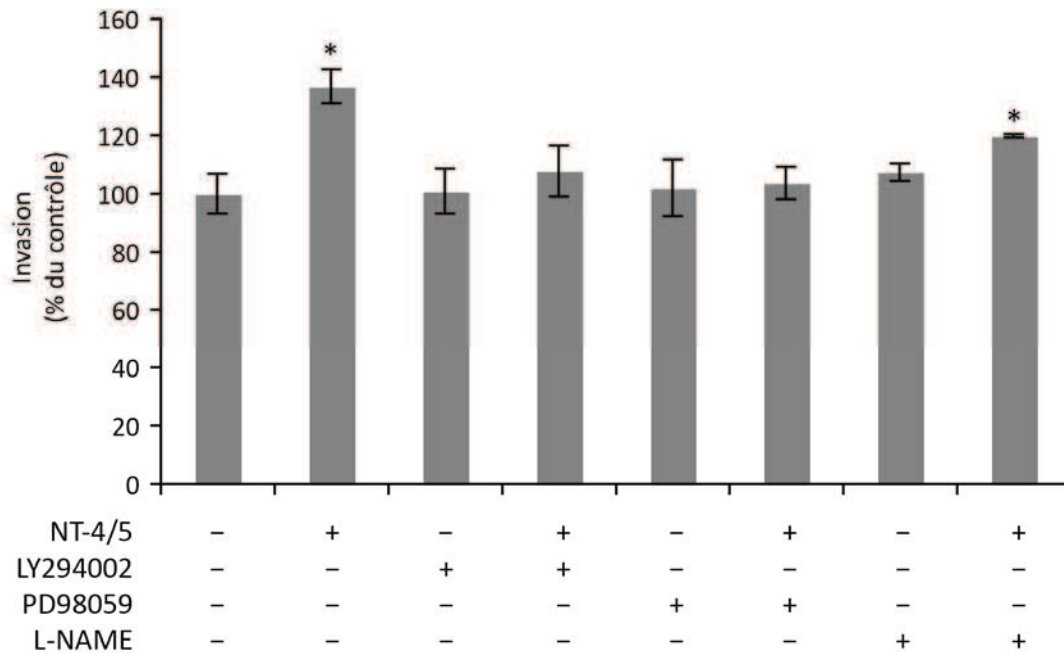


Figure 28. Implication des voies de signalisation MAPK, PI3K/akt et NO Synthase dans l'effet stimulateur du NT-4/5 sur l'invasion des HUVEC.

Les cellules endothéliales sont tout d'abord prétraitées avec différents inhibiteurs pharmacologiques : 10 μ M LY294002 (inhibiteur de PI3K), 10 μ M PD98059 (inhibiteur de MEK 1/2), 0.1 mM L-NAME (inhibiteur de la NO synthase), 10 μ M GM6001 (inhibiteur à large spectre des MMP). Les cellules sont ensuite traitées au NT-4/5 (25 ng/ml) pendant 24 heures. Les cellules ayant traversé les membranes poreuses sont alors quantifiées. Les résultats représentent la moyenne de deux expériences réalisées en triplicata. * $p < 0,01$ comparé au contrôle.

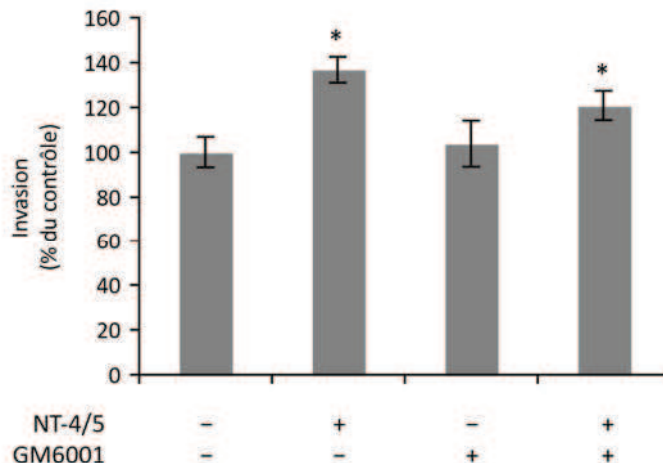


Figure 29. Implication des MMP dans l'effet stimulateur du NT-4/5 sur l'invasion des HUVEC.

Les cellules endothéliales sont tout d'abord prétraitées avec l'inhibiteur à large spectre des MMP GM6001 (10 μ M). Les cellules sont ensuite traitées au NT-4/5 (25 ng/ml) pendant 24 heures. Les cellules ayant traversé les membranes poreuses sont alors quantifiées. Les résultats représentent la moyenne deux expériences réalisées en triplicata. * $p < 0,01$ comparé au contrôle.

Introduction

Nous avons constaté, en outre, que les effets angiogéniques du NGF sont dus en partie à une activité du VEGF suite à la stimulation de l'expression et de la sécrétion de ce facteur. Nous avons donc vérifié une potentielle dépendance de l'effet stimulateur du NT-4/5 sur l'invasion des cellules endothéliales d'une activité du VEGF (Figure 30). Nous observons que la présence d'un anticorps anti VEGF neutralisant ne conduit à aucune diminution de l'invasion induite par le NT-4/5 contrairement au NGF, signifiant que le NT-4/5 ne dépend pas d'une action du VEGF sur l'invasion en particulier. D'autre part, il est intéressant de noter que l'effet du NT-4/5 sur l'invasion des cellules endothéliales semble être similaire à celui du NGF après neutralisation du VEGF sécrété par les cellules.

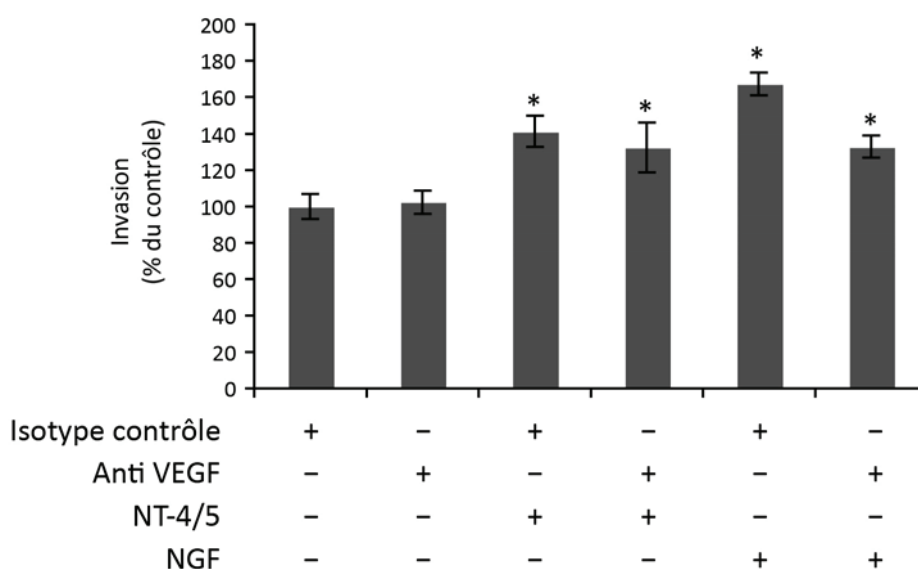


Figure 30. La stimulation de l'invasion induite par le NT-4/5 est indépendante d'une activité du VEGF.

Dans le cadre de ce test d'invasion, les cellules sont traitées pendant 24 h avec du NT-4/5 (25 ng/ml) ou au NGF (100 ng/ml) en présence de 1 µg/ml d'isotype contrôle ou 1 µg/ml d'anticorps anti VEGF neutralisant. Les cellules ayant traversé les membranes poreuses sont alors quantifiées. Les résultats représentent la moyenne de deux expériences réalisées en triplicata. * $p < 0,01$ comparé au contrôle.

Ces premiers éléments, ainsi que ce qui fut déjà démontré *in vivo* dans le modèle d'injection sous-cutanée de Matrigel chez la souris immunodéficente (Kermani *et al.*, 2005), montrent que le NT-4/5 est un stimulateur de l'angiogenèse. Malgré le caractère préliminaire et incomplet de ces travaux, nous pouvons voir que l'effet angiogénique du NT-4/5 est bien plus faible que celui du NGF ou du VEGF, et cela malgré le fait que le NT-4/5 semble activer les mêmes voies de signalisation que celles employées par le NGF ou le VEGF. Il est trop tôt

Résultats

pour donner une explication à cet état de fait, mais les résultats obtenus nous autorisent à penser que l'effet angiogène du NT-4/5 n'implique pas le VEGF.

Bien que les effets du NT-4/5 sur les HUVEC soient relativement faible comparé au NGF, l'effet angiogène du NT-4/5 mérite de plus amples investigations, compte tenu du processus complexe de l'angiogenèse tumorale.

Chapitre 4

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

Nous avons pu constater que le processus de néovascularisation revêt un caractère essentiel dans le développement tumoral et la dissémination métastatique dans les cancers, de manière générale, et dans le cancer du sein en particulier. Mes travaux de thèse m'ont permis de mettre en évidence l'importance du NGF dans l'angiogenèse du cancer du sein et d'apporter des éléments nouveaux quant aux mécanismes d'action du NGF sur les cellules endothéliales. Les résultats obtenus soulèvent de nouvelles questions et ouvrent de nouvelles perspectives que nous allons discuter dans ce chapitre.

I. Le NGF est essentiel dans l'angiogenèse du cancer du sein

I.A. Contribution essentielle du NGF dans la vascularisation tumorale

Nous avons évalué l'implication du NGF dans l'angiogenèse précoce, les expériences se déroulant sur une durée de 7 jours, induite par les cellules de cancer du sein à l'aide d'un modèle d'injection sous-cutanée de Matrigel mélangé avec des cellules de cancer du sein chez la souris immunodéficiente. Pour ces travaux, nous nous sommes appuyés sur le modèle de cellules de cancer du sein hormono-indépendantes MDA-MB-231, modèle largement caractérisé et utilisé dans différents travaux. Ces cellules, issues d'une effusion pleurale présentent l'avantage d'exprimer un phénotype cancéreux puissant 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).

Ainsi, la neutralisation du NGF à l'aide d'un anticorps neutralisant conduit à une diminution importante de l'angiogenèse induite par les cellules de cancer du sein MDA-MB-231. De plus, la puissance de ce facteur est telle que son effet angiogénique se révèle être similaire à celui du VEGF.

Ces résultats se trouvent être en adéquation avec les travaux précédemment menés au sein de notre laboratoire et auxquels j'ai d'ailleurs participé (voir annexes 2 et 3). Nous avons ainsi montré que l'inhibition du NGF à l'aide d'anticorps ou de siRNA, ainsi que l'inhibition de son récepteur TrkA chez les souris portant des xénogreffes de cellules MDA-MB-231, conduisent à une inhibition de l'angiogenèse que l'on peut qualifier de tardive (annexe 3). Inversement, la surexpression dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 du récepteur TrkA conduit à une augmentation de la vascularisation dans les xénogreffes (annexe 2).

Introduction

Cette stimulation de l'angiogenèse pourrait être due à une augmentation de la sécrétion de facteurs angiogéniques par les cellules cancéreuses suite à l'auto-activation de TrkA surexprimé et / ou à un renforcement de l'effet stimulateur du NGF. Cette hypothèse sera discutée ultérieurement.

I.B. Effet pléiotropique du NGF sur les cellules endothéliales

Nous avons également analysé les effets du NGF sur différentes étapes majeures de l'angiogenèse *in vitro*. Pour ces expériences, nous nous sommes basés sur les cellules endothéliales macrovasculaires humaines HUVEC, ces cellules étant un modèle prototypique de cellules endothéliales couramment utilisées dans les travaux sur l'angiogenèse. Nos études ont montré que le NGF exerce un effet pléiotropique important sur les cellules endothéliales HUVEC, en raison d'une stimulation importante de l'invasion et de la tubulogénèse de ces cellules. Ces résultats sont au demeurant en adéquation avec ceux obtenus par les équipes de Cantarella *et al.* (2002) et de Park *et al.* (2007). En outre, nous avons montré que le NGF peut stimuler la perméabilité de monocouches de cellules endothéliales HUVEC. Nous avons vu en introduction que la perméabilité des vaisseaux sanguins contribue, entre autres, à l'angiogenèse en prenant part à la formation d'un stroma pro-angiogénique, de lits vasculaires et à la dissémination métastatique (Dvorak *et al.*, 1999; Nagy *et al.*, 2006). Enfin, il est important de remarquer que, excepté pour la croissance et la migration, l'effet stimulateur du NGF sur l'angiogenèse *in vitro* est similaire à celui du VEGF, ce qui nous autorise à penser que le NGF est un facteur angiogénique puissant.

I.C. Mécanismes d'action du NGF dans l'angiogenèse

Au vu du caractère hautement angiogénique du NGF et de son implication cruciale dans la vascularisation tumorale dans le cancer du sein, nous avons cherché à décrypter quels étaient les principaux mécanismes mis en jeu dans la stimulation de l'angiogenèse.

Nous nous sommes intéressés, tout d'abord, aux principales voies de signalisation et aux effecteurs pouvant être impliqués dans le cadre particulier de l'invasion des cellules endothéliales stimulées par le NGF. Pour ce faire, nous avons opté pour le processus d'invasion en raison des effets stimulateurs très importants du NGF sur ce dernier, ainsi

Discussion et perspectives

qu'au caractère essentiel que revêt ce processus dans l'angiogenèse. Les résultats obtenus, présentés à la page suivante (Figure 31), sont en grande majorité en accord avec les études menées sur les cellules endothéliales HUVEC (Park *et al.*, 2007), les cellules endothéliales de la choroïde (Steinle and Granger, 2003) et sur les cellules endothéliales de l'aorte de cochon (Rahbek *et al.*, 2005). Nous avons également démontré, pour la première fois à notre connaissance, l'implication de la voie NO Synthase dans l'invasion induite par le NGF. Par contre, nous avons montré que la voie MAPK est nécessaire à la stimulation de l'invasion induite par le NGF et à l'augmentation de l'activité de la MMP-2 alors que les équipes de Park *et al.* (2007) et de Rahbek *et al.* (2005) affirment qu'il n'y a pas d'impact significatif de l'inhibition de la voie MAPK sur l'invasion et l'activation de la MMP-2 induites par le NGF. Enfin, il est intéressant de noter que, dans le cadre de l'invasion des cellules endothéliales stimulées par le NGF, les voies de signalisation que nous avons présentées comme étant nécessaires le sont également dans l'invasion induite par le VEGF, tel que cela a été décrit dans la littérature et que nous avons évoqué en introduction.

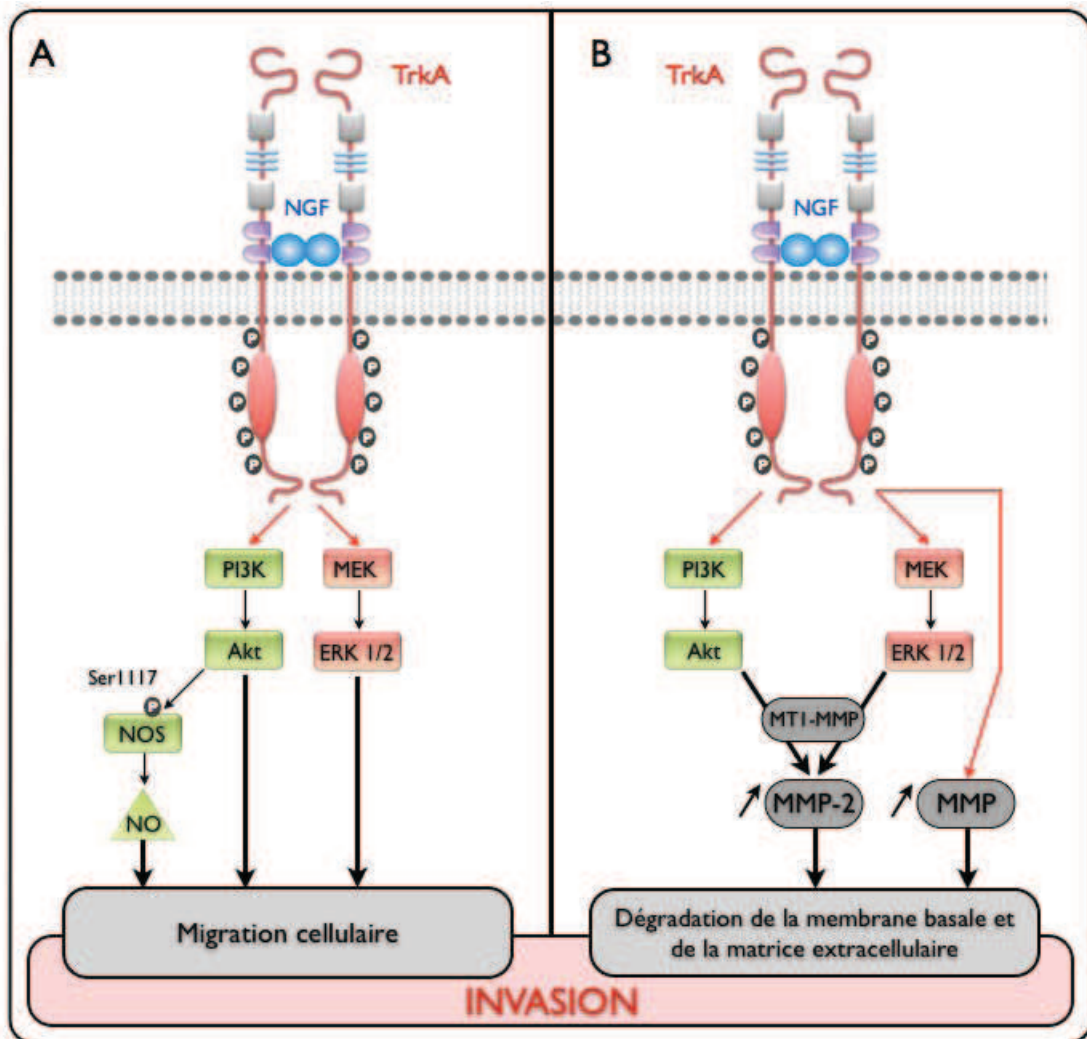


Figure 31. Voies de signalisation et effecteurs impliqués dans l'invasion stimulée par le NGF.

(A) Au cours de nos travaux, nous avons pu montrer que l'activation du récepteur TrkA ainsi que les voies de signalisation MAPK, PI3K/Akt et NO Synthase sont nécessaires à l'effet stimulateur du NGF sur l'invasion des cellules endothéliales. Concernant l'implication de la NO synthase, en particulier, son activation suite à sa phosphorylation sur la Serine 1117, signifiant qu'elle est dépendante d'Akt (Dimmeler et al., 2000; Dimmeler et al., 1999), conduit à une production massive de NO contribuant ainsi à la stimulation de l'invasion. (B) L'activité protéolytique des MMP, et tout particulièrement de la MMP-2, est vitale à la stimulation de l'invasion par le NGF, ce qui est somme toute logique si l'on prend en compte le fait que les processus d'invasion nécessitent une dégradation de la membrane basale et de la matrice via, entre autre, les MMP. Nous avons d'ailleurs montré que l'augmentation d'activité de la MMP-2 est dépendante de l'activation de TrkA et des voies de signalisation PI3K/Akt et MAPK. Enfin, cette augmentation d'activité semble être dépendante de la MT1-MMP, celle-ci étant nécessaire à la maturation de la MMP-2 (Nguyen et al., 2001). Nous avons en effet observé une absence de forme intermédiaire et mature de la MMP-2 en présence de l'inhibiteur large spectre GM6001, la littérature le décrivant comme pouvant inhiber la MT1-MMP (Cowell et al., 1998; Lee et al., 2006).

Discussion et perspectives

Nous avons décrit en introduction que le NGF peut stimulation l'expression et/ou de la sécrétion du VEGF-A, et plus particulièrement du VEGF₁₆₅ dans certains contextes tels que dans le système nerveux central (Calza *et al.*, 2001; Hansen-Algenstaedt *et al.*, 2006) ou dans le cancer de l'ovaire (Campos *et al.*, 2007), contribuant à la stimulation de l'angiogenèse induite par le NGF. Nos travaux ont permis de montrer que le NGF stimule la sécrétion du VEGF₁₆₅ par les cellules endothéliales et par les cellules de cancer du sein. De plus, Le VEGF sécrété contribue en partie à l'effet angiogénique du NGF *in vivo* et *in vitro* dans l'invasion des cellules endothéliale.

I.D. Conclusion

Mes travaux mettent en évidence le caractère essentiel du NGF dans l'angiogenèse du cancer du sein. Le NGF se révèle être un puissant facteur angiogénique pouvant stimuler différents processus essentiels à la vascularisation tumorale, telles que l'invasion, la tubulogenèse et la perméabilité. En outre, l'activité angiogénique du NGF dépend de l'activation du récepteur au NGF TrkA, des voies de signalisation PI3K/Akt, NO Synthase et MAPK ainsi que de l'activité protéolytique des MMP et plus particulièrement de la MMP-2. Enfin, nous avons montré que l'effet angiogénique du NGF est dévolu en partie à une activité du VEGF₁₆₅, puisque la neutralisation du VEGF à l'aide d'un anticorps conduit à une diminution de l'angiogenèse induite par le NGF. Ceci peut s'expliquer par le faite que le NGF augmente la sécrétion du VEGF par les cellules endothéliales et les cellules de cancer du sein.

II. Limites de nos approches expérimentales

II.A. Modèles cellulaires utilisé

L'ensemble de mes travaux a été réalisé à partir de 2 modèles cellulaires : les MDA-MB-231 pour les cellules de cancer du sein et les HUVEC pour les cellules endothéliales. Malgré le caractère prototype de ces deux modèles, il serait intéressant d'étendre notre étude à d'autres types cellulaires.

D'une part, ayant utilisé la lignée de cellules de cancer du sein hormono-indépendantes et agressives MDA-MB-231 au cours de mes travaux, il serait intéressant d'utiliser, par

Introduction

exemple, une lignée de cellules de cancer du sein hormono-dépendantes telles que les MCF-7. Cela aurait permis de confirmer les résultats obtenus sur une lignée de cellules de cancer du sein que l'on peut considérer comme étant moins agressives que les MDA-MB-231.

D'autre part, il faut se demander s'il convenait d'étendre notre étude à d'autres lignées de cellules endothéliales. Il semble y avoir en effet, selon le type de cellules endothéliales, des variations importantes en termes de réponses au NGF. Cela fut illustré par l'équipe de Steinle et al. (Steinle and Granger, 2003) qui démontra que les cellules endothéliales de la rétine ne répondent pas au NGF contrairement aux cellules endothéliales de la choroïde. En contre-partie, l'équipe de Park et al. (Park *et al.*, 2007) montra que les HUVEC et les HDMEC, cellules prototypiques des cellules endothéliales microvasculaires, ont des réponses au NGF semblables en termes de croissance, d'invasion et de tubulogenèse. Cela peut suggérer que les variations extrêmes en termes de réponses décrites précédemment ne soient que des exceptions. Il y a donc probablement un intérêt limité à répéter les expériences avec une autre lignée de cellules endothéliales « classiques », les HUVEC pouvant être considérées comme étant suffisamment « représentatives » pour permettre l'étude de l'effet pléiotropique du NGF sur les cellules endothéliales, comme nous l'avons fait.

Il peut être, par contre, beaucoup plus judicieux d'établir quels sont les effets angiogéniques du NGF sur les cellules endothéliales issues de la glande mammaire normale ainsi que sur les cellules endothéliales issues de tumeurs mammaires. Cela permettrait d'avoir une idée concrète de l'impact du NGF sur les cellules endothéliales concernées directement dans le processus d'angiogenèse dans le cancer du sein. Mais il faut avoir conscience de certaines limites et problèmes à l'utilisation de ces cellules :

- Tout d'abord, les primocultures de cellules endothéliales impliquent l'utilisation d'une quantité très importante de tissus afin de pouvoir récupérer un nombre suffisant de cellules endothéliales pour mener à bien les expériences, ces cellules ayant un potentiel prolifératif limité.
- Ensuite, il faut prendre en considération le fait qu'une partie des cellules endothéliales intratumorales peut présenter des anomalies génétiques généralement présentes chez les cellules cancéreuses, ce phénomène étant décrit par exemple dans les lymphomes, les myélomes et les leucémies (Gunsilius, 2003; Hida *et al.*, 2004; Streubel *et al.*, 2004). Plusieurs hypothèses peuvent être émises, qui pourraient

Discussion et perspectives

expliquer l'existence de ces cellules : il peut y avoir eu soit une différenciation de cellules souches cancéreuses en cellules pseudo-endothéliales (Chen *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2008), soit une transdifférenciation de cellules cancéreuses en cellules pseudo-endothéliales (Endo *et al.*, 2008), soit une fusion entre des cellules endothéliales et des cellules cancéreuses. Cela peut donc contribuer à des variations géniques importantes, constituant une source de variabilité expérimentale qu'il est nécessaire de prendre en compte lors de l'analyse des résultats.

II.B. Limites dans l'étude des mécanismes d'action du NGF

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'implication du récepteur à activité tyrosine kinase TrkA et de plusieurs voies de signalisation dans l'effet angiogénique du NGF, telles que les voies MAPK, PI3K/Akt, NO Synthase et les métalloprotéases. Il serait intéressant de déterminer les interactions entre ces différentes voies de signalisation. D'autre part, l'implication éventuelle de p75^{NTR} dans l'effet angiogénique du NGF mériterait d'être étudié.

III. Perspectives

III.A. implication des précurseurs endothéliaux dans la vascularisation tumorale induite par le NGF

Comme nous avons pu le voir précédemment, les précurseurs endothéliaux semblent revêtir une grande importance dans la vascularisation tumorale dans le cancer du sein. Par ailleurs, il a été décrit que le facteur neurotrophique BDNF permet la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques CD45⁺ Sca-1⁺ (Kermani *et al.*, 2005) et que ces cellules expriment le récepteur TrkA ainsi que le NGF (Bracci-Laudiero *et al.*, 2003). Nous pouvons, par conséquent, émettre l'hypothèse que le NGF pourrait mobiliser les précurseurs endothéliaux lors de la vascularisation tumorale.

Durant ma thèse, nous avons tenté de vérifier cette hypothèse en effectuant une quantification du recrutement des précurseurs endothéliaux présents dans le sang de souris SCID, injectées en sous-cutané avec du GFR Matrigel mélangé à du NGF. La quantification

Introduction

par cytométrie en flux a été effectuée suite à la préparation des échantillons grâce à un protocole basé sur la lyse des érythrocytes présents dans le sang total.

L'analyse des résultats obtenus nous indique qu'il y a une augmentation du nombre de cellules CD146 + en présence de NGF, ces cellules pouvant être apparentées à des cellules endothéliales circulantes. Nous avons procédé à la quantification des précurseurs endothéliaux ayant le profil suivant : CD45 - / CD146 - / CD117 + / VEGFR-2 +. Nous avons observé que le NGF, tout comme le VEGF, augmente le nombre de cellules CD45 - / CD146 + et CD45 - / VEGFR-2 +. Malheureusement, plusieurs difficultés techniques n'ont pas permis de quantifier les cellules CD117 +. On peut citer notamment un nombre insuffisant d'événements comptabilisés par échantillon, une fixation aspécifique des isotypes contrôles ou une variabilité de la qualité des échantillons.

Cependant, au vu des premiers résultats obtenus, il me semble nécessaire de poursuivre ces travaux, moyennant des mises au point supplémentaires, en effectuant une quantification des précurseurs endothéliaux chez des souris immunodéficientes portant des xénogreffes de cellules de cancer du sein traitées avec des anticorps anti-NGF neutralisants. Les résultats obtenus permettraient ainsi d'établir le degré de responsabilité du NGF dans la mobilisation des précurseurs endothéliaux et d'évaluer l'importance de cette mobilisation dans la vascularisation tumorale.

Il pourrait aussi être intéressant d'observer si le NGF, en parallèle d'une éventuelle mobilisation des précurseurs endothéliaux, serait à même d'induire la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et des cellules endothéliales précurseurs en cellules endothéliales au phénotype mature. Ce travail ambitieux nécessiterait :

- D'obtenir une source convenable de cellules souches hématopoïétiques. Une tentative de culture de cellules souches hématopoïétiques CD34 + « commerciales » (Lonza) effectuée pendant la thèse s'est révélée infructueuse. Il faut donc impérativement obtenir des échantillons biologiques frais, de sang provenant d'adultes ou de cordons ombilicaux, et effectuer l'isolement des cellules souches hématopoïétiques à l'aide de colonnes immunomagnétiques MACS (Miltenyi Biotec).
- D'établir des conditions de culture permettant de maintenir les cellules dans un état indifférencié tout en permettant leur entretien.

Discussion et perspectives

Une fois ces difficultés résolues et ces étapes franchies, la différenciation des cellules induites par le NGF serait appréciée essentiellement par cytométrie en flux et par immunocytochimie en détectant les marqueurs spécifiques de l'état de différenciation des cellules. Les outils nécessaires à ce travail ont du reste été mis au point au cours de ma thèse.

III.B. Contrôle de l'expression et de la sécrétion des facteurs angiogénique par le NGF

Mes travaux ont permis de montrer que le NGF stimule la sécrétion du VEGF₁₆₅ par les cellules endothéliales HUVEC et les cellules de cancer du sein MDA-MB-231, le VEGF₁₆₅ contribuant, en partie, à l'effet angiogénique du NGF. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que le NGF sécrété par les cellules de cancer du sein pourrait stimuler l'expression et la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques et inhiber celles des facteurs anti-angiogéniques afin de contribuer à la stimulation de l'angiogenèse induite par le NGF. Ces régulations se feraient de manière autocrine sur les cellules cancéreuses et de manière paracrine sur les cellules du stroma telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes et les adipocytes. De plus, la stimulation accrue de l'angiogenèse observée suite à la surexpression du récepteur TrkA par les cellules de cancer du sein pourrait également être expliquée par une augmentation de l'expression/sécrétion de facteurs pro-angiogéniques consécutive à cette surexpression.

Il serait donc intéressant de déterminer les modifications d'expression des facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques induites par le NGF. Des approches complémentaires basées sur les Protein Arrays, l'ELISA, les puces à ARN ainsi que la PCR en temps réel pourraient être utilisées.

III.C. Implication des autres neurotrophines dans l'angiogenèse du cancer du sein

Il a été observé au sein du laboratoire que les cellules de cancer du sein produisent d'autres neurotrophines que le NGF, tels que le NT-4/5 et le BDNF. Par ailleurs, ces neurotrophines ont été décrites comme étant angiogènes *in vitro* ou *in vivo*. Il serait donc important de déterminer leur contribution dans l'angiogenèse du cancer du sein.

Chapitre 5

Annexes

La maîtrise des différentes techniques et approches expérimentales employées au cours ma thèse m'a permis de participer à d'autres travaux réalisés au sein du laboratoire. Ces différents travaux ont abouti à la publication de 4 articles présentés ci-après en annexe, dont un où je suis co-premier auteur.

Annexe 1

**Ku86 is important for TrkA overexpression-
induced breast cancer cell invasion**

Ku86 is important for TrkA overexpression-induced breast cancer cell invasion

Chann Lagadec^{1*}, Rodrigue Romon^{1*}, Christophe Tastet¹, Samuel Meignan¹,
Emmanuelle Com¹, Adeline Page², Gabriel Bidaux³, Hubert Hondermarck¹ and Xuefen Le
Bourhis¹

¹INSERM U908, "Signalisation des facteurs de croissance dans le cancer du sein.
Proteomique fonctionnelle", IFR-147, Université Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France

²Centre Commun de Mesure de Spectrométrie de Masse, IFR-147, Université Lille 1,
Villeneuve d'Ascq, France

³INSERM U800, "Laboratoire de Physiologie Cellulaire", IFR-147, Université Lille 1,
Villeneuve d'Ascq, France

* The authors contributed equally to this work.

Correspondence: Professor H. Hondermarck, INSERM U908, Batiment SN3, Université
Lille 1, 59655, Villeneuve d'Ascq, France

E-mail : hubert.hondermarck@univ-lille1.fr

Fax: +33-3-20-43-40-38

Abbreviations: **RPLP0**, human acidic ribosomal phosphoprotein P0; **siRNA**, small-
interfering RNA; **TRAIL**, TNF-related apoptosis inducing ligand

Keywords: breast cancer / Ku proteins / cell invasion / TrkA tyrosine kinase receptor

Abstract

The Trk family of neurotrophin tyrosine kinase receptors is emerging as an important player in carcinogenic progression of non neuronal tissues. We have recently shown that breast tumors express high levels of TrkA compared to normal breast tissues, with TrkA overexpression enhancing breast cancer cell invasion *in vitro* and metastasis in animal models. Here we used a proteomic-based approach to identify proteins involved in TrkA overexpression-stimulated invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells. Proteins from control and TrkA overexpressing cells were separated using a cup-loading two-dimensional electrophoresis system before MALDI and LC-MS/MS mass spectrometry analysis. Among several putative regulated proteins, Ku86 was found increased in TrkA overexpressing cells. Moreover, Ku86 was co-immunoprecipitated with TrkA, suggesting the interaction of these two proteins in TrkA overexpressing cells. Interestingly, inhibition with small-interfering RNA and neutralizing antibodies showed that Ku86 was required for TrkA-stimulated cell invasion. Together, these data allowed the identification of Ku86 as a new player involved in metastasis of breast cancer cells.

1 Introduction

Several sets of growth factors and their cognate receptors are known to be involved in the regulation of cancer development [1-4]. Nerve growth factor (NGF) is the prototypic member of the neurotrophin family of proteins, well known for promoting survival and differentiation of neuronal cells during nervous system development. However, accumulating data indicate that NGF is also involved in cancer development [5-7]. NGF exerts its effects through two membrane receptors: the tyrosine kinase receptor TrkA and the receptor p75^{NTR}, a common receptor for all neurotrophins and pro-neurotrophins. NGF binding to TrkA induces TrkA receptor dimerisation and autophosphorylation of cytoplasmic tyrosines, leading to the activation of various signaling pathways, including the Ras/MAPK pathway, the PLC γ pathway, and the PI3K/Akt pathway [7]. The biological consequences of TrkA activation vary according to cell types. Hence, TrkA activation induces differentiation of neuronal precursors and neuroblastoma cells [8], whereas it induces proliferation in breast adenocarcinoma cells [9, 10] and apoptosis in medulloblastoma cells [11].

Recently, we have shown that NGF and its tyrosine kinase receptor TrkA are overexpressed in breast cancers compared to normal breast tissues [12, 13]. Inhibition of NGF with neutralizing antibodies or small interfering RNA strongly reduces tumor growth and metastasis of breast cancer cells xenografted in immunodeficient mice [12]. Moreover, TrkA overexpression in breast cancer cells leads to a constitutive activation of its tyrosine kinase, resulting in an increased cell growth and tumorigenicity [13]. Together, these findings point out the importance of the NGF/TrkA axis in breast cancer development. In addition, upregulation of TrkA has also been shown in other cancers including thyroid [14], lung [15], pancreatic [16, 17], prostatic [18, 19] and ovarian carcinomas [20, 21]. Thus, identification of molecules involved in the enhancement of aggressiveness of TrkA

overexpressing cancer cells would be important for both better understanding of oncogenesis and research of new molecular targets. Here, we have used a functional proteomic approach to identify molecules involved in TrkA-mediated biological effects in breast cancer cells. We first separated proteins of total lysate using a cup-loading two-dimensional electrophoresis (2D) system and then identified a series of putative modified proteins by MALDI and LC-MS/MS mass spectrometry analysis. We found that Ku86, initially described to form a heterodimer with ku70 to regulate DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) that is crucial to DNA repair, was upregulated in TrkA overexpressing cells. Moreover, Ku 86 was required for TrkA-stimulated invasion of breast cancer cells.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Cell culture reagents were purchased from Bio-Whittaker (Emerainville, France). Recombinant NGF was from R&D systems (Lille, France). Nucleofection reagents were from Amaxa Biosystems (Lonza, Cologne, Germany). Dynabeads protein A and protein G were obtained from Dynal Biotech (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Electrophoresis reagents, bicinchoninic acid reagents, protease inhibitor cocktail and rabbit polyclonal anti-actin antibody were from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Sequencing grade-modified trypsin was provided by Promega (Charbonnieres, France). ZipTip_{C18} pipette tips were obtained from Millipore (Molsheim, France). The monoclonal anti-Ku86 for immunofluorescence (S5C11) and neutralizing antibodies Anti-Ku70 (clone N3H10) and anti-Ku86 (clone 111 or S10B1) were purchased from Thermo Scientific (Courtaboeuf, France). For Western blotting, the polyclonal anti-Ku70 (AHP316), the monoclonal anti-Ku86 and the polyclonal anti-actin were purchased from AbD Serotec (Düsseldorf, Germany), GeneTex (Euromedex, Mundolsheim, France) and Sigma, respectively. The rabbit polyclonal anti-TrkA IgG, as well as irrelevant IgG, were from Upstate-Millipore. Peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG and goat anti-mouse IgG were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc (Suffolk, UK). SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate was from Pierce (Thermo Scientific). Lab-Tek chamber slides and Boyden chamber (8 mm) were obtained from Nalge Nunc International (Roskilde, Denmark). Alexa Fluor dyes-conjugated secondary antibodies were from Invitrogen. siRNA were purchased from Eurogentec (Angers, France).

2.2 Cell Culture

The MDA-MB-231 human breast cancer cell line was from the American Type Culture Collection. MDA-MB-231 TrkA overexpressing cells were stably transfected and

characterized in our laboratory [13]. Cells were routinely maintained in EMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 10% fetal calf serum (FCS), 40 U/ml penicillin-streptomycin, 40 µg/ml gentamycin. All cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

2.3 Protein extraction, separation and identification

2.3.1 Sample preparation and 2D electrophoresis

Protein extraction was performed as previously described [22]. Isoelectric focusing was carried out using 18 cm Immobiline DryStrips pH 3-10 (GE Healthcare Bio-Sciences). IPG strips were reswollen overnight in 345 µl DeStreak (hydroxyethyl disulfide, GE Healthcare Bio-Sciences) rehydration solution and 0.2% (v/v) carrier ampholytes 3-10 (Bio-Lyte® ; Bio-Rad), under 2 ml mineral oil. Prior to IEF, protein samples (150 µg) were first reduced (1 h) by adding tributylphosphine (TBP) to a final concentration of 5 mM and secondly alkylated in the dark with 15 mM iodoacetamide for 90 min at room temperature. The samples were then cup-loaded near the anode of the IPG strips and focused in a Protean IEF cell (Bio-Rad) at a temperature of 20 °C. The IPG strips were initially conditioned for 30 min at 250 V (rapid voltage ramping), linearly ramped to 1,000 V (1 h) and maintained at 1,000 V for 1 h more. Then the electric voltage was slowly increased to reach 10 000 V in 1 h and focused at this voltage to give a total of 60 kVh. After focusing, the strips were equilibrated for 2 x 15 min in 6 M Urea, 30% w/v glycerol, 2% w/v SDS, 0.125 M Tris, 0.1 M HCl, containing either 50 mM DTT (first equilibration step) or 150 mM iodoacetamide (second equilibration step) [23]. Second-dimension electrophoresis (SDS-PAGE) was performed as previously reported [24]. The gel patterns were visualized by silver nitrate staining [25] for analytical purposes or by colloidal CBB G-250 [26] in the case of micropreparative separations.

2.3.2 2D gel evaluation

Digitized images of 2D gels were acquired by scanning with a GS-800 calibrated densitometer under control of PDQuest Advanced software version 8.0 (Bio-Rad), which was also used for image analysis and construction of a local 2D database. Image alignment, spot detection, background removal and expression analysis were performed using PDQuest Advance software. Fold changes and all statistical analysis were calculated based on normalized spot volumes where the global spots volume was used to perform normalization. A total of three gels per protein extraction and 3 extractions from independent experiments were made (9 gels in total per condition) for the study.

2.3.3 Immunoprecipitation and SDS-PAGE

Cells were harvested by scraping in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM sodium orthovanadate and protease inhibitor cocktail) as previously described [27]. Lysat (5 mg of proteins) was firstly precleared using an isotype rabbit IgG (R&D system). TrkA and interacting proteins were then co-immunoprecipitated using 25 µg of anti-TrkA antibody (Upstate) and Dynabeads protein A according to manufacturer's instructions. Immunoprecipitated proteins were eluted in Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol and 0.002% bromophenol blue) and boiled 5 min before analysis on 10% polyacrylamide gels. For staining, SDS-polyacrylamide gels were fixed overnight in solution containing 50% ethanol and 1.4% orthophosphoric acid. After 3 washes for 30 min in MilliQ water, gels were incubated in impregnation solution (1.3 M ammonium sulfate, 34% methanol, 1.4% orthophosphoric acid) for 1 h and placed in staining solution (1.3 M ammonium sulfate, 34% methanol, 1.4% orthophosphoric acid, 0.07% Coomassie Brilliant Blue G250) for 24 h. Finally, gels were destained with several washes of MilliQ water until the background was clear.

2.3.4 In gel trypsin digestion and protein identification by mass spectrometry

Coomassie blue-stained protein bands were excised from SDS-PAGE gel and processed for trypsin digestion as previously described [27]. Protein identification was realized using both MALDI-TOF (Voyager DE STR instrument, Applied Biosystems) and NanoLC-NanoESI-MS/MS (LCQ Deca XP+, Thermo-electron, San Jose, CA) as previously described [27]. Database searching was done with SwissProt 56.8 (410,518 sequences; 148,080,998 residues). Carbamidomethylation of cysteine was set as fixed modification, oxidation of methionine was set as a variable modification for all MASCOT searches. To ascertain unambiguous identification, searches were performed in parallel with Phenyx software using the same parameters.

2.4 Immunoassays

2.4.1 Western blot

After 2D electrophoresis or SDS-PAGE separation, proteins were electro-transferred onto nitrocellulose membrane using a semi-dry transfer system (Trans-Blot SD cell, Bio Rad). Non specific protein binding sites were saturated for 1 h 30 at room temperature in TBS-0.1% Tween-20 reagent (TBST) containing either 5% BSA for Ku70, ku86 and actin immunodetection. Membranes were then incubated overnight at 4°C with 1:5000 anti-Ku70, 1:500 anti-Ku86, 1:500 anti-TrkA or 1:5000 anti-actin antibodies. After washes in TBST, peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG diluted in saturated solution was added for 1 h at room temperature and the membranes were washed several times in TBST before detection of peroxidase activity using chemiluminescent system.

2.4.2 Flow cytometry

Cells detached by Trypsin-EDTA solution were incubated for 1 h at 4°C with 20 µg/ml of the indicated antibodies or matched control isotypes at similar concentrations. After

washing with PBS containing 0.5% BSA, cells were incubated for 30 min at 4°C with secondary fluorescein-labelled IgG. Cells were then analyzed in Coulter Epics XL/XL-MCI cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France).

2.4.3 Immunocytochemistry and confocal microscopy

MDA-MB-231 cells were seeded on Lab-tek chamber slides precoated with type I collagen. Cells were washed in PBS pH 7.5, fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min. Non specific protein binding sites were then blocked in PBS pH 7.5 containing 2% BSA and cells were incubated in blocking solution containing 10 µg/ml rabbit anti-TrkA and 10 µg/ml mouse anti-Ku70 or anti-Ku86 antibodies overnight at 4°C. After washes in PBS pH 7.5, 10 µg/ml Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG and 10 µg/ml Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG were added for 1 h at 37°C. Cells were washed in PBS pH-7.5 and mounted. Scanning fluorescence images were acquired using a Zeiss Axiophot microscope.

2.5 Real Time PCR (RT-PCR)

RNA extraction and real time PCR amplifications were performed as previously described [27]. The primers used were as following : 5'-CCCCAATTCAGCAGCATATT-3' and 5'-CCTTCAGCCAGACTGGAGAC-3' for Ku86, 5'-AAAAGACTGGGCTCCTTGGT-3' and 5'-TGTGGGTCTTCAGCTCCTCT-3' for Ku70, 5-GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT-3 and 5-GATGACCAGCCCAAAGGAGA-3 for RPLP0 (human acidic ribosomal phosphoprotein P0), which was used as a reference gene. The amplification was performed during 40 cycles (95 °C for 20 sec, at 55 °C for 30 sec, and at 72 °C for 30 sec). Data were analyzed using the MX4000 PCR system software (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) with the SYBRGreen option (with dissociation curves).

2.6 siRNA transfection

MDA-MB-231 cells (2×10^6) were transiently transfected with 3 μg of siKu70 and/or siKu86 using the nucleofection technology (Amaxa Biosystems) according to manufacturer's instructions. Sequences of 5'-GAUGCCCUUUACUGAAAAA-3' and 5'-UUUUUCAGUAAAGGGCAU-3' were used as sense and antisense for siKu70, 5'-CCAGGUUCUCAACAGGCUG-3' and 5'-CAGCCUGUUGAGAACCUGG-3' were used as sense and antisense for siKu86. siRNA against GFP (sense 5'-GCUGACCCUGAAGUUCAU-3', antisense 5'-GAUGAACUUCAGGGUCAG-3') were used as control. Twenty-four hours after transfection, cells were seeded for the evaluation of apoptosis induction or invasion.

2.7 Invasion assay

BD Falcon inserts with a PET membrane/ 6.5 μm pores (BD Biosciences) were used for invasion assay. The inserts were pre-coated with GFR Matrigel (1:10 dilution, BD Biosciences). Cells (5×10^4) were seeded on polycarbonate membrane insert and maintained in EMEM containing 0.1% FCS. For antibody neutralization, cells were pre-treated with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of neutralizing antibodies against Ku70 and Ku86 during 30 min before seeding. After 16 h of culture, 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 invaded the Matrigel and migrated to the bottom surface of the insert were fixed with methanol, stained by Hoechst 33258 and then counted on 10 random fields at 200 magnification under a Nikon Eclipse Ti-U fluorescent microscope.

2.8 Apoptosis analysis

Cells were treated with 5 ng/ml TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) for 6 h. Apoptosis was determined by morphological analysis after fixation with methanol (10 min, -

20°C) and staining with 1 µg/ml Hoechst 33258 (10 min, room temperature, in the dark). A minimum of 500-1000 cells was examined for each case under fluorescent microscope and the results represented the number of apoptotic cells over the total number of counted cells.

2.9 Statistical analysis

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

3 Results

3.1 Ku86 is upregulated in breast cancer cells overexpressing TrkA

Proteins of mock and TrkA overexpressing MDA-MB-231 cells were separated by 2D electrophoresis before analysis of protein spots with PDquest software. A representative example of proteins separated on 2D-gel is shown in Figure 1A. Nearly 1500 spots were obtained in the ranges of MW 12-120 kDa and pI 3-10. In TrkA overexpressing cells, more than 20 spots were found to be down- or upregulated (at least 2-fold changes with $p < 0.05$) after analysis with PDquest software. Proteins were identified by MALDI-TOF and LC-MS/MS. Among a dozen of differentially expressed proteins which remain to be validated, a significant increase of Ku86 protein was observed in TrkA overexpressing cells. Interestingly, Ku86 was found as a set of four close spots in empty vector transfected cells (mock) and TrkA overexpressing cells (Fig. 1B). MALDI-TOF spectrum showed 25 experimental tryptic peptides that matched to theoretical masses, leading to 32.5% sequence coverage with an average error mass of 0.034 Da (Fig. 1C, Table 1A). This identification was consolidated by independent MS/MS analysis of corresponding spot from 2D gel, as sequencing of five peptides revealed 8% sequence coverage with an average error mass of 0.295 Da (Fig. 1D and E, Table 1B). Importantly, Western blotting analysis also showed a similar increase of Ku86 in TrkA overexpressing cells (Fig. 2A and B), thus validating the 2D electrophoresis and mass spectrometry analysis. However, real time PCR showed no modification of Ku86 mRNA level (Fig. 2C), indicating that Ku86 upregulation is post-translationally controlled.

3.2 Ku 86 is co-immunoprecipitated with TrkA

Ku 86 and ku70 can be associated to form a heterodimeric regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) that is crucial to DNA repair [28]. Ku proteins are also

reported to be involved in cell proliferation, migration and invasion [29]. More recently, we have shown that Ku70 interacts with TrkA in MCF-7 breast cancer cells to stimulate cell survival in TRAIL-induced apoptosis [27]. To determine if TrkA interacts with Ku proteins in MDA-MB-231 TrkA overexpressing cells, we identified TrkA co-immunoprecipitated proteins by mass spectrometry LC-MS/MS. Both Ku86 and Ku70 were found to be immunoprecipitated with TrkA. Identification of Ku86 was made based on the sequencing of 3 peptides (556.88; 689.45; 690.88) (Fig. 3A and B), with a Mascot score of 208 and 4 % coverage (blanket). On the other hand, 2 peptides corresponding to Ku70 were also sequenced (586.71 and 568.63), with a Mascot score of 48 and 3 % of coverage (Fig. 3C). Moreover, Western blot confirmed the presence of both Ku86 and ku70 in TrkA co-immunoprecipitated proteins (Fig.3D) but not in isotype IgG co-immunoprecipitated proteins (data not shown), suggesting the specific association of Ku proteins to TrkA.

3.3 Membrane Ku86 and Ku70 are increased in TrkA overexpressing cells

Increased levels of Ku86 in TrkA overexpressing cells as well as the association of Ku proteins with TrkA prompted us to determine the levels of membrane Ku proteins by flow cytometry analysis. As shown in Fig. 4A and B, an increase of membrane Ku86 and Ku70 was observed in TrkA overexpressing cells compared to empty vector transfected cells. We then analysed subcellular distribution of these proteins in TrkA overexpressing cells by confocal microscopy after immunochemical staining (Fig. 4C). TrkA (blue fluorescence) and Ku proteins (green fluorescence) seemed to be mainly located in the nucleus and cytoplasmic membrane, though a faint and punctuate staining was also observed in the cytoplasm.

3.4 Ku86 is involved in TrkA-induced cell invasion

We have previously shown that TrkA overexpression leads to an increase in invasion and survival of breast cancer cells [13]. To determine whether Ku proteins were implicated in

TrkA-overexpression-induced biological effects, we inhibited Ku proteins by siRNA or neutralizing antibodies. As shown in Fig. 5A, specific siRNAs strongly decreased the expression of Ku86 and Ku70. Inhibition of Ku86 with both siRNA and the neutralizing antibody efficiently reduced invasion of TrkA overexpressing cells, while inhibition of Ku70 had no effect (Fig. 5B and C). Interestingly, simultaneous inhibition of both Ku86 and Ku70 reduced cell invasion at a similar degree to that observed upon Ku86 inhibition alone. We then evaluated if Ku proteins could regulate apoptosis induction in TrkA overexpressing cells. For this, we transfected cells with siKu and then treated them with TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), a cytokine well known for apoptosis induction in breast cancer cells. As shown in Fig. 5D, siKu86 had no effect on apoptosis of cells whatever TRAIL treatment. In contrast, siKu70 induced apoptosis even in the absence of TRAIL and could further increase apoptosis induction by TRAIL, confirming our previous finding in MCF-7 breast cancer cells [27]. When cells were co-transfected with siKu86 and siKu70, no significant difference was observed compared to siKu70 alone-transfected cells. All together, these results indicated that Ku proteins functioned independently of each other to mediate TrkA overexpression-induced biological effects: Ku86 was only involved in cell invasion while Ku70 was implicated in cell survival.

4 Discussion

We have previously shown that TrkA overexpression increases breast cancer cell growth, invasion, as well as survival. In order to understand the underlying mechanisms, we have used a functional proteomic approach to identify molecules involved in the TrkA-mediated biological effects. We first separated proteins using 2D electrophoresis system and then identified a series of putative modified proteins in TrkA overexpressing cells by MALDI and LC-MS/MS mass spectrometry analysis. The cup-loading technology reduces the inter-experimental variations, allowing rapid identification of protein changes between samples on reproducible 2D gels [30]. Among a dozen of differentially expressed proteins, which remain to be validated, we observed a significant increase of Ku86 in TrkA overexpressing cells, as revealed by direct quantification of corresponding spots in 2D gels and Western blot analysis. This is of particular interest, as we have recently identified another member of the Ku family of proteins, namely Ku70, as a partner of TrkA signaling in breast cancer cells [27]. Indeed, we have shown that NGF treatment induces tyrosine phosphorylation of Ku70 upon its association to TrkA. Moreover, Ku70 is involved in TrkA-enhanced cell survival [27]. Here, we only found that Ku86 was upregulated in TrkA overexpressing cells, although both ku70 and ku86 were co-immunoprecipitated with TrkA. Visualisation of Ku86 as four close spots in 2D gels may be due to post-translational modifications, as Ku proteins have been described to be acetylated and phosphorylated [27, 31, 32]. In spite of the increase of protein levels, we were not able to observe any significant variation of Ku86 mRNA level by real time PCR, suggesting a mechanism of regulation at post-transcriptional level. Reinforcing this hypothesis, it has been recently described that VEGF can activate AKT which in turn inhibits Ku70 proteolysis by phosphorylating Hdm2, the ubiquitin ligase of Ku70 [33]. Thus, further studies will be needed to examine the exact underlying mechanism of Ku86 upregulation in our model. The fact that Ku86 was

upregulated in TrkA overexpressing breast cancer cells is in line with previous demonstration that Ku86 is expressed in abundant levels in tissues with a high proliferative index or in cells stimulated to proliferate [34, 35]. Moreover, upregulation of Ku proteins has been associated with the progression of some types of tumors. For instance, the levels of Ku86 are positively correlated with that of anti-apoptotic Bcl-2 in B cell chronic lymphocytic leukemia [36]. Ku86 has also been reported to be upregulated in bladder, breast and primary hepatocellular carcinomas, compared to adjacent non tumorous tissues [37-39].

Ku86 and Ku70 are mainly localized in the nucleus, where they form heterodimers to recruit the catalytic subunit of DNA dependent protein kinase (DNA-PKcs), which is involved in multiple biological processes such as DNA double-strand break repair, telomere length maintenance, cell cycle progression and transcriptional regulation [32, 40]. However, cytosolic and membrane Ku proteins are increasingly reported to exert different functions independently of each other. Cytosolic Ku70 has been shown to bind to the pro-apoptotic protein Bax and inhibit Bax-mediated apoptosis by preventing its translocation to mitochondria. This anti-apoptotic function is mediated by a domain in the carboxy-terminal of Ku70 and does not require the cooperative effects of Ku86 [41]. Accordingly, here we showed that Ku70 but not Ku86 was involved in the increased survival of TrkA overexpressing breast cancer cells. On the other hand, membrane Ku proteins have been reported to be associated with cell adhesion and migration [42, 43]. It has been shown that hypoxia-stimulated invasion of neuroblastoma and breast carcinoma cells involves upregulation of membrane Ku86 [44]. Similarly, Ku proteins are found to interact with matrix metalloproteinase 9 at the membrane of highly invasive normal and tumoral hematopoietic cells [45]. Translocation of Ku proteins from the nucleus to the plasma membrane can enhance migration of monocytes [46]. In this study, we found an increase of membrane Ku86 and Ku70 in TrkA overexpressing cells. Moreover, inhibition of Ku86

with siRNA or neutralizing antibodies strongly reduced TrkA-stimulated invasion, indicating that Ku86, especially membrane Ku86, was involved in this process. Our previous work shows that activation of signalling pathways including PI3/AKT and MAP kinases is required for TrkA overexpression-enhanced cell invasion and survival [13]; here we showed that Ku86 was involved in TrkA-overexpression-stimulated cell invasion while Ku70 was only implicated in TrkA-overexpression-enhanced cell survival. Thus, it will be interesting to determine the link between classical signaling pathways and the specific implication of Ku proteins in these processes.

In conclusion, we showed by functional proteomic exploration that Ku86 is upregulated in TrkA overexpressing breast cancer cells and is involved in TrkA-induced cell invasion. Therefore, upregulation of Ku86 in tumor cells overexpressing TrkA might be a mechanism leading to an increase of metastasis. Although further *in vitro* and *in vivo* investigations will be required to test this hypothesis, these data reveal Ku86 as a new potential player in the intracellular signalling leading to breast cancer cell metastasis.

Acknowledgments

Grant support: INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2009), le Ministère de l'Education Nationale and la Région Nord-Pas-de-Calais.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Chan, S. K., Hill, M. E., Gullick, W. J., The role of the epidermal growth factor receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2006, *11*, 3-11.
- [2] Chang, C. F., Westbrook, R., Ma, J., Cao, D., Transforming growth factor-beta signaling in breast cancer. *Front Biosci* 2007, *12*, 4393-4401.
- [3] Mercurio, A. M., Lipscomb, E. A., Bachelder, R. E., Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005, *10*, 283-290.
- [4] Roussidis, A. E., Theocharis, A. D., Tzanakakis, G. N., Karamanos, N. K., The importance of c-Kit and PDGF receptors as potential targets for molecular therapy in breast cancer. *Curr Med Chem* 2007, *14*, 735-743.
- [5] Papatsoris, A. G., Liolitsa, D., Deliveliotis, C., Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2007, *16*, 303-309.
- [6] Nakagawara, A., Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 2001, *169*, 107-114.
- [7] Dolle, L., Adriaenssens, E., El Yazidi-Belkoura, I., Le Bourhis, X., *et al.*, Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2004, *4*, 463-470.
- [8] Schramm, A., Schulte, J. H., Astrahantseff, K., Apostolov, O., *et al.*, Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2005, *228*, 143-153.
- [9] Descamps, S., Lebourhis, X., Delehedde, M., Boilly, B., Hondermarck, H., Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 1998, *273*, 16659-16662.
- [10] Descamps, S., Toillon, R. A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., *et al.*, Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 2001, *276*, 17864-17870.
- [11] Ohta, T., Watanabe, T., Katayama, Y., Kurihara, J., *et al.*, TrkA expression is associated with an elevated level of apoptosis in classic medulloblastomas. *Neuropathology* 2006, *26*, 170-177.
- [12] Adriaenssens, E., Vanhecke, E., Saule, P., Mougel, A., *et al.*, Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 2008, *68*, 346-351.
- [13] Lagadec, C., Meignan, S., Adriaenssens, E., Foveau, B., *et al.*, TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* 2009.
- [14] McGregor, L. M., McCune, B. K., Graff, J. R., McDowell, P. R., *et al.*, Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, *96*, 4540-4545.
- [15] Ricci, A., Greco, S., Mariotta, S., Felici, L., *et al.*, Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, *25*, 439-446.
- [16] Friess, H., Zhu, Z. W., di Mola, F. F., Kulli, C., *et al.*, Nerve growth factor and its high-affinity receptor in chronic pancreatitis. *Ann Surg* 1999, *230*, 615-624.
- [17] Zhu, Z., Friess, H., diMola, F. F., Zimmermann, A., *et al.*, Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 1999, *17*, 2419-2428.
- [18] Weeraratna, A. T., Arnold, J. T., George, D. J., DeMarzo, A., Isaacs, J. T., Rational basis for Trk inhibition therapy for prostate cancer. *Prostate* 2000, *45*, 140-148.
- [19] Miknyoczki, S. J., Wan, W., Chang, H., Dobrzanski, P., *et al.*, 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* 2002, *8*, 1924-1931.

- [20] Campos, X., Munoz, Y., Selman, A., Yazigi, R., *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*, 168-175.
- [21] Davidson, B., Reich, R., Lazarovici, P., Nesland, J. M., *et al.*, Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003, *9*, 2248-2259.
- [22] Chevillet, M., Tastet, C., Luche, S., Rabilloud, T., Preparing protein extracts for quantitative two-dimensional gel comparison. *Curr Protoc Protein Sci* 2004, *Chapter 22*, Unit 22 24.
- [23] Gorg, A., Postel, W., Gunther, S., Weser, J., *et al.*, Approach to stationary two-dimensional pattern: influence of focusing time and immobiline/carrier ampholytes concentrations. *Electrophoresis* 1988, *9*, 37-46.
- [24] Tastet, C., Lescuyer, P., Diemer, H., Luche, S., *et al.*, A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins. *Electrophoresis* 2003, *24*, 1787-1794.
- [25] Sinha, P., Poland, J., Schnolzer, M., Rabilloud, T., A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2001, *1*, 835-840.
- [26] Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988, *9*, 255-262.
- [27] Com, E., Lagadec, C., Page, A., El Yazidi-Belkoura, I., *et al.*, Nerve growth factor receptor TrkA signaling in breast cancer cells involves KU70 to prevent apoptosis. *Mol Cell Proteomics* 2007.
- [28] Collis, S. J., DeWeese, T. L., Jeggo, P. A., Parker, A. R., The life and death of DNA-PK. *Oncogene* 2005, *24*, 949-961.
- [29] Muller, C., Paupert, J., Monferran, S., Salles, B., The double life of the Ku protein: facing the DNA breaks and the extracellular environment. *Cell Cycle* 2005, *4*, 438-441.
- [30] Lamberti, C., Pessione, E., Giuffrida, M.G., Mazzoli, R., Barello, C., Conti, A., Giunta, C., Combined cup loading, bis(2-hydroxyethyl) disulfide, and protein precipitation protocols to improve the alkaline proteome of *Lactobacillus hilgardii*. *Electrophoresis* 2007, *28*, 1633-1638.
- [31] Cohen, H. Y., Lavu, S., Bitterman, K. J., Hekking, B., *et al.*, Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2004, *13*, 627-638.
- [32] Morio, T., Kim, H., Ku, Artemis, and ataxia-telangiectasia-mutated: signalling networks in DNA damage. *Int J Biochem Cell Biol* 2008, *40*, 598-603.
- [33] Gama, V., Gomez, J. A., Mayo, L. D., Jackson, M. W., *et al.*, Hdm2 is a ubiquitin ligase of Ku70-Akt promotes cell survival by inhibiting Hdm2-dependent Ku70 destabilization. *Cell Death Differ* 2009, *16*, 758-769.
- [34] Yaneva, M., Jhiang, S., Expression of the Ku protein during cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1991, *1090*, 181-187.
- [35] Cai, Q. Q., Plet, A., Imbert, J., Lafage-Pochitaloff, M., *et al.*, Chromosomal location and expression of the genes coding for Ku p70 and p80 in human cell lines and normal tissues. *Cytogenet Cell Genet* 1994, *65*, 221-227.
- [36] Klein, A., Miera, O., Bauer, O., Golfier, S., Schriever, F., Chemosensitivity of B cell chronic lymphocytic leukemia and correlated expression of proteins regulating apoptosis, cell cycle and DNA repair. *Leukemia* 2000, *14*, 40-46.

- [37] Pucci, S., Mazzearelli, P., Rabitti, C., Giai, M., *et al.*, Tumor specific modulation of KU70/80 DNA binding activity in breast and bladder human tumor biopsies. *Oncogene* 2001, 20, 739-747.
- [38] Luk, J. M., Su, Y. C., Lam, S. C., Lee, C. K., *et al.*, Proteomic identification of Ku70/Ku80 autoantigen recognized by monoclonal antibody against hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2005, 5, 1980-1986.
- [39] Seimiya, M., Tomonaga, T., Matsushita, K., Sunaga, M., *et al.*, Identification of novel immunohistochemical tumor markers for primary hepatocellular carcinoma; clathrin heavy chain and formiminotransferase cyclodeaminase. *Hepatology* 2008, 48, 519-530.
- [40] Mahaney, B. L., Meek, K., Lees-Miller, S. P., Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* 2009, 417, 639-650.
- [41] Sawada, M., Hayes, P., Matsuyama, S., Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nat Cell Biol* 2003, 5, 352-357.
- [42] Lynch, E. M., Moreland, R. B., Ginis, I., Perrine, S. P., Faller, D. V., Hypoxia-activated ligand HAL-1/13 is lupus autoantigen Ku80 and mediates lymphoid cell adhesion in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, 280, C897-911.
- [43] Tai, Y. T., Podar, K., Kraeft, S. K., Wang, F., *et al.*, Translocation of Ku86/Ku70 to the multiple myeloma cell membrane: functional implications. *Exp Hematol* 2002, 30, 212-220.
- [44] Ginis, I., Faller, D. V., Hypoxia affects tumor cell invasiveness in vitro: the role of hypoxia-activated ligand HAL1/13 (Ku86 autoantigen). *Cancer Lett* 2000, 154, 163-174.
- [45] Monferran, S., Paupert, J., Dauvillier, S., Salles, B., Muller, C., The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *Embo J* 2004, 23, 3758-3768.
- [46] Paupert, J., Dauvillier, S., Salles, B., Muller, C., Transport of the leaderless protein Ku on the cell surface of activated monocytes regulates their migratory abilities. *EMBO Rep* 2007, 8, 583-588.

Table 1A. Ku86 identification with MALDI-TOF. Spots indicated in Figure 1 were cut out of the gel and digested with trypsin before MALDI-TOF analysis. Mascot search program was used to identify proteins. The table lists all the 25 peptides identified by MALDI-TOF. The underlined peptides are also identified by nanoLC-nanoESI-MS/MS.

Position	Corresponding peptide sequences	Observed precursor <i>m/z</i>	Theoretical precursor neutral mass	Delta mass (Da)
36-44	KVITMFVQR (Ox)	1136.64	1136.64	0.00
37-44	VITMFVQR	992.59	992.55	0.04
131-141	HIEIFDLSSR	1316.69	1316.67	0.02
172-184	EDGSGDRGDGPFR	1363.61	1363.58	0.03
185-195	LGGHGSPFPLK	1108.63	1108.60	0.03
196-209	GITEQQKEGLEIVK	1570.87	1570.86	0.01
243-250	HSIHWPCR (Carb)	1091.59	1091.51	0.08
251-260	LTIGSNLSIR	1072.66	1072.62	0.04
275-282	TWTVVDAK	918.49	918.48	0.01
287-307	EDIQKETVYCLNDDDETEVLK	2498.20	2498.14	0.06
316-325	<u>YGSDIVPFSK</u>	1111.57	1111.56	0.01
316-332	YGSDIVPFSKVDEEQMK (Ox)	1986.94	1986.92	0.02
354-363	RFFMGNQVLK (Ox)	1254.70	1254.65	0.05
355-363	<u>FFMGNQVLK</u> (Ox)	1098.57	1098.55	0.02
401-413	ANPQVGVAFPHIK	1376.79	1376.76	0.03
432-439	QYMFSSLK (Ox)	1018.52	1018.48	0.04
444-465	YAPTEAQLNAVDALIDSM SLAK (Ox)	2336.09	2336.16	-0.07
470-481	<u>TDTLEDLFPTTK</u>	1379.73	1379.68	0.05
487-497	FQRLFQCLLHR (Carb)	1516.76	1516.81	-0.05
490-497	LFQCLLHR (Carb)	1085.61	1085.58	0.03
533-543	IKTLFPLIEAK	1271.78	1271.79	-0.01
535-543	<u>TLFPLIEAK</u>	1030.60	1030.61	-0.01
546-565	<u>DQVTAQEIFQDNHEDGPTAK</u>	2242.04	2242.01	0.03
641-648	AFREEAIK	962.54	962.52	0.02
709-732	DKPSGD TAAVFEEGDVDDLDMI (Ox)	2524.04	2524.12	-0.08

Table 1B. Ku86 identification with NanoLC-nanoESI-MS/MS. Spots indicated in Figure 1 were cut out of the gel and digested with trypsin before nanoLC-nanoESI-MS/MS. Mascot search program was used to identify proteins. The table lists the 5 identified peptides.

Position	Corresponding peptide sequences	Observed precursor <i>m/z</i>	Theoretical mass	Delta mass (Da)	Score
316-325	YGSDIVPFSK	1111.96	1111.56	0.40	45
355-363	FFMGNQVLK	1082.83	1082.56	0.27	42
470-481	TDTLEDLFPTTK	1380.05	1379.68	0.37	90
535-543	TLFPLIEAK	1031.25	1030.61	0.64	45
546-565	DQVTAQEIFQDNHEDGPTAK	2242.49	2242.01	0.48	21

Figure 1. Detection of Ku86 up-regulation in TrkA overexpressing cells. (A), a representative 2D gel image after silver staining. The arrow indicates spots corresponding to Ku86. (B), zoomed regions of Ku86 spots. (C) MALDI-TOF spectrum of tryptic digest for Ku86 identification. (D) A tandem mass spectrum of the doubly-charged ion at m/z 1031.24. The bold letters indicate the detected b and y ions matching the predicted ion mass in the database. (E) Peptides sequenced by LC-MS-MS (underlined). The detected fragments (**bold letters**) by MALDI-TOF are also indicated in the sequence of full-length of Ku86.

C

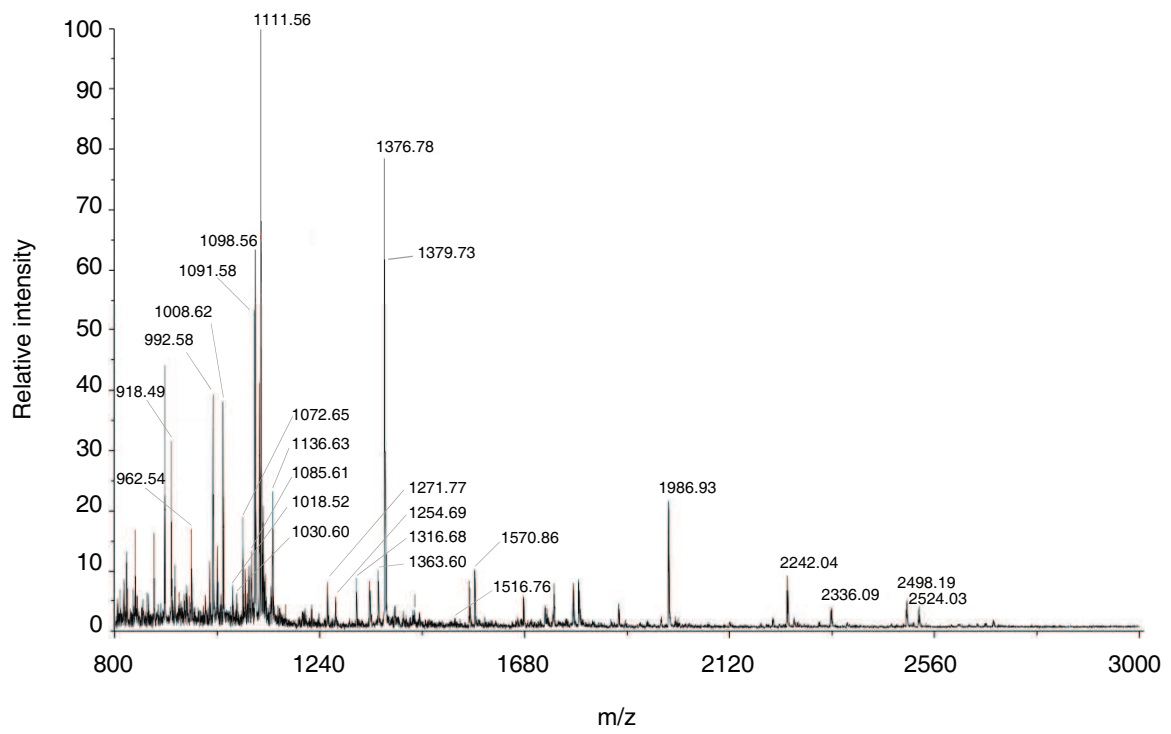
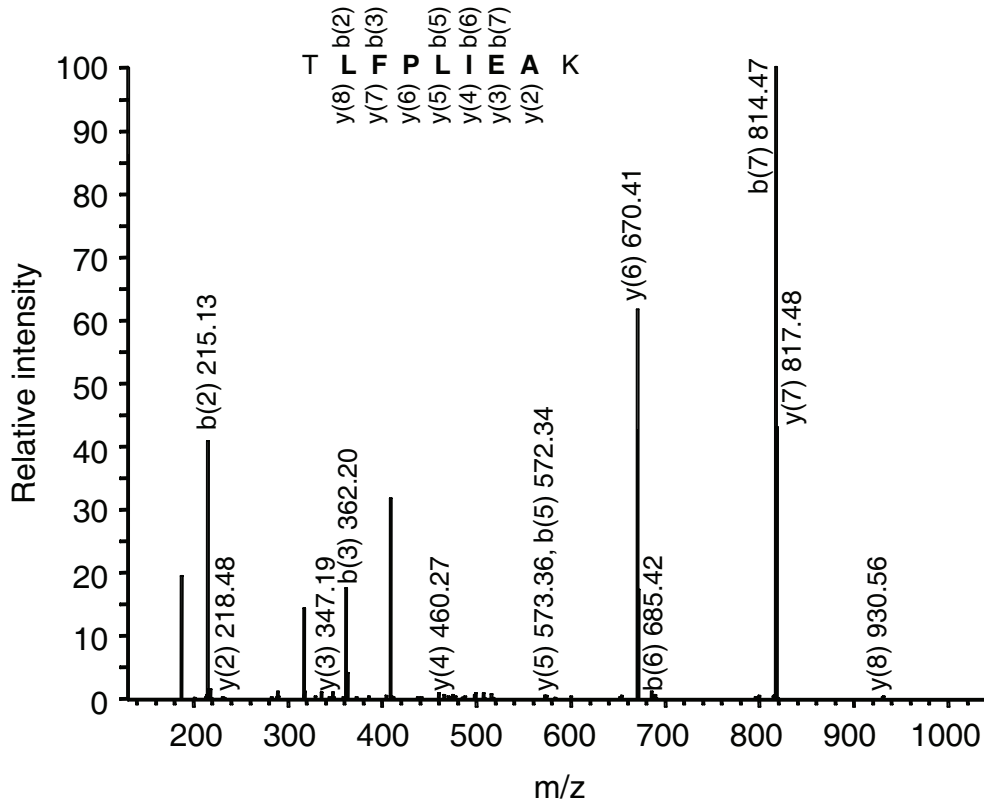


Figure 1C

Lagadec et al.

D



E

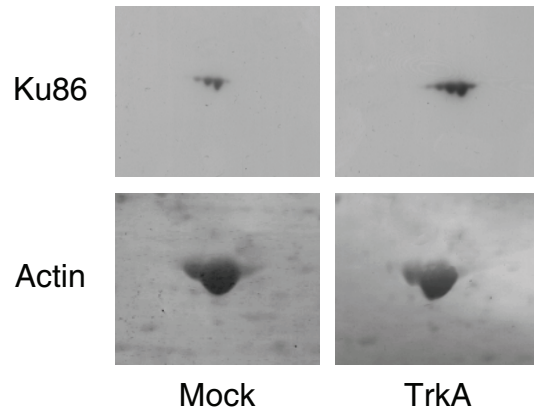
MVRSGNKA AV VLCMDVGFTM SNSIPGIESP FEQAK**KVITM** **FVQR**QVFAEN
KDEIALV LFG TDGTDNPLSG GDQYQNITVH RHLMLPDFDL LEDIESKIQP
GSQQADFLDA LIVSMDVIQH ETIGKKFEKR **HIEIF**TDLSS **RFSKS**QLDII
IHSLKKCDIS LQFFLPFSLG KEDGSGDRGD **GPFR**LGGHGP **SFPLK**GITEQ
QKEGLEIVKM VMISLEGEDG LDEIYSFSES LRKLCVFKKI **ERHSI**HWPCR
LTIGSNLSIR IAAYKSILQE RVKKT**TWTV**VD **AKTL**KKEDIQ KETVYCLNDD
DETEVLKEDI IQGFR**YGSDI** **VPFSK**VDEEQ **MKYK**SEGKCF **SVLGF**CKSSQ
VQRR**FFMGNQ** **VLK**VFAARD EAAVALSSL IHALDDLDMV AIVRYAYDKR
ANPQVGVAFP **HIKH**NYECLV YVQLPFMEDL **RQYMF**SSLKN SKKYAPTEAQ
LNAVDALIDS **MSLAK**KDEKT **DTLED**LFPTT **KIPN**PRFQRL **FQCL**LHRALH
PREPLPPIQQ HIWNMLNPPA EVTTKSQIPL **SKIK**TLFPLI **EAKK**KDQVTA
QEIFQDNHED **GPTAK**KLKTE QGGAHFSVSS LAEGSVTSVG SVNPAENFRV
LVKQKKASFE EASNQLINHI EQFLDTNETP YFMKSIDCIR **AFRE**EAIKFS
EEQRFNNFLK ALQEKVEIKQ LNHFWEIVVQ DGITLITKEE ASGSSVTAAE
AKKFLAPKDK **PSGD**TAAVFE **EGGD**VDDLLD **MI**

Figure 1D and E

Lagadec et al.

Figure 2. Analysis of Ku86 expression by Western blot and real time PCR. (A) Western blotting. Proteins (200 µg) were separated in 2D gel and Western blots were performed using an anti-Ku86 antibody. Actin was used to confirm the loading and transfer of equal amounts of protein. (B) Relative levels of Ku86. Quantification was performed by densitometry of spots revealed after Western blot. Values were normalized with actin. Results are the mean of 3 independent experiments. (C) Real time PCR detection of Ku86 mRNA. RPLP0 (human acidic ribosomal phosphoprotein P0) was used as a reference gene.

A



B

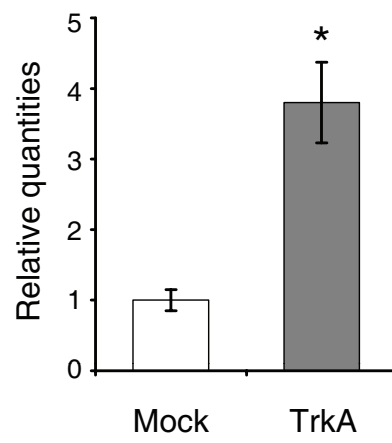


Figure 2A and B

Lagadec et al.

C

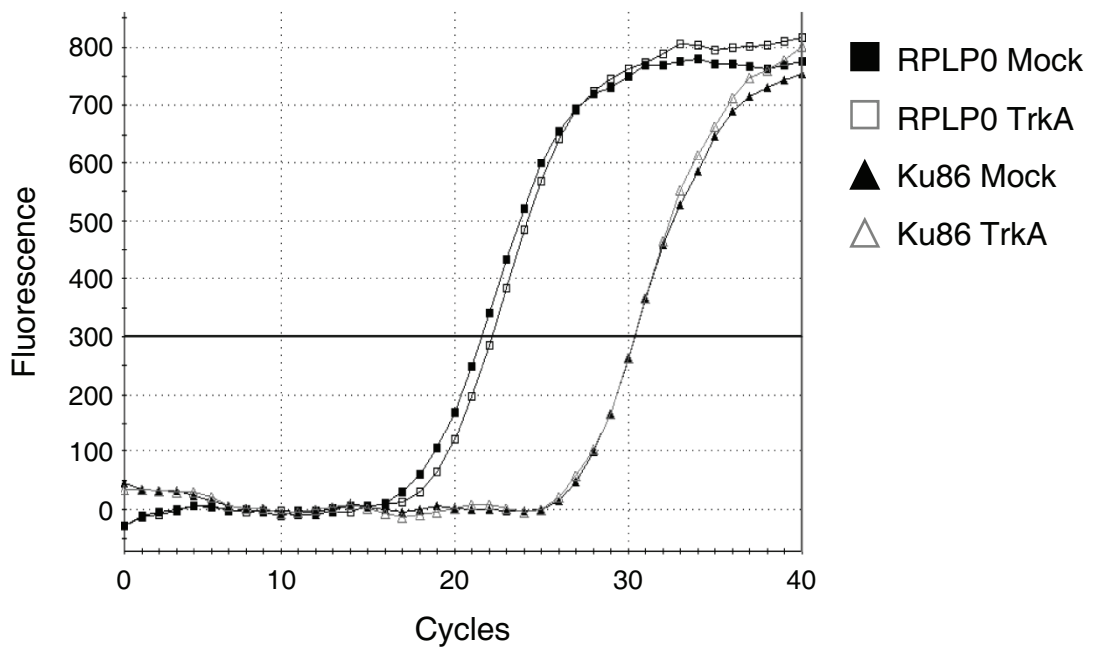
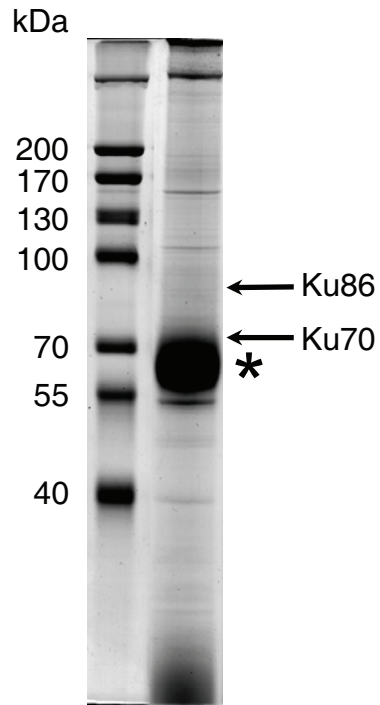


Figure 2C

Lagadec et al.

Figure 3. Identification of Ku proteins after TrkA immunoprecipitation. Lysates from TrkA overexpressing cells were subjected to TrkA immunoprecipitation and the eluates were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel. (A) SDS-polyacrylamide gel after staining with colloidal Coomassie blue. Arrows indicate positions of Ku86 and Ku70 on the gel, Asterisk indicates IgG. (B and C) Tandem mass spectra of the doubly charged ions at m/z 1111.74 for Ku86 and at m/z 1171.71 for Ku70 are indicated. The bold letters indicate the detected b and y ions matching the predicted ion mass in the database. (D) Western blot of TrkA co-immunoprecipitated Ku proteins. Lysates from TrkA overexpressing cells were immunoprecipitated with an anti-TrkA antibody. Co-immunoprecipitated proteins were subjected to immunoblot (IB) with anti-TrkA, -Ku86 and -Ku70.

A



B

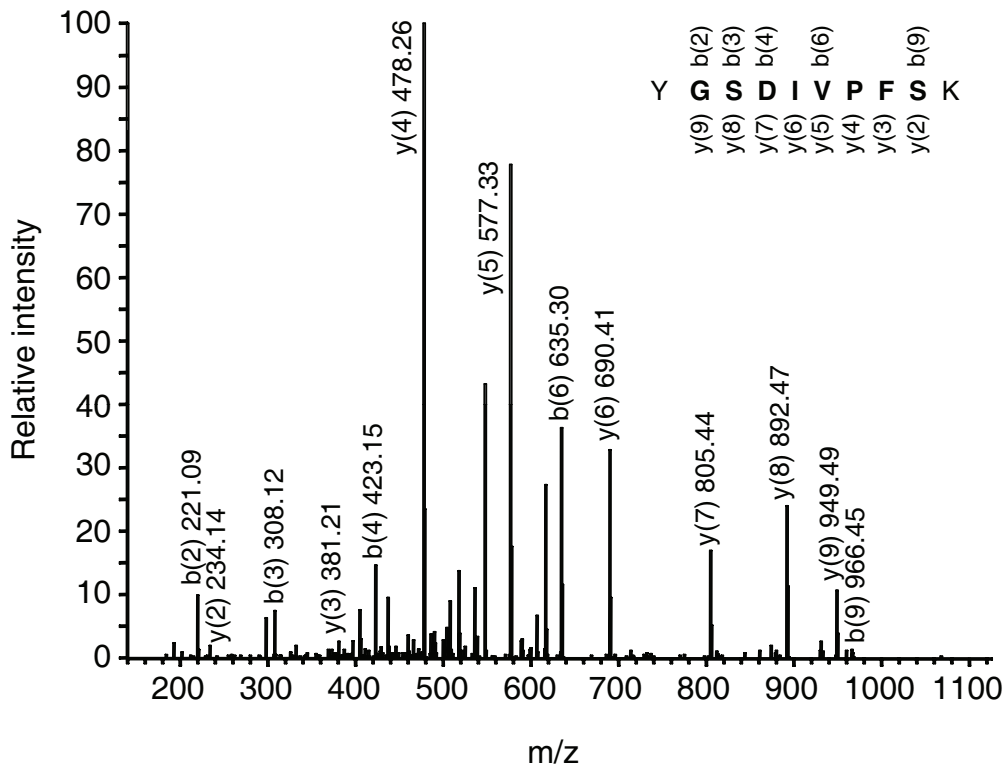
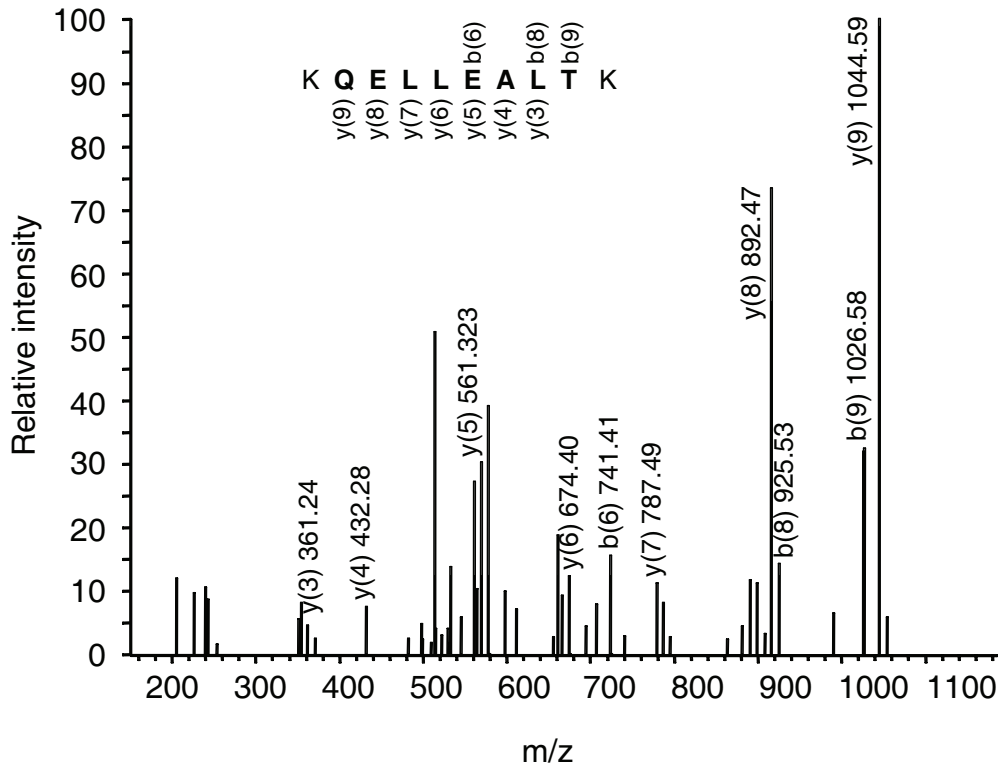


Figure 3A and B

Lagadec et al.

C



D

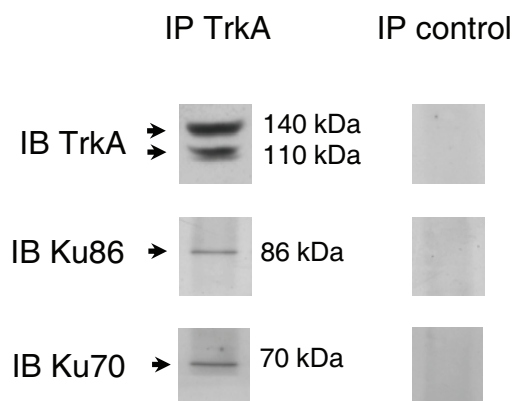
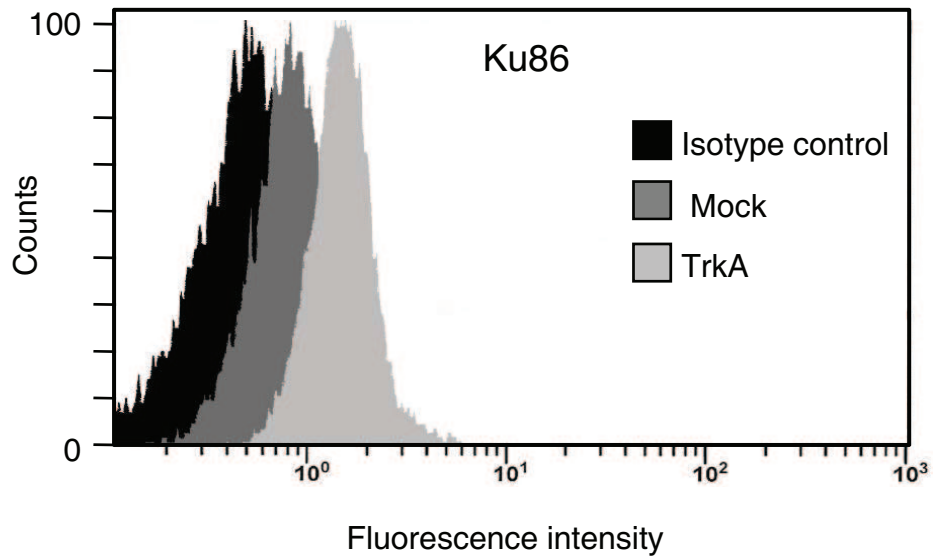


Figure 3C and D

Lagadec et al.

Figure 4. Immuno-detection of Ku proteins on whole cells. (A and B) Detection of membrane Ku proteins by flow cytometry. Mixed empty vector transfected cells (mock) and TrkA-overexpressing cells were incubated with isotype antibody to establish isotype control. Results are representative of 3 separate experiments carried out in duplicate. (C) Immunofluorescent staining of TrkA and Ku proteins. Subcellular distribution of TrkA and Ku proteins was observed under confocal microscopy after immunostaining. Blue, TrkA; Green, Ku-86 or Ku70.

A



B

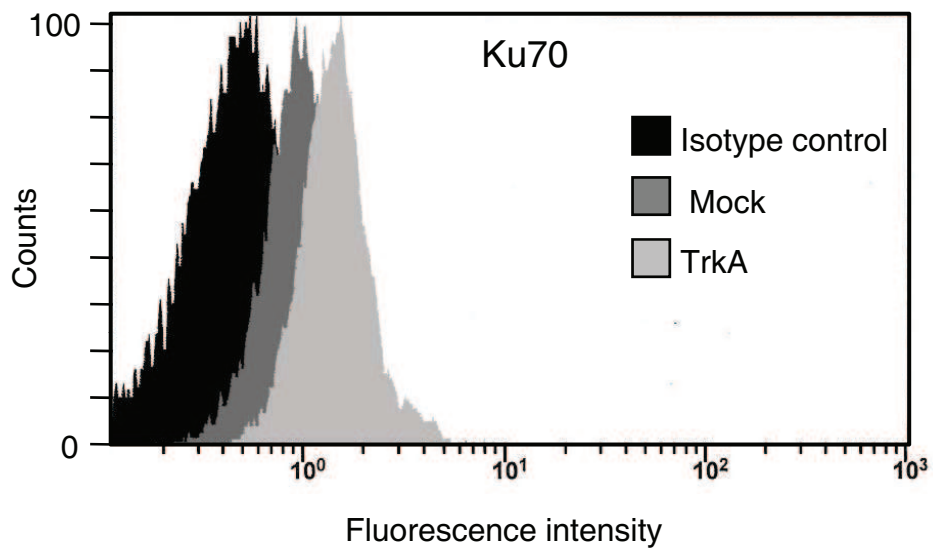


Figure 4A and B

Lagadec et al.

C

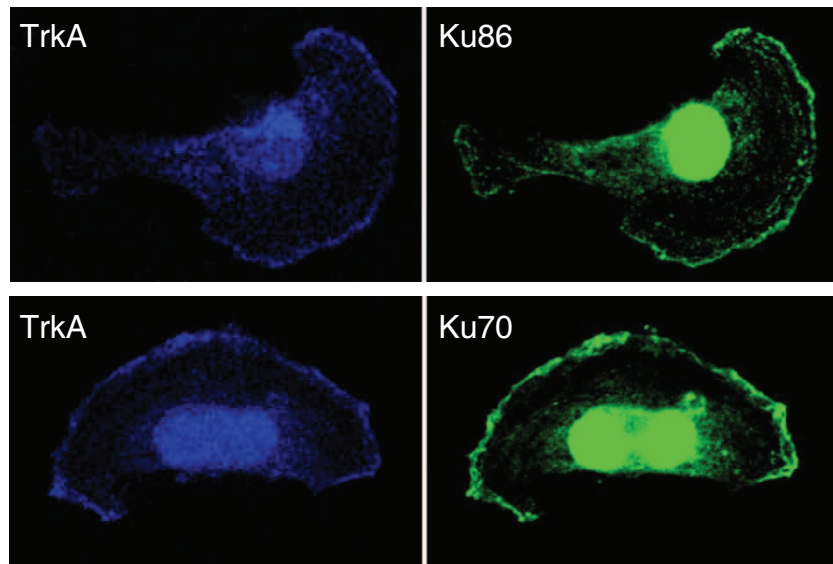


Figure 4C

Lagadec et al.

Figure 5. Involvement of Ku proteins in TrkA-stimulated invasion and survival. (A) Western blot analysis of Ku proteins after siRNA transfection. MDA-MB-231 TrkA overexpressing cells were transiently transfected with siKu86 and/or siKu70, siGFP (Green Fluorescence Protein) was used as control. (B and C) Invasion assay. TrkA overexpressing cells were transfected with siKu (B) or pretreated with neutralizing antibodies for 30 min at 37°C (C) and then cultured for 16 h in Transwells before counting of invading cells. (D) Apoptosis detection. TrkA overexpressing cells were transfected with siKu and then treated with TRAIL (5 ng/ml) for 6 h. Apoptosis was assessed after Hoechst staining. *, $p < 0.01$, siKu70 and siKu86 transfected cells versus siGFP transfected cells, or anti-Ku86 and anti-Ku70 treated cells versus Isotype control antibody treated cells.

A

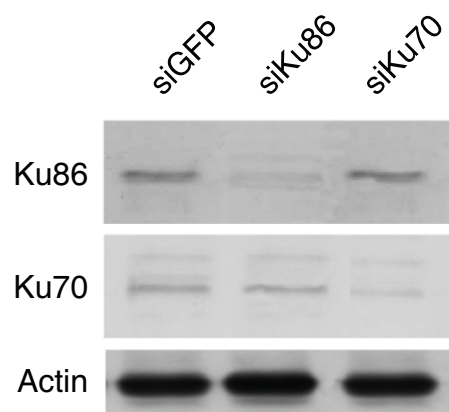
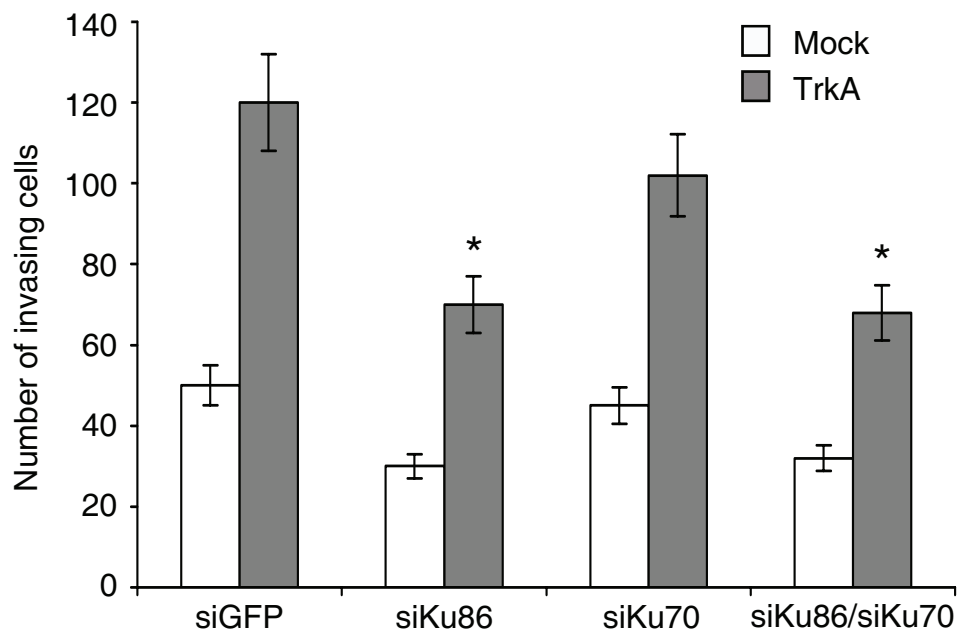


Figure 5A

Lagadec et al.

B



C

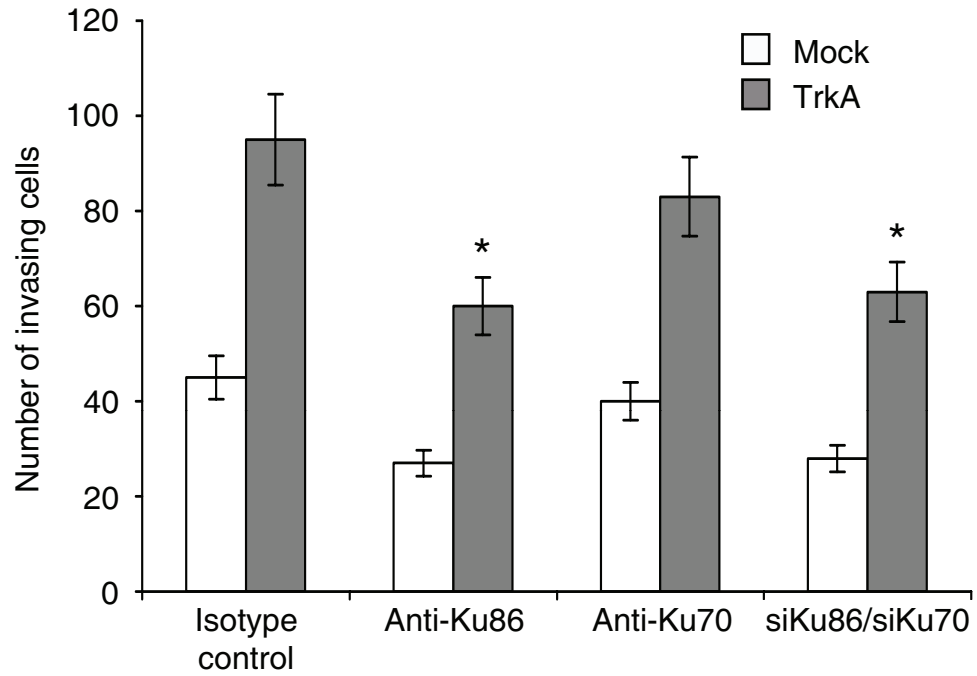


Figure 5B and C

Lagadec et al.

D

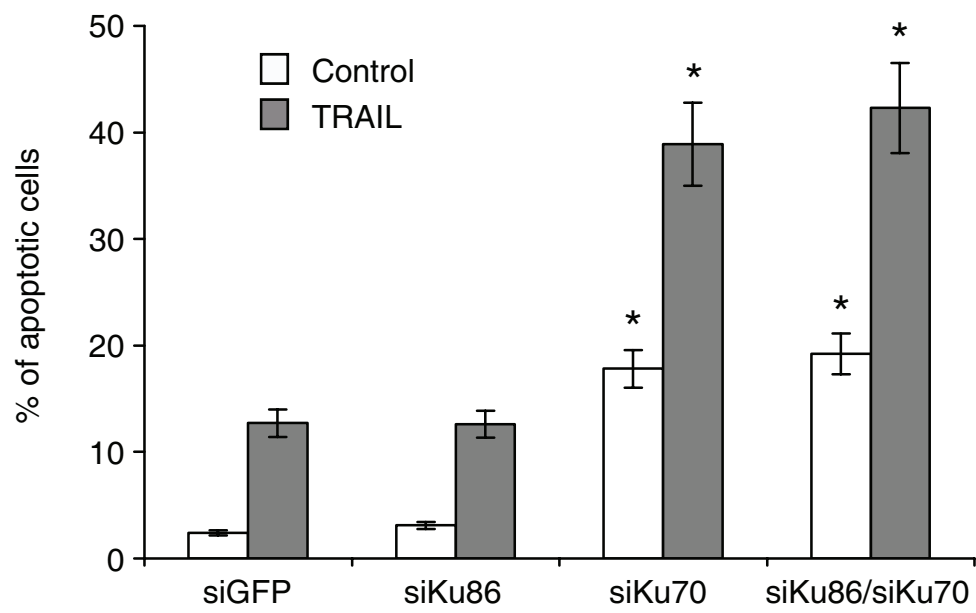


Figure 5D

Lagadec et al.

Annexe 2

**TrkA overexpression enhances growth and
metastasis of breast cancer cells**

ORIGINAL ARTICLE

TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cellsC Lagadec¹, S Meignan¹, E Adriaenssens, B Foveau, E Vanhecke, R Romon, R-A Toillon, B Oxombre, H Hondermarck and X Le Bourhis

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

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 functions of TrkA overexpression in breast cancer development, we have performed a series of biological tests using breast cancer cells that stably overexpress TrkA. We show that (1) TrkA overexpression promoted cell growth, migration and invasion *in vitro*; (2) overexpression of TrkA *per se* conferred constitutive activation of its tyrosine kinase activity; (3) 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; and (4) 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 that 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.

Oncogene advance online publication, 30 March 2009; doi:10.1038/onc.2009.61

Keywords: neurotrophins; tyrosine kinase receptors; anoikis

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 because 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 hormone therapy, 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).

Correspondence: Professor X Le Bourhis, INSERM U908, IFR-147, Université Lille 1, Bâtiment SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. E-mail: xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr

¹These authors contributed equally to this work.

Received 27 November 2008; revised 1 February 2009; accepted 26 February 2009

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, pTrkA) 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 pTrkA 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 pTrkA

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 those in normal samples. The high level of TrkA expression in breast tumor biopsies was further confirmed by western blot analysis (Figure 1b). Moreover, pTrkA was detected in the majority of cancer biopsies, whereas 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; Figures 1a and b). Moreover, PCR analysis showed that only the TrkAI isoform is expressed in breast cancer cell lines (data not shown), so to determine the functional importance of TrkA overexpression in breast cancer development, we established TrkAI 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 two 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, more TrkA overexpressing cells were found to migrate 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 (Figures 2e and f). TrkA overexpressing cells could survive and proliferate as large spheroid aggregates in suspension, resulting in a twofold 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 whereas mock cells underwent rapidly cell death. Morphological analysis after Hoechst staining revealed that after 72 h of culture, more than 60% of mock cells were apoptotic whereas less than 5% of TrkA overexpressing cells were apoptotic (data not shown). 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 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (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. Although we have previously shown that NGF can stimulate the growth of breast cancer cells both *in vitro* and *in vivo* by 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.

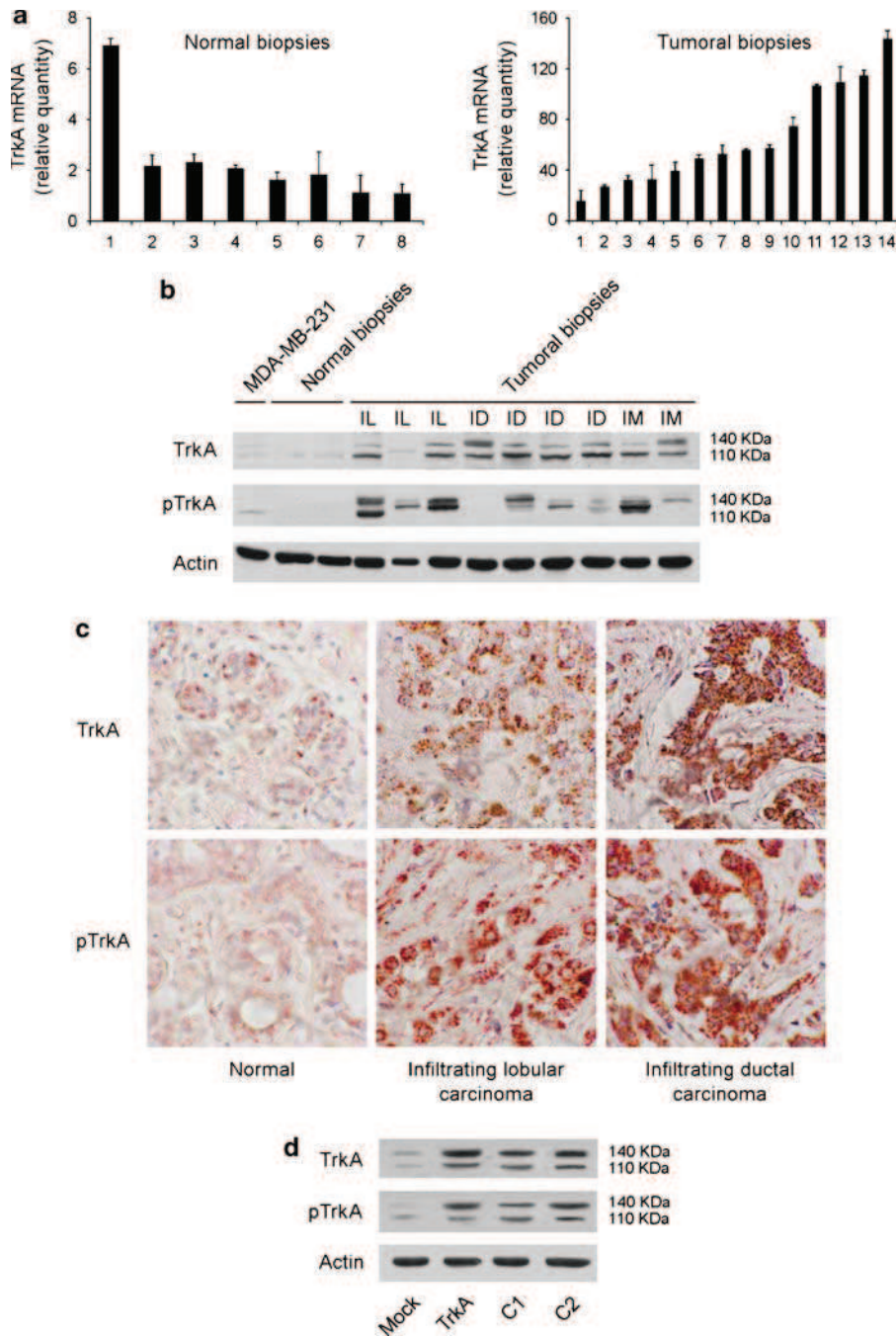


Figure 1 Detection of TrkA and phospho-TrkA (pTrkA) in breast biopsies and MDA-MB-231 breast cancer cells. **(a)** Quantitative PCR detection of TrkA mRNA in breast biopsies. Eight normal breast tissues and 14 tumor biopsies (mainly infiltrating ductal carcinomas) were used. Levels of TrkA mRNA in individual samples are expressed as relative quantity compared to those 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 TrkA1 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.

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 mitogen-activated protein (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).

Table 1 Relative quantification of immunostaining of TrkA and pTrkA in breast tissue arrays

Breast samples	TrkA							pTrkA						
	Score				Mean	s.d.	P-value	Score				Mean	s.d.	P-value
	0	1	2	3				0	1	2	3			
Normal tissues (<i>n</i> = 10)	6	4	0	0	0.40	0.48		5	5	0	0	0.50	0.50	
Tumoral tissues (<i>n</i> = 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 section.

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 (Figures 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 function of PI3K-Akt 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 severe combined immunodeficiency (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 after 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 that 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 terminal transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay, immunostaining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and von Willebrand factor (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 twofold 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

To evaluate metastasis *in vivo*, we generated MDA-MB-231 cells (overexpressing TrkA or not) stably expressing green fluorescent protein (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 (Figures 5a and b; Supplementary Figure 5). More and bigger metastatic foci were found in the lungs, liver and brain of mice that received TrkA overexpressing cells (Figure 5a). Quantification of GFP-positive cells using fluorescence-activated cell sorting (FACS) showed that TrkA overexpression induced two- and threefold increase in the metastatic burden in lungs 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 metastases 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. After 8 weeks, the mice were killed 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).

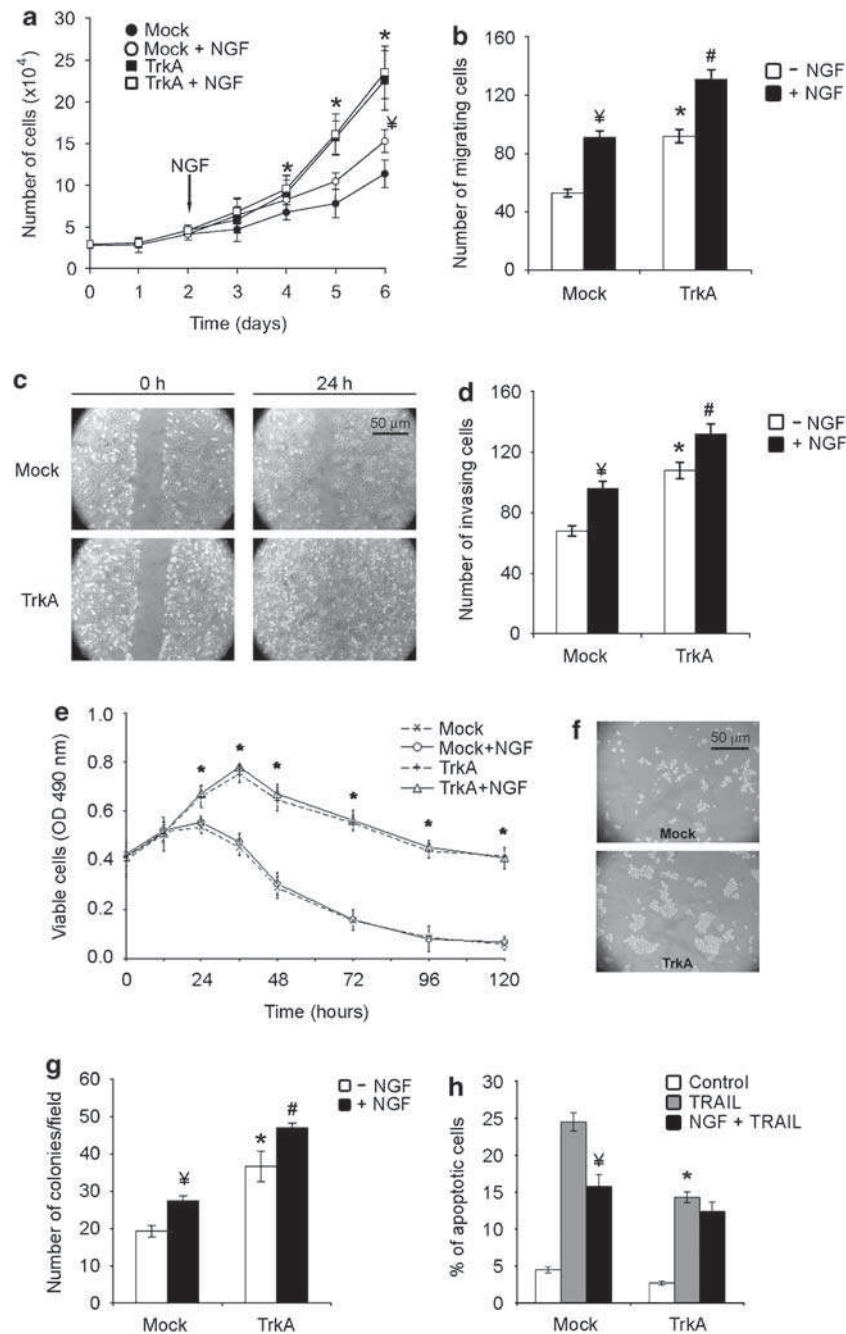


Figure 2 Pleiotropic *in vitro* effects of TrkA overexpression. **(a)** Growth assay on standard culture plastic was performed for various periods of time. **(b)** Migration assay (6 h) using Transwells. **(c)** Representative photographs of wound-healing assay in the presence of nerve growth factor (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 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). All results are the mean of at least three independent experiments each in triplicate. * $P < 0.01$, TrkA overexpressing versus mock cells; $^{\#}P < 0.01$, NGF-treated versus NGF-untreated mock cells; $^{\#}P < 0.01$, NGF-treated versus NGF-untreated TrkA overexpressing cells.

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

To get insight into the mechanisms of TrkA-driven metastasis, we isolated and cultured TrkA overexpressing cells derived from the lungs of nine animals 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

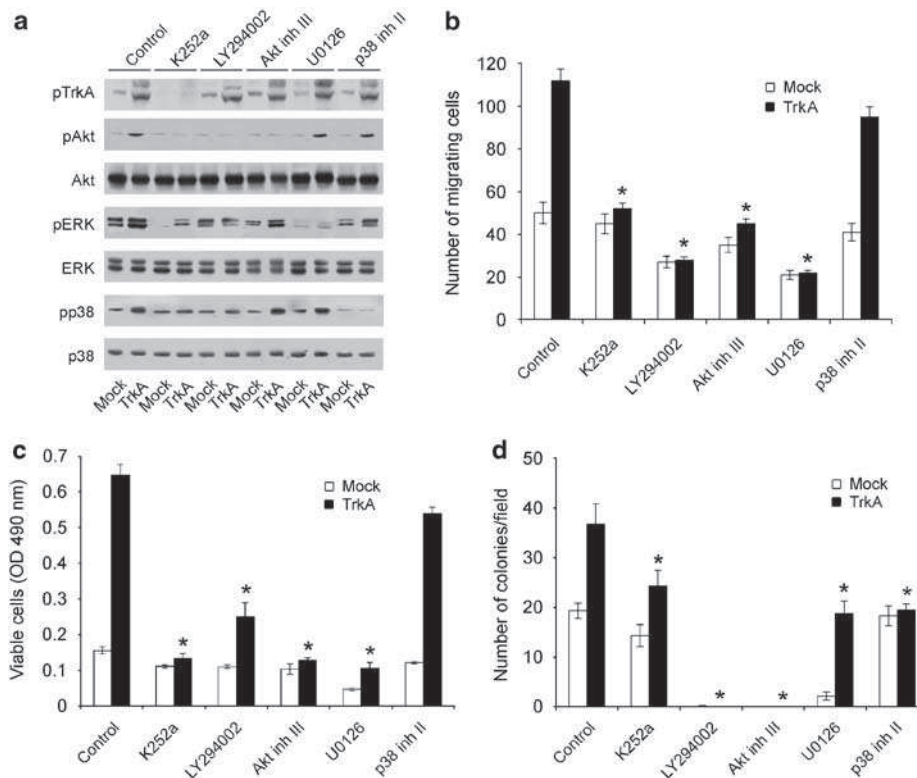


Figure 3 Involvement of PI3K-Akt and ERK/p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases in TrkA-mediated biological effects. **(a)** Cells were treated in serum-free Eagle's minimal essential medium (EMEM) for 30 min with specific pharmacological inhibitors. Lysates were made and subjected to immunoblot using the antibodies indicated. Quantification of western blots from three 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 three independent experiments. * $P < 0.01$, inhibitors-treated versus -untreated TrkA overexpressing cells.

apoptosis were observed (Figures 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 pTrkA 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) that 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 TrkAI 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 two other prototypic breast cancer cell lines MCF-7 and T47-D that are known to be less tumorigenic. 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 pAkt, pERK and pp38. 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

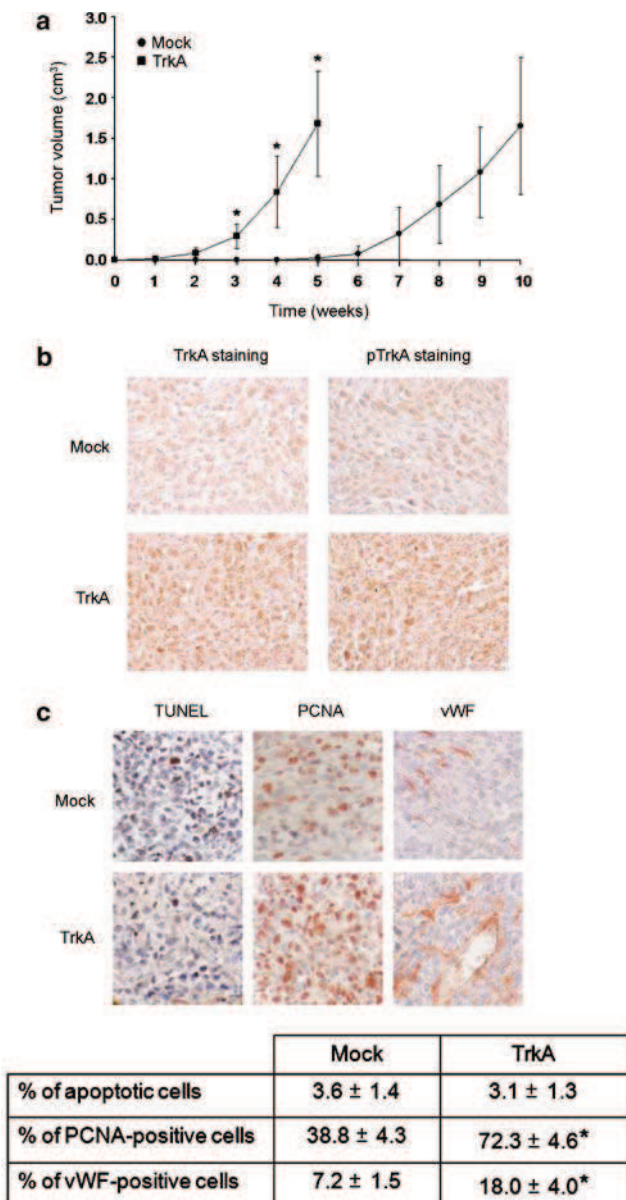


Figure 4 Xenograft tumor growth in severe combined immunodeficiency (SCID) mice. Cells (2×10^6) were subcutaneously injected into mice (nine mice per group). Tumor growth was monitored weekly until mean tumor volume approached 2 cm^3 (10 weeks for mock cells, 5 weeks for TrkA overexpressing cells). Xenografted tumors were then sectioned for further analysis. (a) Growth curve of tumors. Data are representative of three independent experiments. $*P < 0.01$, TrkA overexpressing versus mock cells. (b) Immunostaining of TrkA and pTrkA of xenografted tumor sections. (c) Terminal transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) reaction, immunostaining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and von Willebrand factor (vWF) of xenografted tumor sections. Results are representative of two independent experiments. $*P < 0.01$, TrkA overexpressing versus mock cells.

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 by 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 function 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 Screaton, 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 function 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 Erb-B1 (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

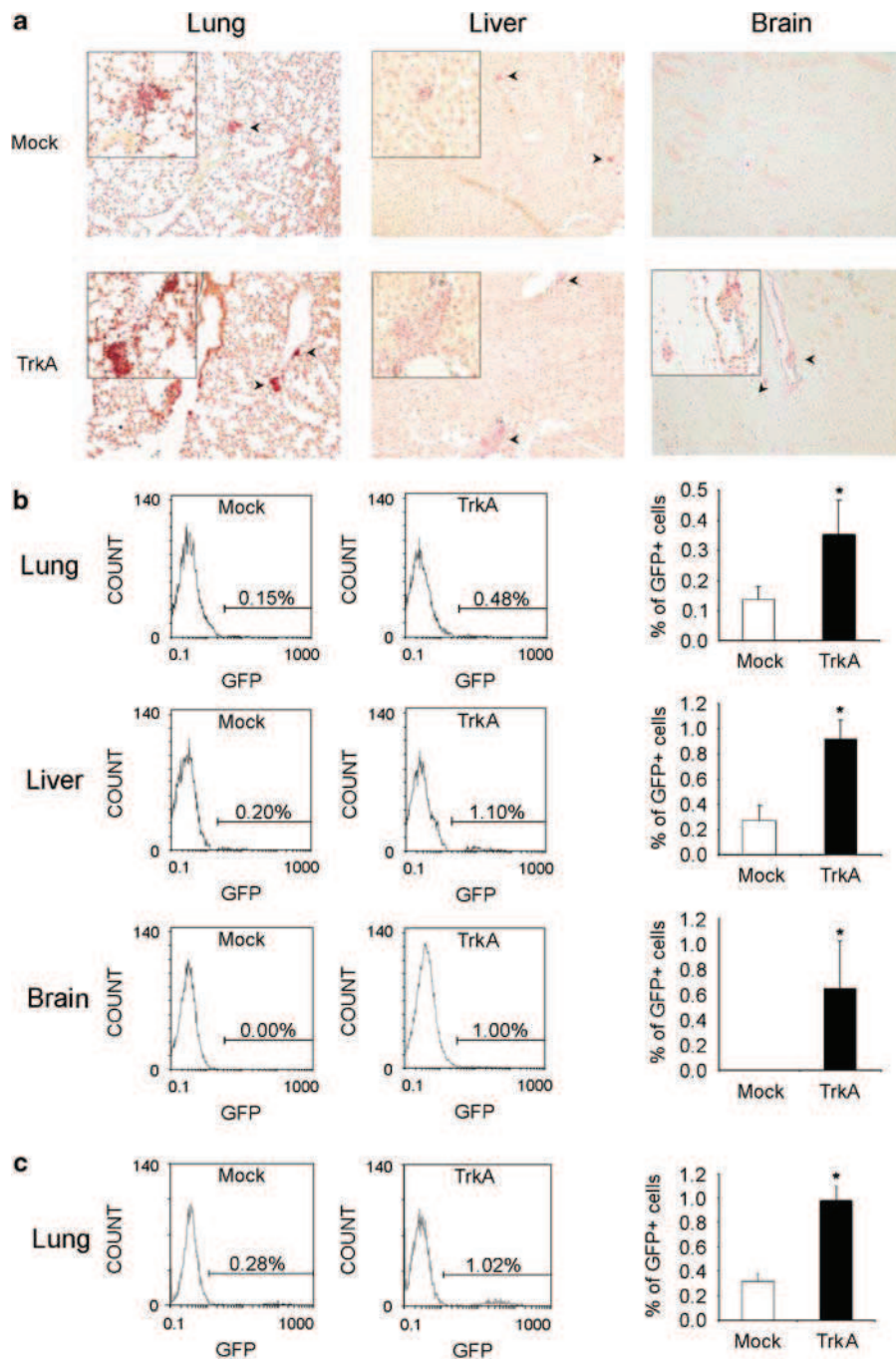


Figure 5 Metastasis assessment. Green fluorescent protein (GFP)-mock or GFP-TrkA overexpressing cells were subcutaneously injected into severe combined immunodeficiency (SCID) mice (**a** and **b**). Mice were killed when tumor volume approached 2 cm³. Lungs, liver and brain were removed and processed for the detection of metastatic cells. (**a**) Paraffin sections of lungs, liver and brain were stained with nuclear red and picroindigocarmin. Arrows indicate metastatic foci (insets: higher magnification of the metastatic foci). (**b**) Quantification of GFP-positive cells by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Histograms represent the mean of results from eight mice injected with mock cells and nine 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 (nine mice per group). After 8 weeks, the mice were killed and GFP-positive cells in their lungs were quantified by FACS. * $P < 0.01$, TrkA overexpressing versus mock cells.

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.*,

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

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 (eight animals) or with TrkA overexpressing cells (nine animals) were killed when the average volume of primary tumors approached 2 cm³. The liver, lungs 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.

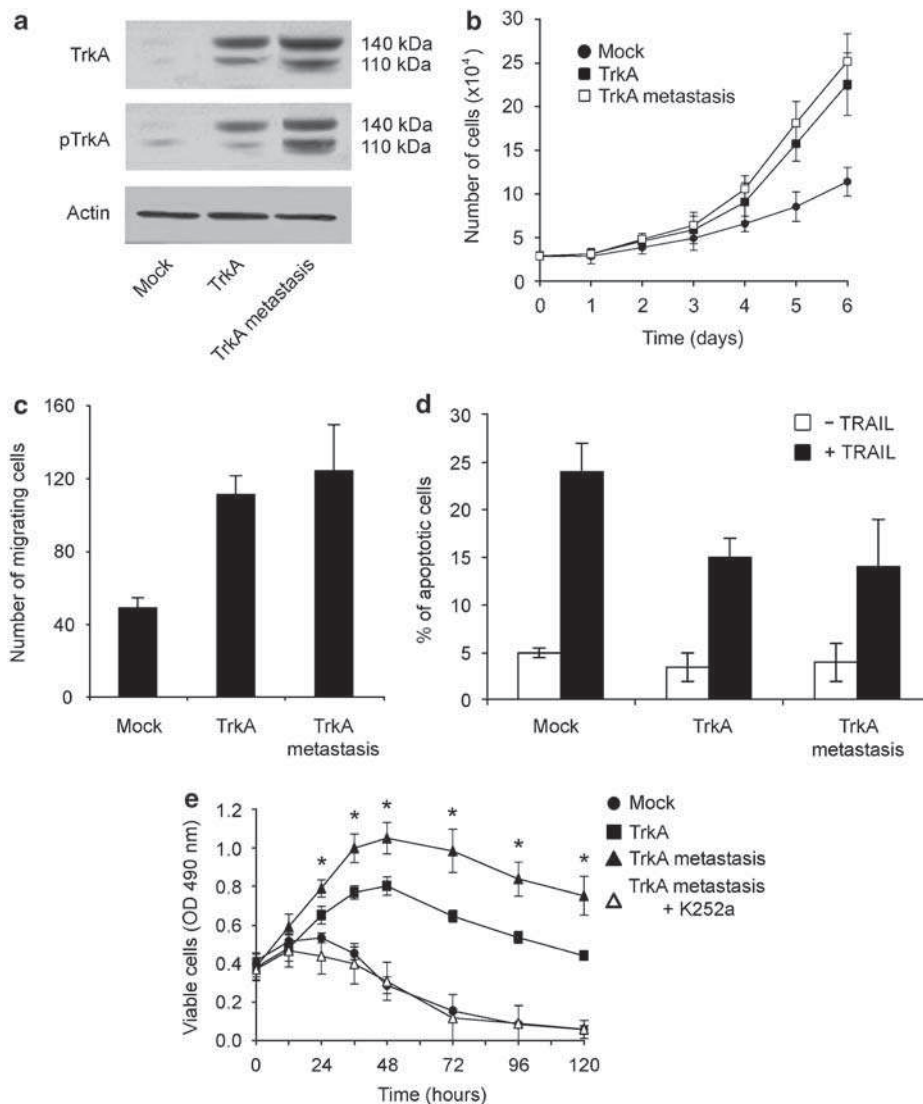


Figure 6 Properties of lung metastatic TrkA overexpressing cells. Lung metastatic TrkA overexpressing cells were recultivated (nine cultures) from the lungs of nine mice subcutaneously injected with TrkA overexpressing cells. **(a)** Immunoblots of TrkA and phospho-TrkA (pTrkA) from pooled metastatic cells. **(b)** Growth assay on standard culture plastic. **(c)** Migration assay using Transwells. **(d)** Resistance to terminal transferase dUTP nick-end labeling (TRAIL)-induced apoptosis. **(e)** Anoikis resistance of cells treated or not with K252a. **P* < 0.01, metastatic versus parental TrkA overexpressing cells.

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 analysed 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) and 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, Montrouge, France) 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 Eagle's minimal essential medium (EMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and stably transfected with TrkA cDNA and/or GFP cDNA as described in the Supplementary data.

Quantitative real-time PCR and western blot analysis

The protocols were detailed in the Supplementary data. TrkA isoforms were determined by reverse-transcriptase (RT)-PCR using specific primers as described (Tacconelli *et al.*, 2004).

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 μ M LY294002, 15 μ M Akt inhibitor III, 10 μ M U0126 or 10 μ M p38 inhibitor II, all from Calbiochem, San Diego, CA, USA. 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

Female SCID mice (6-week old) 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 phosphate-buffered solution before subcutaneous injection into the flanks (2×10^6 cells per 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 pTrkA staining was performed using tissue microarrays according to the manufacturer's instructions (Cliniscience). Apoptotic cells were detected by the TUNEL assay *in situ* cell death detection kit (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) according to the manufacturer's instructions. For detailed protocols, see the Supplementary data.

Spontaneous and experimental metastasis assays

To measure spontaneous metastasis, we subcutaneously injected GFP-positive cells into the flanks (2×10^6 cells per flank) of 8-week-old SCID mice as described above. Once the average tumor size approached 2 cm³, the mice were killed and their lungs, liver and brain were removed for further analysis. The organs were cut to two 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, we washed enzymatic digests once in 10 ml EMEM 10% FCS and seeded in cell culture dishes in EMEM 10% FCS with 800 μ g/ml hygromycin for 2–3 weeks. Selected tumor cells were confirmed after examination of GFP expression under fluorescent microscopy.

To measure experimental metastasis, we injected 5×10^5 GFP-positive cells into the lateral tail veins of 8-week-old SCID mice. After 8 weeks of injection, the mice were killed 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.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We acknowledge the excellent technical assistance of Isabelle Lefebvre. This work was supported by la 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.
- 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 hematogenous 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, Asnagli 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.
- 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.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Annexe 3

**Nerve Growth Factor is a potential
Therapeutic target in breast cancer**

Nerve Growth Factor Is a Potential Therapeutic Target in Breast Cancer

Eric Adriaenssens,¹ Elsa Vanhecke,¹ Pasquine Saule,³ Alexandra Mougel,³ Adeline Page,² Rodrigue Romon,¹ Victor Nurcombe,⁴ Xuefen Le Bourhis,¹ and Hubert Hondermarck¹

¹INSERM U908, Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, "Growth factor signaling in breast cancer cells. Functional Proteomics", IFR-147 and ²Mass Spectrometry Facility, IFR-147, University Lille 1, ³Centre National de la Recherche Scientifique UMR8527, Institute of Biology, Lille, France; and ⁴Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore, Singapore

Abstract

We show here that nerve growth factor (NGF), the prototypic neurotrophin, can be targeted in breast cancer to inhibit tumor cell proliferation, survival, and metastasis. Analysis of a series of biopsies revealed widespread expression of NGF in the majority of human breast tumors, with anti-NGF immunoreactivity concentrated in the epithelial cancer cells. Moreover, immunodeficient mice xenografted with human breast cancer cells and treated with either anti-NGF antibodies or small interfering RNA against NGF displayed inhibited tumor growth and metastasis. Such treatments directed against NGF induced a decrease in cell proliferation with a concomitant increase in apoptosis of breast cancer cells and an inhibition of tumor angiogenesis. Together, these data indicate that targeting NGF in breast cancer may have therapeutic ramifications. [Cancer Res 2008;68(2):346–51]

Introduction

Despite considerable progress in both the diagnosis and treatment, breast cancer remains the second leading cause of cancer deaths among women. The multifactorial nature of breast carcinogenesis, as well as the cellular and molecular diversity within tumors, have rendered difficult for the development of molecularly targeted treatments that can be applied to the broad range of breast tumors. This is well-illustrated with the proto-oncogenic tyrosine kinase membrane receptor Erb-B2 and its corresponding peptidic drug Herceptin (1); although Herceptin has proven to be a very efficient antibreast cancer drug, the fact that only 20% of breast cancers overexpress Erb-B2 is a limitation to its wider use in therapy. Thus, the identification of more universal molecular markers and targets is clearly needed.

It has previously been shown that nerve growth factor (NGF), the first isolated neurotrophin well-known for its role in nervous system development, is able to stimulate the *in vitro* growth and survival of breast cancer cells through its activation of the tyrosine kinase receptor TrkA and the death receptor p75^{NTR} (2–5). Interestingly, NGF cooperates with p185 (HER2) to activate breast cancer cell growth (2), and the reference drug used in hormone-therapy, Tamoxifen, inhibits the proliferative effects of NGF (3). These *in vitro* effects of NGF on breast cancer cells, and the fact

that both NGF receptors (TrkA and p75^{NTR}) are expressed in all breast tumors (6–8), suggested that NGF is actively involved in mammary carcinogenesis. An *in vivo* demonstration of this hypothesis, however, has not yet been provided.

In this study, we investigated NGF expression in human breast tumor biopsies and applied anti-NGF treatments to immunodeficient mice xenografted with human breast cancer cells. Our results show ubiquitous NGF expression in the epithelial compartment of the majority of breast tumors as well as decreases in tumor growth and metastasis that were inducible with anti-NGF treatments in an animal model. Together, these results show the effect of NGF on breast cancer cell development *in vivo* and establish the value of this growth factor as a potential therapeutic target.

Materials and Methods

Human breast biopsies. Breast carcinoma specimens were obtained from patients treated by mastectomy at the Center Oscar Lambret and the Clinique du Parc (Lille, France) in 1990, selected on the basis of being the first and unilateral cancer; these samples were collected with institutional safety review board approval and have been characterized previously (9). For each tissue sample, the following clinicopathologic information were obtained: histologic subclassification, tumor values [from the tumor-node-metastasis (TNM) classification of the Unio Internationale Contra Cancrum (UICC); ranging from T₀ to T₄], histologic grade [according to Bloom and Richardson (10)], the axillary lymph node status, and the hormone receptor status (estrogen receptor and progesterone receptor), determined in femtomoles of receptors per milligram of cytosolic protein and considered positive >15 fmol/mg. Furthermore, the age and menopausal status of patients were recorded, and life expectancy was followed up.

Real-time reverse transcription-PCR. After pulverizing breast tumors in nitrogen liquid, total RNA was isolated with tri reagent (Euromedex) and treated with DNase (Invitrogen). Reverse transcription was performed with 1 µg of RNA, 0.5 µg of random hexamers, and 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) 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 SYBRGreen PCR kit (Qiagen) with 2 µL of 1:10 cDNA and 500 nmol/L of primers. The primers used were as follows: 5'-CAACAGGACTCACAGGAGCA-3' and 5'-ACCTCTCCAACACCATCAC-3' for *NGF* transcript, and 5'-GTGATGTG-CAGCTGATCAAGACT-3' and 5'-GATGACCAGCCAAAGGAGA-3' for *RPLP0* (human acidic ribosomal phosphoprotein P0), which was used as a reference gene. The subsequent PCR conditions were 40 cycles and were carried out in the following manner: 95°C for 15 s, 60°C for 20 s, and 72°C for 30 s. Data were analyzed using the MX4000 PCR system software (Stratagene).

siRNA against NGF. Double strand siRNA oligonucleotides targeting *NGF*, siRNA 1 5'-GACCACCGCCACAGACAUUTT-3' and 3'-TTCUG-GUGCGGUGUCUGUAG-5', siRNA 2 5'-GGCAAGGAGGUGAUGGUGTT-3' and 3'-TTCCCGUUCUCCACUACCAC-5', were designed based on the published sequence of *NGF* (accession number NM_002506) and synthesized by Eurogentec. One pair of negative control siRNA were designed,

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Requests for reprints: Hubert Hondermarck, INSERM U908, Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, University Lille 1, Batiment SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq, Lille, France. Phone: 33-320-43-40-97; E-mail: Hubert.hondermarck@univ-lille1.fr.

©2008 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1183

with sequences different from siRNA-NGF: 5'-GCUGACCCUGAAGUUCAUCTT-3' and 3'-TTCGACUGGGACUUCAGUAG-5'. This control siRNA was eventually labeled with FITC at the 3' end for transfection rate evaluation.

NanoLC mass spectrometry. Mass spectrometry (MS) was performed with an ion trap mass spectrometer (LCQ Deca XP⁺; Thermo-electron) equipped with a nanoelectrospray ion source coupled with a nano high pressure liquid chromatography system (LC Packings Dionex). The protein extract was diluted in 50 μ L of water, and 1 μ L of solution was desalted and concentrated on a C4 reserve phase precolumn (Dionex) with H₂O/ acetonitrile-95/5% to 0.1% HCOOH and separated on a C4 nanocolumn Vydac column (Dionex). Proteins were eluted using a 5% to 50% linear gradient of H₂O/Acetonitrile-20/80% to 0.08% HCOOH followed by an

isocratic elution with 95% of the same buffer for 10 min. For MS analysis, coated nanoelectrospray needles were obtained from New Objective (Woburn), and the mass spectrometer was operated in positive ionization mode. Data acquisition was performed from a full scan MS over the range m/z 700 to 2,000 units, and a selected ion monitoring (SIM) scan of three ions selected of NGF was monitored. As intact proteins gave multiply charged ions in ion trap, we chose three characteristic multiply charged ions (+8, +9, and +10) of NGF for SIM scan acquisition.

Immunohistochemistry of human breast tumors. Immediately after resection, biopsies were fixed with formalin (10%) for 24 h and then dehydrated through increasing alcohols and embedded into Paraplast Plus. Sections (5 μ m) were transferred to Esco Superfrost Plus (Polylabo) slides. For immunohistochemical staining, sections were primarily treated

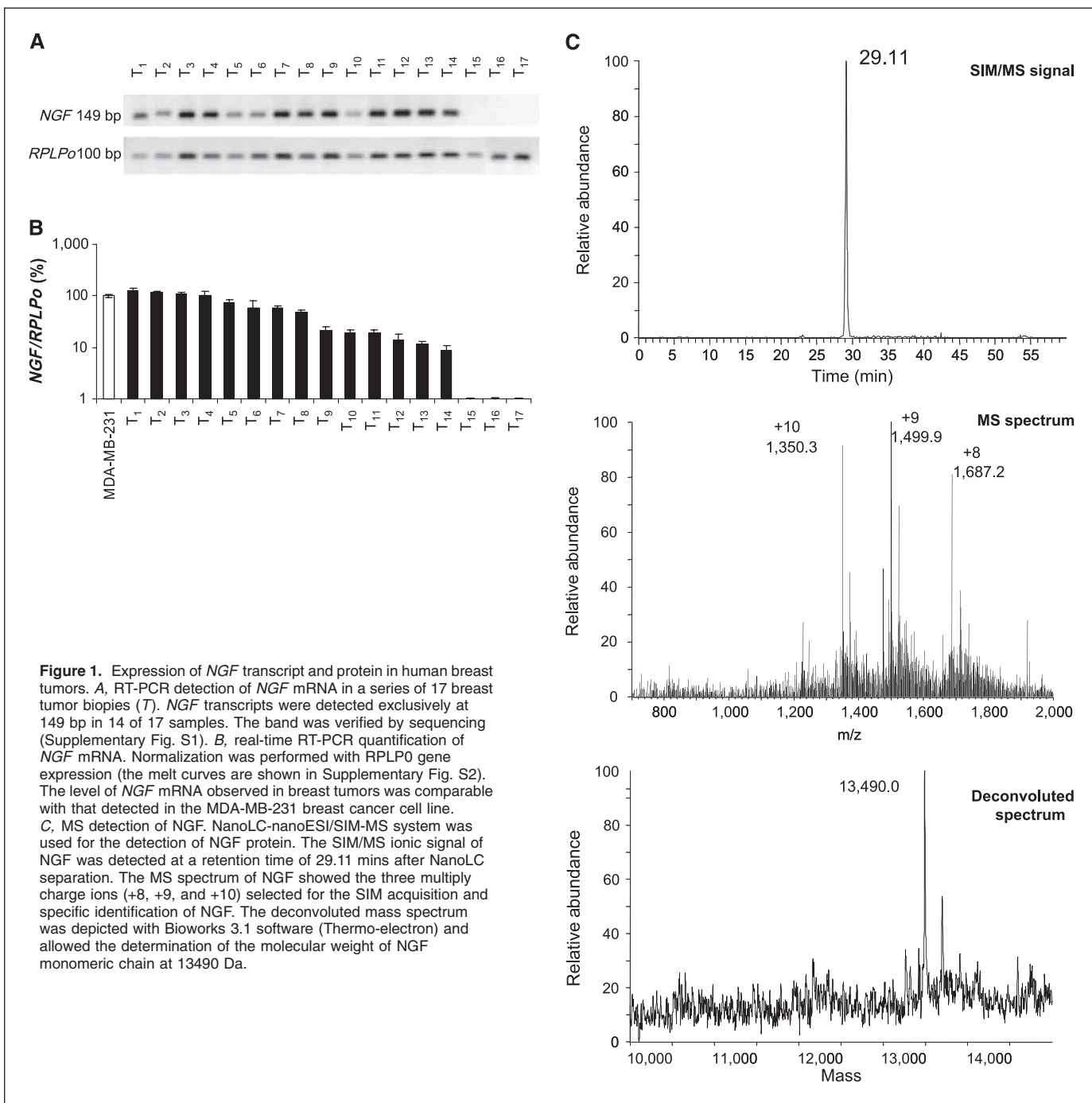


Figure 1. Expression of NGF transcript and protein in human breast tumors. **A**, RT-PCR detection of NGF mRNA in a series of 17 breast tumor biopsies (T). NGF transcripts were detected exclusively at 149 bp in 14 of 17 samples. The band was verified by sequencing (Supplementary Fig. S1). **B**, real-time RT-PCR quantification of NGF mRNA. Normalization was performed with RPLP0 gene expression (the melt curves are shown in Supplementary Fig. S2). The level of NGF mRNA observed in breast tumors was comparable with that detected in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. **C**, MS detection of NGF. NanoLC-nanoESI/SIM-MS system was used for the detection of NGF protein. The SIM/MS ionic signal of NGF was detected at a retention time of 29.11 mins after NanoLC separation. The MS spectrum of NGF showed the three multiply charge ions (+8, +9, and +10) selected for the SIM acquisition and specific identification of NGF. The deconvoluted mass spectrum was depicted with Bioworks 3.1 software (Thermo-electron) and allowed the determination of the molecular weight of NGF monomeric chain at 13490 Da.

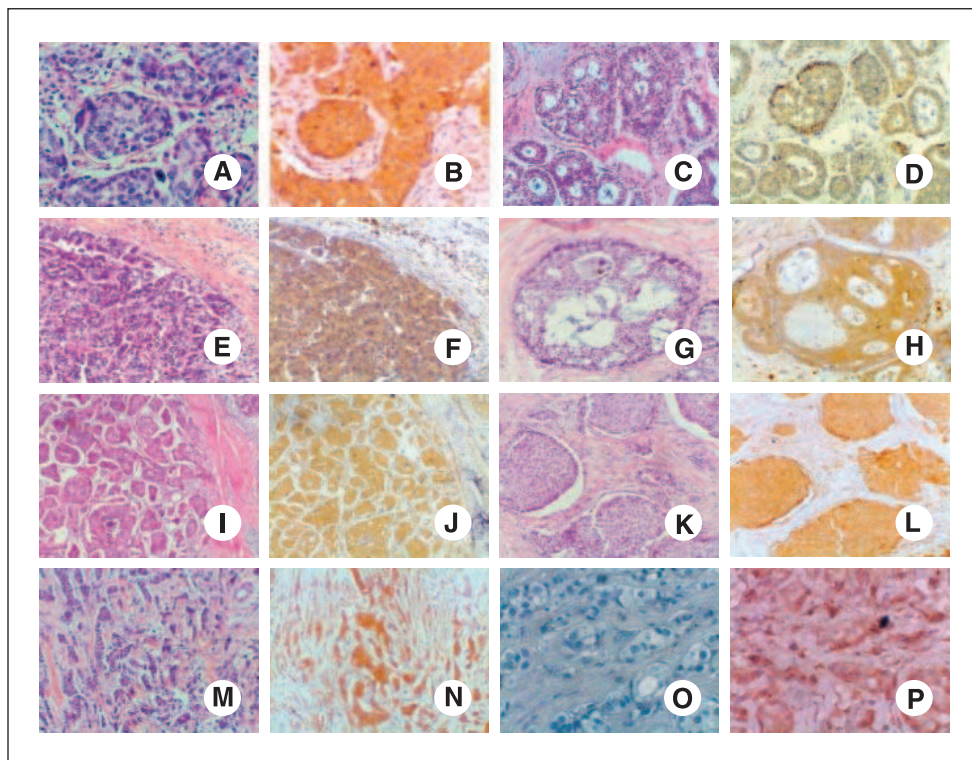


Figure 2. Immunodetection of NGF in human breast cancer tumors. Immunohistochemistry with NGF antibody (Ab) was performed on breast cancer biopsies (a, c, e, g, i, k, and m), and hemalun staining was performed on adjacent sections (b, d, f, h, j, l, and n). Strong anti-NGF immunoreactivity was observed in all histologic types of breast cancer. a and b, invasive ductal carcinomas (IDC); c and d, invasive lobular carcinomas (ILC); e and f, colloid mucillanous carcinomas (CMC); g and h, apocrine carcinomas (AC); i and j, epidermoid metaplastic carcinomas (EMC); k and l, tubular carcinomas (TLC); m and n, intracanalicular carcinomas (ICC). The controls of immunohistochemical reaction, without (o) and with (p) anti-NGF antibodies, are shown in the case of invasive ductal carcinoma. All tissue samples used here have been characterized previously (9).

as described (11) to restore antigen specificity before immunostaining; slides were immersed for 7.5 min in citrate buffer [0.01 mol/L (pH 6)], heated in a microwave, and then placed for 15 min under cold water. Rabbit polyclonal antibodies against NGF (sc-548) were from Santa Cruz Biotechnology. Extravidin peroxidase conjugate and 3, 3'-diaminobenzidine were from Sigma, glycerol was from Dako, and enhanced chemiluminescence reagents were obtained from Amersham Life Science. Immunoreactions were visualized with diaminobenzidine chromogen (Sigma), and sections were poststained with hemalun. Photomicrographs were taken with a phase-contrast microscope connected to an Olympus optical Camedia digital camera.

Effect of anti-NGF treatment on tumor xenograft in immunodeficient mice. MDA-MB-231 human breast cancer cells were obtained from the American Type Culture Collection and routinely grown as previously described (5). 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°C 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 s.c. injection into flanks (3×10^6 cells per flank) of 8-week-old SCID mice. Ten days after cell injection, anti-NGF treatments were applied every 3 days. Anti-NGF (12.5 µg; Mab 256 from R&D Systems), or 3 µg anti-NGF siRNA in 100 µL PBS, or 20 nmol/L K-252a were injected as close as possible to the tumor. The injections were repeated every 3 days. The tumor volume was determined every 3 days by measuring the length (l) and width (w) and then calculating the volume as $\pi/6 \times l \times w \times (l+w)/2$. Twelve animals were used in each group and experiments were replicated over three independent trials. Statistical significance between control and transfected cell animal groups was evaluated using Student's t test. Hepatic metastasis rates were macroscopically counted for each animal. For determination of index labeling, anti-Ki-67/MIB-1 (Immunotech) was used for the determination of proliferating cells, and cell apoptosis was measured using terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL). The microvascular density was measured after immunocytochemistry using anti-CD31 (Novus Biological).

Results

Expression of NGF in human breast tumors. NGF mRNA was detected in breast tumor biopsies by reverse transcription-PCR (RT-PCR) with a 149-bp band readily elicited (Fig. 1A). The sequence of the 149-bp band was then verified (sequencing data are shown in Supplementary Fig. S1). The quantification of expression was obtained after real-time RT-PCR (Fig. 1B). The corresponding melt curves, obtained for NGF and RPLP0, are shown in Supplementary Fig. S2. NGF expression was found in 14 of 17 tumors, with levels roughly equivalent to those detected in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. The presence of NGF was confirmed at the protein level by mass spectrometric analysis (Fig. 1C). NGF protein was detected as a single peak after NanoLC separation as shown in the MS spectrum; the deconvoluted mass spectrum of NGF allowed the precise determination of its molecular weight at 13490 Da, which corresponds to NGF monomeric chains. Together, these data unequivocally show the expression of NGF protein in human breast tumors. However, this type of mass spectrometric analysis cannot be considered as quantitative when applied to complex protein mixtures such as tumoral extracts, and therefore, estimation of NGF level was performed after immunohistochemistry.

Immunohistologic localization of NGF in human breast tumors. To study the distribution of NGF in breast cancers, a series of 77 breast tumor biopsies were analyzed by immunohistochemistry. As shown in Fig. 2, most breast tumors examined exhibited specific NGF immunoreactivity, with labeling mostly localized in the cancer epithelial cells. The level of NGF expression was estimated by microscopic observation, and breast tumors were classified into four different categories depending on the intensity of NGF labeling (Table 1). The results show no relationship between the level of NGF immunoreactivity and tumor size, histologic grade, patient survival, node invasion, menopausal status, estrogen, or

progesterone receptor levels. No correlation was found between protein and mRNA levels. Thus, whereas NGF overexpression seems to be a general phenomenon in breast tumors, there seems to be no relationship between NGF overexpression and any known prognostic factor.

Effect of NGF targeting on xenograft tumor development. MDA-MB-231 cells were injected into SCID mice, and the effect of treatment with anti-NGF or siRNA against NGF on tumor size and metastasis was monitored. Treatment with anti-NGF or siRNA against NGF resulted in strong and significant decreases in tumor size (Fig. 3A) that were depicted at the end of the experiments and after various anti-NGF treatments (Fig. 3B). Another xenograft model, T-47D human breast cancer cells, was also tested with similar results (Supplementary Fig. S3). Rates of cell proliferation and cell survival in tumors were then evaluated with anti-Ki-67 immunohistochemistry and TUNEL, respectively (Fig. 3C). The results indicated that both anti-NGF treatments induced a decrease in both cell survival and proliferation in breast cancer cells. In addition, microvascular density seemed to be significantly lowered by the anti-NGF treatments, and the number of metastases, as observed in the liver, was also diminished. The control of siRNA efficacy in depleting *NGF* mRNA is shown in Fig. 3D. Interestingly, the K252a tyrosine kinase receptor inhibitor, which is a relatively

specific blocker of the NGF receptor TrkA at the concentrations used here, also induced a decrease in tumor growth and metastasis, thus reinforcing the idea that NGF stimulation contributes to the growth and dissemination of breast tumors.

Discussion

As for most growth factors, the biological distribution and activities of NGF have largely superceded the original observation that led to its identification in the first place. NGF was originally discovered as a polypeptide able to stimulate the survival and differentiation of peripheral sympathetic and sensory neurons, but over the last decades, this growth factor has been shown to be expressed in a large variety of nonneuronal cell types and to exhibit other biological activities unrelated to neural system development. Consonant with its wide variety of *in vitro* biological effects, NGF has been shown to be involved in tumorigenesis of both neuronal and nonneuronal cells. Hence, the NGF-TrkA axis is a regulating element for the control of neuroblastoma cell growth, with TrkA alternative splicing able to act as a positive switch for the promotion of neuroblastoma (12, 13). In Wilms tumors, melanoma, medullary thyroid carcinoma, prostatic, and pancreatic tumors, NGF, together with its corresponding receptors, are also expressed

Table 1. NGF overexpression versus various clinicopathologic factors

Clinicopathologic factors		NGF labeling intensity				Mean (SD)
		0	1	2	3	
Histologic subclasses of breast tumors	IDC (n = 38)	2	18	7	11	1.7 (0.9)
	ILC (n = 15)	1	10	3	1	1.3 (0.7)
	CMC (n = 5)	0	0	3	2	2.4 (0.5)
	AC (n = 11)	1	0	4	6	2.4 (0.9)
	EMC (n = 2)	0	0	0	2	3.0 (0.0)
	TC (n = 2)	0	2	0	0	1.0 (0.0)
	ICC (n = 4)	1	2	1	0	1.0 (0.8)
Histologic grade (SBR modified)	I (n = 5)	0	2	1	2	2.0 (1.0)
	II (n = 40)	2	16	12	10	1.7 (0.9)
	III (n = 27)	1	12	4	10	1.8 (1.0)
Tumor values	0 (n = 6)	0	4	0	2	1.7 (1.0)
	1 (n = 8)	2	1	1	4	1.9 (1.3)
	2 (n = 43)	2	19	14	8	1.6 (0.8)
	3 (n = 13)	1	5	1	6	1.9 (1.1)
Survival (5 y)	4 (n = 4)	0	2	0	2	2.0 (1.1)
	Alive (n = 64)	4	26	16	18	1.7 (0.9)
	Dead (n = 13)	1	6	2	4	1.7 (1.0)
Lymph nodes status	Positive (n = 35)	1	18	7	9	1.7 (0.9)
	Negative (n = 40)	4	14	9	13	1.8 (1.0)
Menopausal status	Post (n = 50)	4	19	11	16	1.8 (1.0)
	Pre (n = 23)	1	11		6	1.7 (0.9)
Estrogen receptor	Positive (n = 39)	3	16	11	9	1.7 (0.9)
	Negative (n = 36)	2	15	7	12	1.8 (1.0)
Progesterone receptor	Positive (n = 40)	3	15	10	12	1.8 (1.0)
	Negative (n = 35)	2	16	8	9	1.7 (0.9)

NOTE: The intensity of anti-NGF immunohistologic staining in breast tumor biopsies (Fig. 2) was estimated from 0 (no staining) to 3 (intensive staining). For a few patients, some clinicopathologic evaluations failed; consequently, the total number of cases can differ from 77. For each tissue sample, the following clinicopathologic information were obtained: histologic subclassification, tumor (T) values (from the TNM classification of the UICC; ranging from T₀ to T₄), histologic grade (according to Bloom and Richardson), the axillary lymph node status, and the hormone receptor status (estrogen receptor and progesterone receptor).

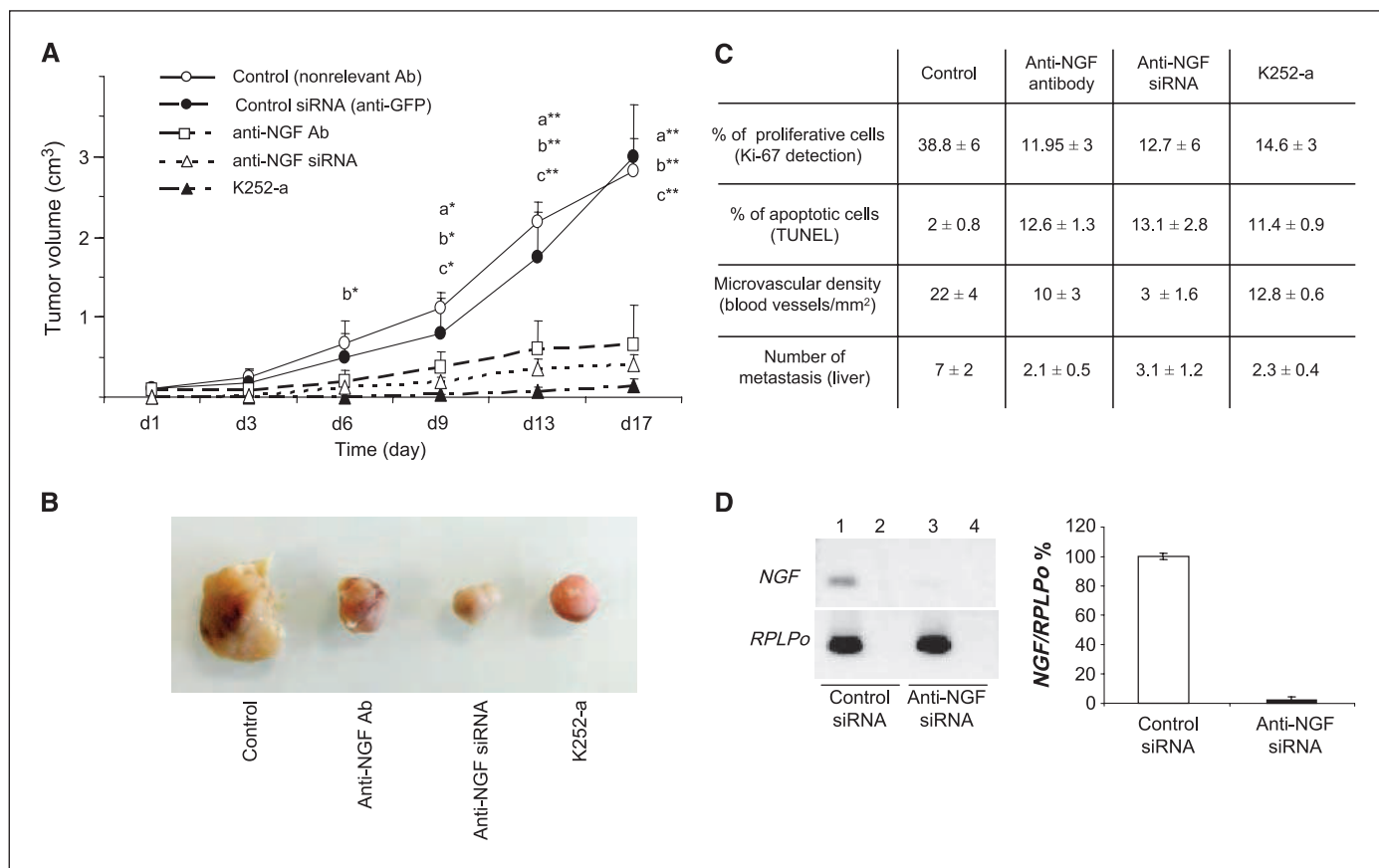


Figure 3. Antitumoral effect of NGF inhibition in animal model. **A**, SCID mice were injected with MDA-MB-231 breast cancer cells. When mean tumor volumes reached about 200 mm³ in size, mice were injected with 12.5 μg anti-NGF antibodies, 3 μg siRNA against NGF, or 20 mmol/L K252a. Nonrelevant antibody and anti-GFP siRNA were injected as control. All injections were performed peritumorally at days 1, 3, 6, 9, 13, and 17 as indicated. Points, mean; bars, SD. Twelve animals were used for each group and the experiments were replicated thrice. Student's *t* test was performed between control groups and anti-NGF antibody groups (*a*), between control groups and K252-a groups (*b*), and between anti-GFP siRNA groups and anti-NGF siRNA groups (*c*). *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01. The difference between controls and antibody-treated groups as well as siRNA anti-NGF groups was significant from day 9 (*P* < 0.05) through days 13 and 17 (*P* < 0.01). Another xenograft model (T-47D human breast cancer cells) was also tested with similar results (Supplementary Fig. S3). **B**, photographic demonstration of comparative tumor size differences observed after anti-NGF treatments (day 17). **C**, evaluation of cell proliferation, apoptosis, microvascular density, and liver metastasis from xenograft tumors. Cell proliferation and apoptosis were measured by immunohistochemistry against Ki67 and TUNEL analysis respectively. Microvascular density was studied after immunohistochemistry for anti-CD31, with liver metastases being macroscopically counted. The results show that anti-NGF antibodies, siRNA against NGF, and K252a treatments all resulted in a decrease of proliferation and an increase in apoptosis of breast cancer cells, accompanied by a diminution in microvascular density and the number of metastases. **D**, demonstration of siRNA efficacy. MDA-MB-231 cells were treated with siRNA against NGF for 48 h, and the quantity of NGF mRNA was then assessed by RT-PCR. RPLPo was used as control. Lanes 1 and 2, control siRNA; lanes 3 and 4, siRNA against NGF. Lanes 1 and 3, +reverse transcription; lanes 2 and 4, -reverse transcription.

(14–19), suggesting the involvement of this growth factor in tumor growth and progression. For breast cancer, it has been shown *in vitro* that NGF promotes both tumor cell survival and proliferation (2–5), and that NGF is overexpressed in breast cancer cells maintained in culture (4). Although NGF receptors have been reported in breast tumors, with a mildly positive relationship to prognosis (6–8), the production of NGF itself had not been described. The ubiquitous expression of NGF that we report here shows that NGF is produced in tumor cells of most breast cancer types. Considering the levels of immunoreactivity that we found in tumor biopsies, the level of expression of this growth factor may well be related to tumor aggressiveness, albeit we have as yet established no relationship with any known prognostic factor. Therefore, although prognostic value is not directly shown here, we have established that NGF expression is directly related to breast cancer.

The detection of NGF in breast tumors further prompted us to explore the hypothesis that it acts to stimulate tumor development. In our animal model, human breast tumor cells were injected,

resulting in tumor formation and metastasis. Our data show that inhibiting NGF resulted in a potent inhibition of tumor growth and metastasis. The two approaches that we have used to inhibit NGF activity, blocking antibodies and siRNA, both resulted in a roughly equivalent inhibition of tumor growth and metastasis. In addition, the proportion of proliferating cells in the xenograft tumors was significantly decreased after anti-NGF treatments, with a concomitant increase in the proportion of apoptotic cells, paralleling its stimulating effect on breast cancer cell growth and survival *in vitro* (2–5). Thus, it is possible to posit an NGF autocrine loop that acts to promote survival and stimulate growth of breast cancer cells. This is reinforced by the inhibition of tumor xenografts that we have observed after treatment with the K252a tyrosine kinase inhibitor. Although K252a can inhibit several tyrosine kinase receptors, including Met and the epidermal growth factor receptor, at the concentration used in our studies, its specificity for TrkA is such that it constitutes further support in favor of an NGF autocrine stimulation of breast tumor growth. Interestingly, in some breast tumor specimens, we also observed a diffuse but

specific NGF immunoreactivity in adipocytes (data not shown). The fat tissue surrounding the glandular part of the breast is increasingly being reported as an important regulator of breast epithelial cells, and several lines of evidence suggest its involvement as a regulator of breast cancer cell phenotype and behavior. Further investigation will be necessary to confirm a possible adipocyte-mediated paracrine activity of NGF that involves breast cancer cells. Another interesting feature of our study is the decrease of blood capillary density that we measured in tumor xenografts treated with anti-NGF or siRNA against NGF. NGF has already been posited as angiogenic as it can stimulate proliferation and tubule organization of human umbilical vein endothelial cells (20). In addition, some *in vivo* evidence suggests an NGF-mediated proangiogenic activity in ovarian cancer (21), although it is not yet known if this results from a direct or indirect stimulation of endothelial cells, as NGF can also induce the expression of proangiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (11). Nevertheless, the decrease in tumor vascular density that we report here after anti-NGF treatment indicates that perturbing NGF activity provokes not only a decrease in breast cancer cell growth

but also a general disturbance of tumor development that can be observed at the level of angiogenesis.

In conclusion, the present work shows the value of NGF as a new molecular target in breast cancer. Although the application of neurotrophin and antineurotrophin strategies have thus far been exploited mainly in the field of neuroscience, our data indicate that interfering with NGF have a direct effect on the development of breast tumors. A variety of approaches have already been developed to modulate the neurotrophic activities of NGF, and developing new contexts for them in breast cancer may open up new opportunities for innovative therapeutic strategies.

Acknowledgments

Received 3/29/2007; revised 8/23/2007; accepted 10/8/2007.

Grant support: Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, the French Ministry of Research and Education, the "Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2006)", the "Institut Universitaire de France", the "Génopole de Lille", and the "Région Nord-Pas-de-Calais".

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

References

- Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med* 2005;353:1652-4.
- 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.
- Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, Cantarella G, Bianchi A, Bernardini R. Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* 2001;61:3002-8.
- Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V, Hondermarck H. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22:5592-601.
- 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.
- 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.
- Aragona M, Panetta S, Silipigni AM, et al. Nerve growth factor receptor immunoreactivity in breast cancer patients. *Cancer Invest* 2001;19:692-7.
- Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Ann Florenes V, Nielsen S, Nesland JM. 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.
- Adriaenssens E, Dumont L, Lottin S, et al. H19 overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumor values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression. *Am J Pathol* 1998;153:1597-607.
- Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Brit J Cancer* 1957;11:359-77.
- 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* 2006;104:168-75.
- 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.
- Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Gulino A, Mackay AR. TrkAIII. A novel hypoxia-regulated alternative TrkA splice variant of potential physiological and pathological importance. *Cell Cycle* 2005;4:8-9.
- Marchetti D, McQuillan DJ, Spohn WC, Carson DD, Nicolson GL. Neurotrophin stimulation of human melanoma cell invasion: selected enhancement of heparanase activity and heparanase degradation of specific heparan sulphate subpopulations. *Cancer Res* 1996;56:2856-63.
- 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.
- Zhu ZW, Friess H, Wang L, et al. Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001;7:105-12.
- Krygier S, Djakiew D. Neurotrophin receptor p75(NTR) suppresses growth and nerve growth factor-mediated metastasis of human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2002;98:1-7.
- Miknyoczki SJ, Wan W, Chang H, et al. 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* 2002;8:1924-31.
- Shonukan O, Bagayogo I, McCrean P, Chao M, Hempstead B. Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin. *Oncogene* 2003;22:3616-23.
- Cantarella G, Lempereur L, Presta M, et al. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *FASEB J* 2002;16:1307-9.
- 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.

Annexe 4

**Tamoxifen and TRAIL synergistically induce
apoptosis in breast cancer cells**

SHORT COMMUNICATION

Tamoxifen and TRAIL synergistically induce apoptosis in breast cancer cellsC Lagadec¹, E Adriaenssens¹, RA Toillon¹, V Chopin¹, R Romon¹, F Van Coppenolle², H Hondermarck¹ and X Le Bourhis¹¹INSERM ERI-8 (JE2488), Growth Factor Signaling in Breast Cancer. Functional Proteomics. IFR147, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France and ²INSERM U800, IFR147, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

Tamoxifen (TAM), is widely used as a single agent in adjuvant treatment of breast cancer. Here, we investigated the effects of TAM in combination with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in estrogen receptor- α (ER- α)-positive and -negative breast cancer cells. We showed that cotreatment with TAM and TRAIL synergistically induced apoptosis regardless of ER- α status. By contrast, cotreatment did not affect the viability of normal breast epithelial cells. Cotreatment with TAM and TRAIL in breast cancer cells decreased the levels of antiapoptotic proteins including FLIPs and Bcl-2, and enhanced the levels of proapoptotic proteins such as FADD, caspase 8, tBid, Bax and caspase 9. Furthermore, cotreatment-induced apoptosis was efficiently reduced by FADD- or Bid-siRNA, indicating the implication of both extrinsic and intrinsic pathways in synergistic apoptosis induction. Importantly, cotreatment totally arrested tumor growth in an ER- α -negative MDA-MB-231 tumor xenograft model. The abrogation of tumor growth correlated with enhanced apoptosis in tumor tissues. Our findings raise the possibility to use TAM in combination with TRAIL for breast cancers, regardless of ER- α status.

Oncogene advance online publication, 3 September 2007; doi:10.1038/sj.onc.1210749

Keywords: breast cancer; tamoxifen; TRAIL; apoptosis; tumor xenograft

Introduction

The antiestrogenic drug, tamoxifen (TAM), a nonsteroidal selective estrogen receptor modulator, has been used as a single agent in the treatment of estrogen receptor- α (ER- α)-positive breast cancer (Lover, 1989; Jordan, 1992). Clinical response to TAM is shown to be associated with both decreased proliferation and increased

apoptosis (Gelman, 1997; McClay *et al.*, 2000). Thus, TAM is thought to exert antitumor effect via ER- α -dependent inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. However, an important additional feature of TAM is its effectiveness in the treatment of ER- α -negative neoplasia including breast cancer, malignant gliomas, pancreatic carcinoma and melanoma (Gelman, 1997; McClay *et al.*, 2000). Moreover, at clinical achievable concentrations (1–10 μ M), TAM strongly induces apoptosis in both ER- α -positive and ER- α -negative breast cancer cells. The apoptosis-inducing effect is not reversible by addition of estrogens, suggesting that ER- α -independent induction of apoptosis could be a major mechanism of the observed antitumor effect of TAM (Hawkins *et al.*, 2000; Mandlekar and Kong, 2001). TAM can induce apoptosis through several distinct pathways including production of oxidative stress and ceramide, as well as transcriptional regulation of expression of Bcl-2 protein family members (Mandlekar and Kong, 2001; Nazarewicz *et al.*, 2007). Therefore, a critical question remaining is whether TAM, if given in combination with other agents, will be more efficient to eliminate both ER- α -positive and ER- α -negative breast cancer cells.

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), has recently emerged as a novel biological agent for cancer therapy (LeBlanc and Ashkenazi, 2003). TRAIL exerts its tumoricidal effect by directly inducing apoptosis of cancer cells via a receptor-mediated process. TRAIL interacts with five different receptors: two functional receptors (DR4 and DR5), two decoy receptors (DcR1 and DcR2) that can bind TRAIL but lack the functional intracellular death domain, thus incapable of transducing a death signal, and one soluble protein (osteoprotegerin) that binds TRAIL at low affinity. Binding of TRAIL to DR4 or DR5 results in the recruitment of the adapter protein FADD, which in turn recruits and activates caspases 8 or 10. These active caspases initiate apoptosis either by direct cleavage of downstream effector caspases (extrinsic pathway) or by cleaving Bid. Truncated Bid (tBid) becomes inserted into mitochondrial membrane to favor the release of proapoptotic factors such as cytochrome *c*, leading to caspase 9 activation and subsequent apoptosis. This mitochondria-mediated signaling cascade is also called intrinsic pathway (LeBlanc and Ashkenazi, 2003).

Correspondence: Professor X Le Bourhis, INSERM ERI-8, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, 59655, France.

E-mail: xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr

Received 23 April 2007; revised 9 July 2007; accepted 27 July 2007

Although the majority of cultured cancer cells show a certain degree of sensitivity to the cytotoxic effect of TRAIL, it has been well documented that cotreatment with TRAIL and chemotherapeutic agents such as topoisomerase inhibitors, antimetabolites and antimicrotubule agents results in a synergistic induction of tumor cell apoptosis and a marked inhibition of tumor growth in murine xenograft models (Duiker *et al.*, 2006).

Despite the existence of plenty of convincing data describing the ability of TRAIL to synergize chemotherapeutic agent-induced apoptosis of cancer cells, nothing is known about the effect of combined treatment with TAM and TRAIL on breast cancer cells, especially in ER- α -negative breast cancer cells. Here, we show that these two agents synergize to induce apoptosis in both ER- α -positive and ER- α -negative breast cancer cells. Moreover, TAM and TRAIL together totally abolish tumor growth in an ER- α -negative MDA-MB-231 tumor xenograft model. Our findings provide a proof of principle that the clinical efficacy of TAM could be enhanced by combined treatment with TRAIL not only for ER- α -positive but also for ER- α -negative breast cancers.

Results and discussion

Cotreatment with TAM and TRAIL enhanced apoptosis induction in breast cancer cells

We investigated whether the combination of TAM and TRAIL could enhance apoptosis more than either agent alone. As shown in Figure 1, TAM (2 μ M) and TRAIL (1 ng ml⁻¹) alone only moderately induced apoptosis (10–20%) in breast cancer cells. In contrast, cotreatment with TAM and TRAIL synergistically induced apoptosis in all breast cancer cell lines tested regardless of ER- α status, since the combination index was calculated as being less than 1 (0.4–0.6). Synergistic induction of cell death was also confirmed by MTT assay (Supplementary Figure 1). Interestingly, neither agent alone nor in combination affected apoptosis in normal breast epithelial cells (Figure 1b and Supplementary Figure 1). Since TAM is known to induce cell cycle blockage in ER- α -positive breast cancer cells (Osborne, 1998), we then performed flow cytometric analysis to see if there were any modifications of cell cycle distribution upon cotreatment (Supplementary Table 1). TAM alone or in combination with TRAIL induced an accumulation of ER- α -positive MCF-7 cells in G₁ phase; no significant modifications of cell cycle profile were observed in ER- α -negative MDA-MB-231 cells. However, the percentages of cells in subG₁ were strongly increased by cotreatment in both MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Collectively, these results indicated that the combination of TAM and TRAIL synergistically induced apoptosis in breast cancer cells regardless of ER- α status. Results shown were obtained in serum-free culture medium to avoid eventual protective effects of serum-derived survival factors. However, similar results were observed in the presence of 5% serum (data not shown). Of note, the apoptosis-inducing effects of TAM alone or in

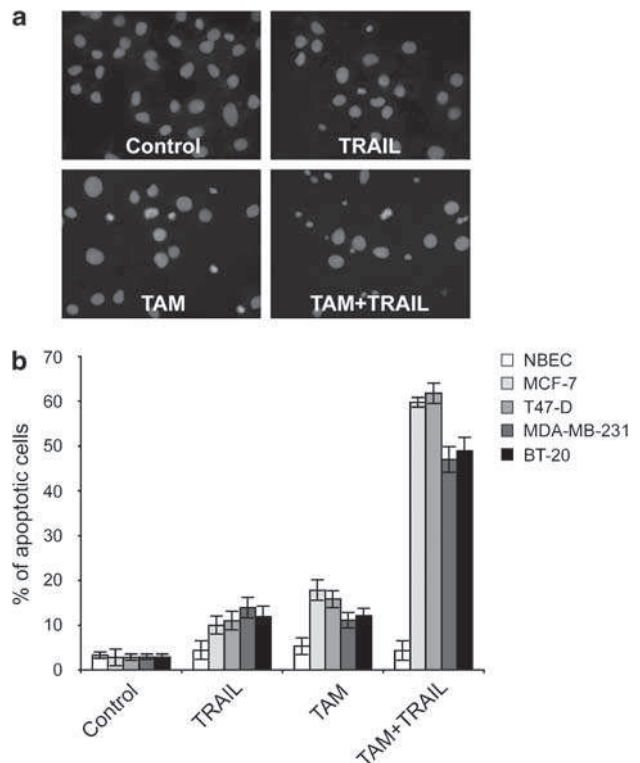


Figure 1 Effects of tamoxifen (TAM) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) on apoptosis in breast cancer and normal epithelial cells. ER- α -positive (MCF-7, T47-D) and ER- α -negative (MDA-MB-231, BT-20) human breast cancer cells as well as normal breast epithelial cells (NBEC) were treated in serum-free medium with 2 μ M TAM and/or 1 ng ml⁻¹ TRAIL for 24 h. (a) Hoechst staining of MCF-7 cells. Apoptotic nuclei are condensed or fragmented. (b) Percentage of apoptotic cells was determined after Hoechst staining as described (Chopin *et al.*, 2004). Values represent mean \pm s.d. of three experiments. Synergism was calculated as described (Supplementary Data).

combination with TRAIL were somewhat stronger in ER- α -positive cells. Since TAM can act through ER- α inhibition to induce apoptosis (Mandlekar and Kong, 2001), it is possible that the superiority of observed effects in ER- α -positive breast cancer cells may be partly mediated by signaling through ER- α . Nevertheless, at clinically achievable concentrations (1–10 μ M), TAM has already been shown to induce apoptosis through mechanisms independent of ER- α including production of oxidative stress and ceramide, activation of JNK, as well as transcriptional regulation of expression of Bcl-2 protein family members (Mandlekar and Kong, 2001; Kallio *et al.*, 2005; Nazarewicz *et al.*, 2007). Accordingly, we observed that inhibition of JNK activity, using the specific JNK inhibitor SP600125 or a dominant-negative form of JNK, reduced cotreatment-induced apoptosis (data not shown).

Both extrinsic and intrinsic pathways were involved in cotreatment-induced apoptosis

TRAIL-induced apoptosis in breast cancer cells is known to involve both extrinsic (death receptor) and

intrinsic (mitochondrial) pathways (Suliman *et al.*, 2001). We first determined the effects of cotreatment on the levels of molecular determinants of TRAIL signaling pathways (Figure 2a and Supplementary Table 2). Cotreatment increased the expression of the death receptor adapter FADD and reduced the expression of the short FLICE inhibitory protein (FLIP) isoform (FLIPs) in both MCF-7 and MDA-MB-231 cells. As FLIP competes with procaspase 8 to inhibit procaspase 8 recruitment by FADD, the observed modifications presumably lead to more recruitment of procaspase 8, and therefore increase caspase 8 activation and subsequent cell death. Accordingly, FADD-siRNA efficiently reduced the expression of FADD and the synergistic induction of apoptosis by cotreatment (Figure 3a), confirming the implication of extrinsic pathways in synergistic induction of apoptosis.

Cross talk between the death receptor and mitochondrial pathways can be mediated by caspase 8 cleavage of Bid. tBid translocates to mitochondria and interacts with pro- and antiapoptotic members to activate or

antagonize their functions, leading to cytochrome *c* release (LeBlanc and Ashkenazi, 2003). We showed that combined treatment with TAM and TRAIL strongly increased the cleavage of Bid in breast cancer cells (Figure 2a and Supplementary Table 2). Bid-siRNA efficiently reduced the expression of Bid and the synergistic induction of apoptosis by cotreatment (Figure 3b). However, Bid inhibition could not totally abolish apoptosis induced by cotreatment, suggesting that other Bcl-2 family proteins may be also implicated. Indeed, cotreatment increased the levels of proapoptotic protein Bax and decreased the levels of antiapoptotic protein Bcl-2. Thus, downregulation of antiapoptotic protein Bcl-2 together with upregulation of proapoptotic proteins tBid and Bax may constitute a complementary positive amplification loop to promote mitochondrial dysfunctions, as confirmed by the release of mitochondrial cytochrome *c* (Figures 2b and c) and enhanced levels of active caspase 9 (Figure 2a and Supplementary Table 2). The mechanism by which cotreatment regulates the levels of Bcl-2 family members

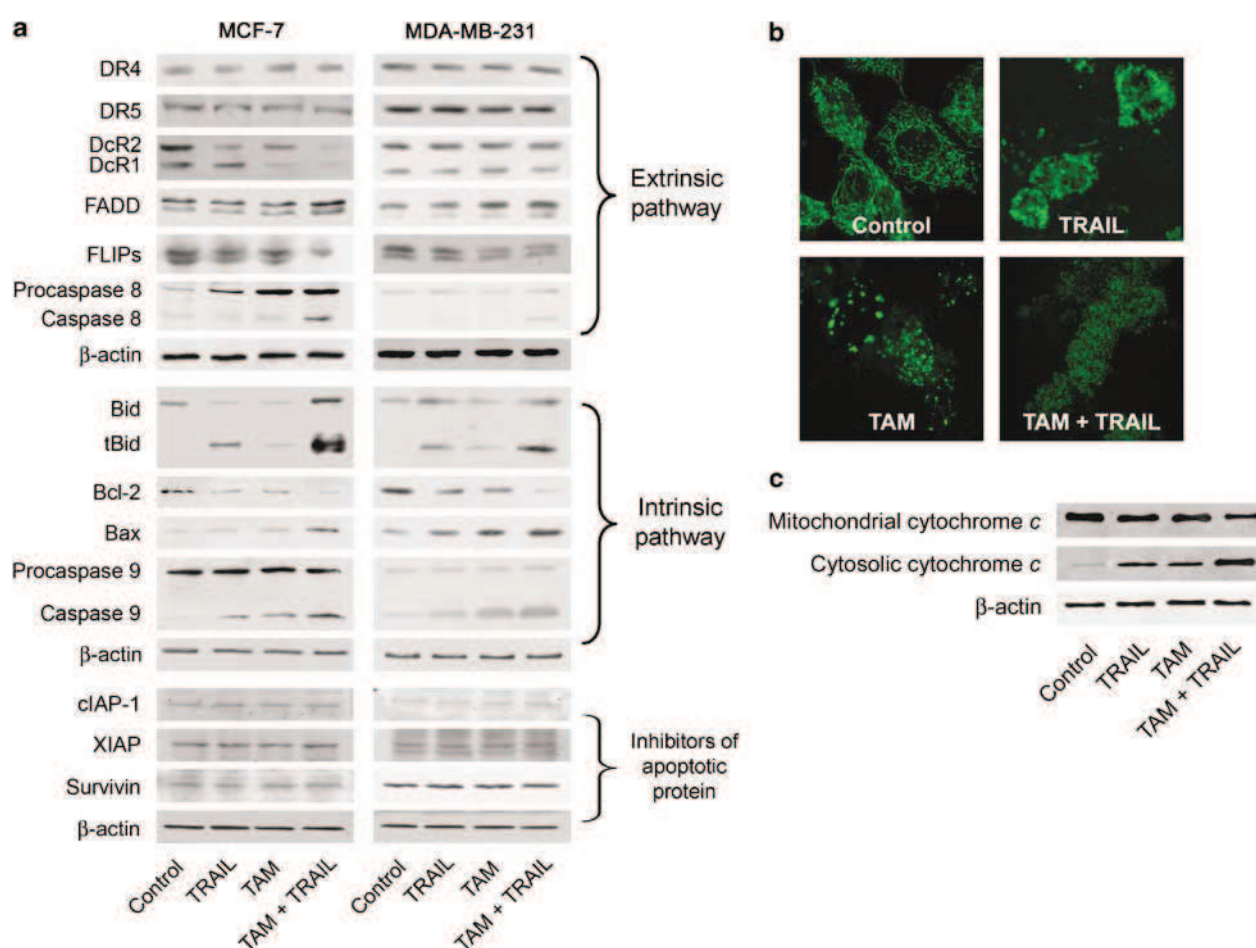


Figure 2 Modulations of apoptosis regulating proteins by cotreatment with tamoxifen (TAM) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells were treated in serum-free medium with 2 μ M TAM and/or 1 ng ml⁻¹ TRAIL for 24 h. Western blot and confocal microscopy were then performed as described (Chopin *et al.*, 2004). (a) Western blot analysis of whole cell lysates. (b) Confocal microscopy analysis of cytochrome *c* in MCF-7 cells. Typical punctuated mitochondrial staining was observed in control cells. A diffuse cytosolic signal was observed in cells treated with TRAIL and TAM alone, or in combination, suggesting the translocation of cytochrome *c* from mitochondria to cytosol. (c) Western blot analysis of mitochondrial and cytosolic cytochrome *c* in MCF-7 cells.

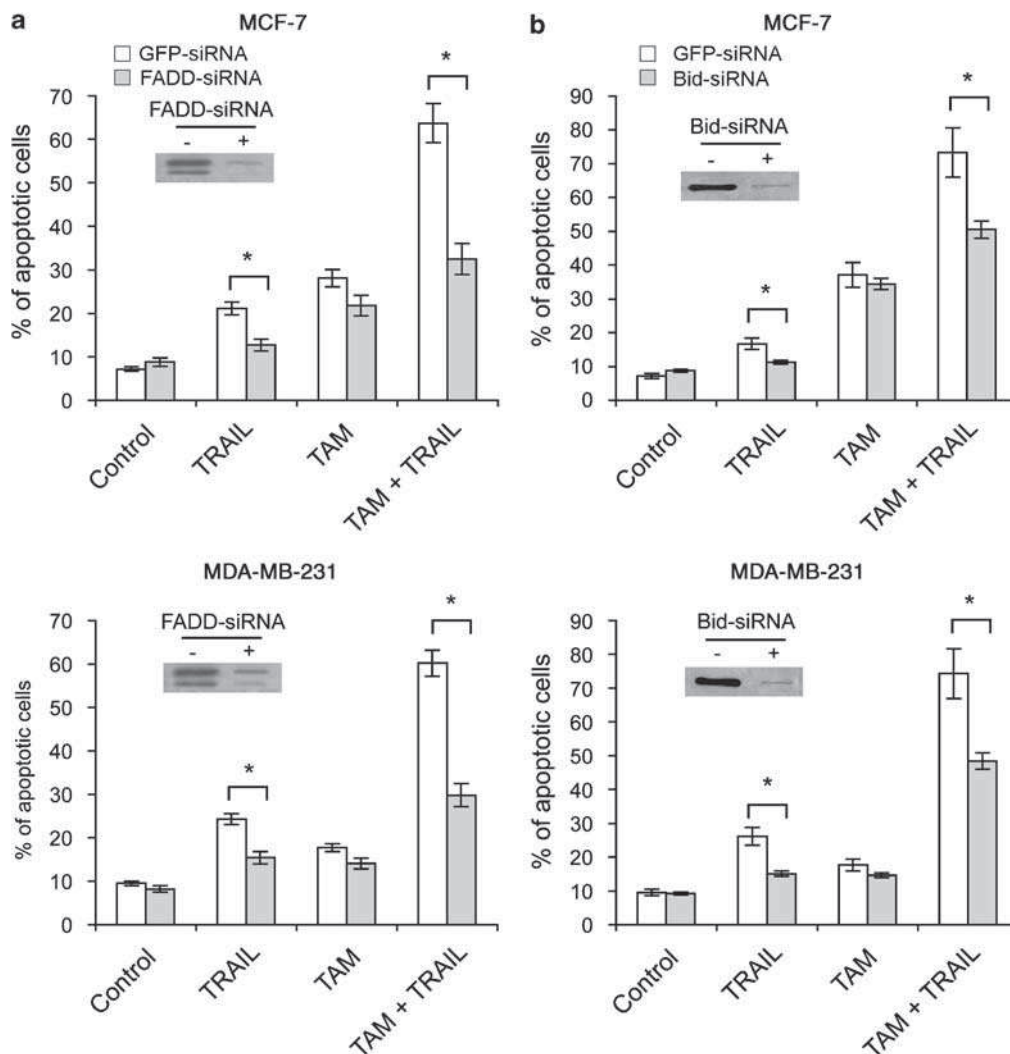


Figure 3 Effects of FADD-siRNA and Bid-siRNA on synergistic apoptosis induction. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were subjected to one round of transfection with FADD-specific siRNA (a) or two sequential rounds of transfection with Bid-specific siRNA (b) as described (Grambihler *et al.*, 2003; Broaddus *et al.*, 2005). Twenty-four hours after transfection, cells were treated in serum-free medium with $2\mu\text{M}$ tamoxifen (TAM) and 1 ng ml^{-1} tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) alone or both for 24 h. Results were from one experiment representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ (Student's *t*-test).

remains unknown. One explanation might be the involvement of JNK pathway. In this regard, activated JNK has been reported to enhance cleavage of Bid by enhanced activation of caspase 8 and to stimulate the expression of proapoptotic members such as Bid and Bax (Nakano *et al.*, 2006). Moreover, Yanamadala *et al.* (2007) have recently reported that phosphorylation of Bcl-2 by JNK leads to degradation of Bcl-2 protein via the proteasome pathway.

Abrogation of tumor growth by cotreatment with TAM and TRAIL in SCID mice

Because TAM and TRAIL synergized to induce apoptosis of breast cancer cells *in vitro*, we examined the effectiveness of combined treatment in an ER- α -negative breast cancer xenograft model. As shown in Figure 4a, TRAIL slightly reduced tumor growth while TAM had no significant effect when compared to

control mice. Interestingly, combined treatment completely arrested tumor growth, as tumor volume remained the same during the periods of treatment. Quantification of terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL)-positive cells in tumor sections showed that TAM had no significant effect on apoptosis induction, whereas TRAIL alone or in combination with TAM induced more than two- or sevenfold increase of apoptosis, respectively (Figures 4b and c). Interestingly, intensity of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression index, an indicator of cell proliferation, was similar in tumors of different animal groups (Figure 4d). Thus, in the ER- α -negative breast cancer xenograft model, cotreatment induced apoptosis without modification of cell proliferation. Importantly, cotreatment did not affect survival in normal breast epithelial cells *in vitro* and was well tolerated by mice during the periods of treatment, as

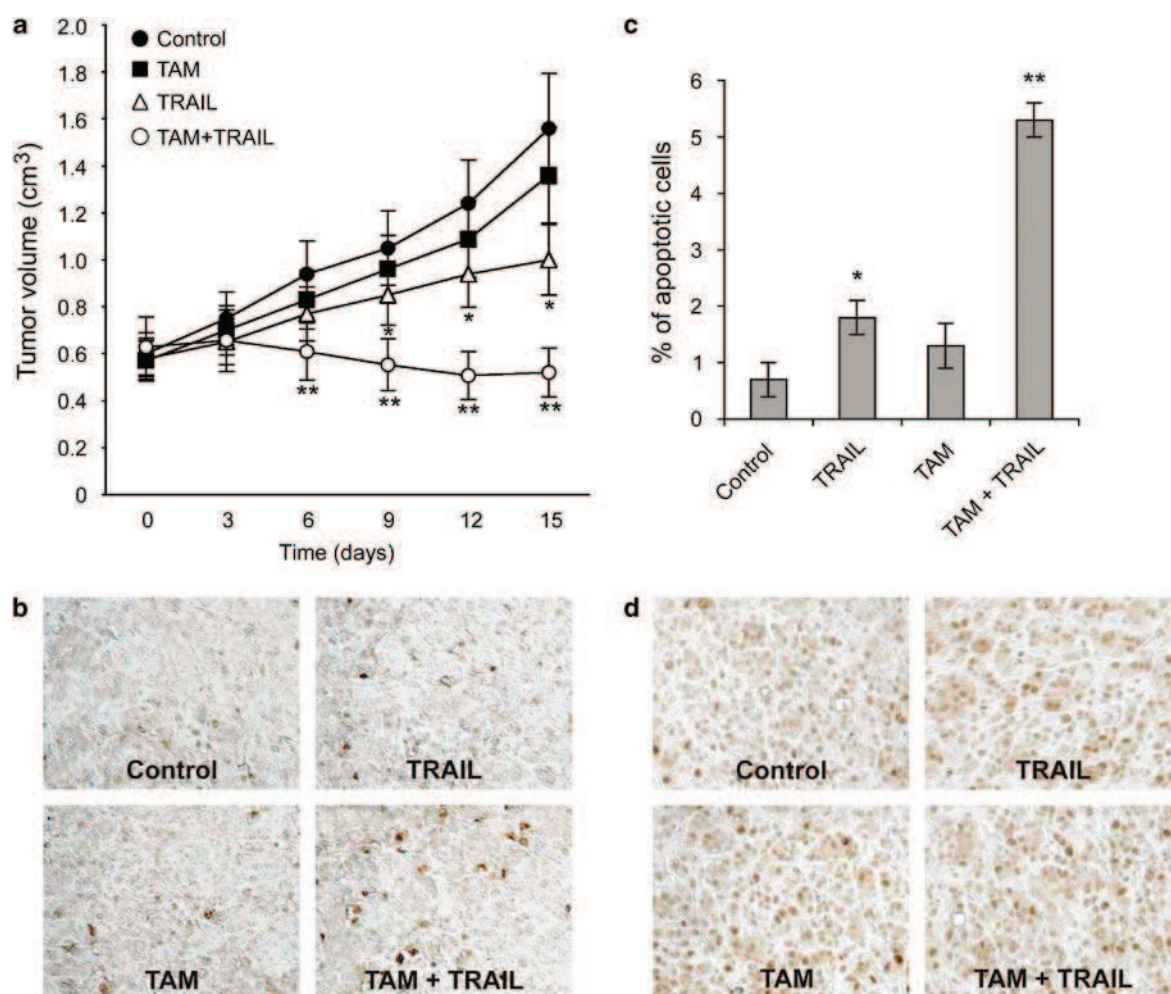


Figure 4 Effects of cotreatment with tamoxifen (TAM) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) on tumor growth in SCID mice. The ER- α -negative breast cancer cells MDA-MB-231 (2×10^6) were injected subcutaneously into the right flank of 6-week-old SCID mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France). Tumor volumes were monitored every 3 days with calipers and calculated using the formula: $4/3\pi \times r_1^2 \times r_2$, where r_1 and r_2 are the minor and the major dimensions, respectively. When tumor volume attained 0.6 cm^3 , the animals were grouped ($n=8$ for each group) and treated with an intraperitoneal injection of TRAIL ($30\ \mu\text{g}$ in $100\ \mu\text{l}$ PBS) and/or TAM ($250\ \mu\text{g}$ in $100\ \mu\text{l}$ corn oil) every other day for 15 days. (a) Tumor volumes at different times of treatment. Data represent mean \pm s.d. ($n=8$). (b and c) Analysis of apoptosis after TUNEL staining (ApopTag Peroxidase *in situ* Apoptosis Detection Kit, R&D systems, Lille, France). (d) Analysis of cell proliferation after PCNA staining (Santa Cruz, Le Perray en Yvelines, France). Significant differences (Student's *t*-test) between treated and untreated mice are indicated with asterisks. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

there were no abnormal appearance and behavior (ruffled fur/lethargy) in mice. Moreover, no modification in body weight was observed after 15 days of treatment (data not shown).

Up to the present, TAM has been used to treat ER- α -positive breast cancers. However, approximately 40–50% of primary breast cancers are either ER- α -negative or ER- α -positive but resistant to TAM (Osborne, 1998). Thus a substantial proportion of breast cancers are not suited to treatment with TAM. It is now admitted that resistance to apoptosis is a major cause of nonresponsiveness of cancers leading to treatment failure. An exciting outcome from our study is the observation that suboptimal doses of both TAM and TRAIL can synergize to induce cell death even in ER- α -negative breast cancer cells. This raises the possibility to use TAM in combination with TRAIL for breast cancers,

regardless of ER- α status. Moreover, cotreatment with low doses may be advantageous since high concentrations found to be active *in vitro* may often not be achieved *in vivo*. This is also of importance in reducing potential toxic side effects of each agent. Altogether, our findings may open up a new therapeutic window in the fight against breast cancers by combined use of TAM and TRAIL.

Acknowledgements

The study is supported by grants from INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2006), le Ministère de l'Éducation Nationale and the Région Nord/Pas-de-Calais. Chann Lagadec was the recipient of a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

References

- Broaddus VC, Dansen TB, Abayasiriwardana KS, Wilson SM, Finch AJ, Swigart LB *et al.* (2005). Bid mediates apoptotic synergy between tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and DNA damage. *J Biol Chem* **280**: 12486–12493.
- 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.
- Duiker EW, Mom CH, de Jong S, Willemsse PH, Gietema JA, van der Zee AG *et al.* (2006). The clinical trial of TRAIL. *Eur J Cancer* **42**: 2233–2240.
- Gelman EP. (1997). Tamoxifen for the treatment of malignancies other than breast and endometrial carcinoma. *Semin Oncol* **24**(Suppl): S65–S70.
- Grambihler A, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. (2003). cFLIP-L inhibits p38 MAPK activation: an additional anti-apoptotic mechanism in bile acid-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 26831–26837.
- Hawkins RA, Arends MJ, Ritchie AA, Langdon S, Miller WR. (2000). Tamoxifen increases apoptosis but does not influence markers of proliferation in an MCF-7 xenograft model of breast cancer. *Breast J* **9**: 96–106.
- Jordan VC. (1992). The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer. *Cancer* **70**(Suppl): S977–S982.
- Kallio A, Zheng A, Dahllund J, Heiskanen KM, Härkönen P. (2005). Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* **10**: 1395–1410.
- LeBlanc HN, Ashkenazi A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* **10**: 66–75.
- Lover RR. (1989). Tamoxifen therapy in primary breast cancer: biology, efficacy, and side effects. *J Clin Oncol* **7**: 803–815.
- Mandlekar S, Kong A-NT. (2001). Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* **6**: 469–477.
- McClay EF, McClay ME, Monroe L, Baron PL, Cole DJ, O'Brien PH *et al.* (2000). The effect of tamoxifen and cisplatin on the disease-free and overall survival of patients with high risk malignant melanoma. *Br J Cancer* **83**: 16–21.
- Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Piao JH, Xue X, Okumura K. (2006). Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Cell Death Differ* **13**: 730–737.
- Nazarewicz RR, Zenebe WJ, Parihar A, Larson SK, Alidema E, Choi J *et al.* (2007). Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res* **67**: 1282–1290.
- Osborne CK. (1998). Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* **339**: 1609–1618.
- Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* **20**: 2122–2133.
- Yanamadala V, Negoro H, Gunaratnam L, Kong T, Denker BM. (2007). Galpha 12 stimulates apoptosis in epithelial cells through JNK1 mediated Bcl-2 degradation and upregulation of Ikappa B-alpha. *J Biol Chem* **282**: 24352–24363.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>).

Chapitre 6

Bibliographie

Bibliographie

Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, Mougel A, Page A, Romon R, Nurcombe V, Le Bourhis X, Hondermarck H (2008). Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 68: 346-51.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3983-8.

Allemand H, Seradour B, Weill A, 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 AM, Romeo DL, Pastura G, Mesiti M, Cascinu S, La Torre F (2001). Nerve growth factor receptor immunoreactivity in breast cancer patients. *Cancer Invest* 19: 692-7.

Arakawa T, Haniu M, Narhi LO, Miller JA, Talvenheimo J, Philo JS, Chute HT, Matheson C, Carnahan J, Louis JC, 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.

Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, Ghiso N, Cao Y, Klauber N, Frank D, Brownlee M, Flynn E, Parangi S, Byers HR, Folkman J (1997). Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 861-6.

Arevalo JC, Conde B, Hempstead BL, Chao MV, Martin-Zanca D, Perez P (2000). TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* 20: 5908-16.

Arnold A, Papanikolaou A (2005). Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 23: 4215-24.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM (1999a). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85: 221-8.

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM (1999b). VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18: 3964-72.

Au CW, Siu MK, Liao X, Wong ES, Ngan HY, Tam KF, Chan DC, Chan QK, Cheung AN (2009). Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in ovarian cancers - Effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome. *Cancer Lett* 281: 151-61.

Auguste P, Lemièrre S, Larrièu-Lahargue F, Bikfalvi A (2005). Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol* 54: 53-61.

Introduction

Aurikko JP, Ruotolo BT, Grossmann JG, Moncrieffe MC, Stephens E, Leppanen VM, Robinson CV, Saarma M, Bradshaw RA, Blundell TL (2005). Characterization of symmetric complexes of nerve growth factor and the ectodomain of the pan-neurotrophin receptor, p75NTR. *J Biol Chem* 280: 33453-60.

Baeriswyl V, Christofori G (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.*

Baldwin AN, Bitler CM, Welcher AA, Shooter EM (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 MJ, Naylor RL, Robertson AG, Allen SJ, Dawbarn D, Brady RL (2001). Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5. *Structure* 9: 1191-9.

Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, 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 YA, Edgar D, Thoenen H (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1: 549-53.

Bauer KS, Cude KJ, Dixon SC, Kruger EA, Figg WD (2000). Carboxyamido-triazole inhibits angiogenesis by blocking the calcium-mediated nitric-oxide synthase-vascular endothelial growth factor pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 31-7.

Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Pitelli MR, Viale G, Giavazzi R, Taraboletti G (1996). The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 2: 1843-9.

Bergers G, Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3: 401-10.

Bertolini F, Mancuso P, Braidotti P, Shaked Y, Kerbel RS (2009). The multiple personality disorder phenotype(s) of circulating endothelial cells in cancer. *Biochim Biophys Acta.*

Bertolini F, Paul S, Mancuso P, Monestiroli S, Gobbi A, Shaked Y, Kerbel RS (2003). Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer Res* 63: 4342-6.

Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS (2006). The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer* 6: 835-45.

Bieche I, Lidereau R (1997). [Somatic genetics of breast cancer]. *Bull Cancer* 84: 83-96.

Bibliographie

Blancato J, Singh B, Liu A, Liao DJ, Dickson RB (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.

Bloch I A, Bloch I R (2007). A cell-biological model of p75NTR signaling. *J Neurochem* 102: 289-305.

Bloch I A, Blumenstein L, Ahmadian MR (2004). Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci* 20: 2321-35.

Bocsi G, Nicolaou KC, Kerbel RS (2002). Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenic window for various chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 62: 6938-43.

Bonnet D, Dick JE (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-7.

Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E (2003). Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 97: 1573-81.

Bosco EE, Knudsen ES (2007). RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis and treatment. *Cell Cycle* 6: 667-71.

Bose CK (2005). Role of nerve growth factor and FSH receptor in epithelial ovarian cancer. *Reprod Biomed Online* 11: 194-7.

Bracci-Laudiero L, Celestino D, Starace G, Antonelli A, Lambiase A, Procoli A, Rumi C, Lai M, Picardi A, Ballatore G, Bonini S, Aloe L (2003). CD34-positive cells in human umbilical cord blood express nerve growth factor and its specific receptor TrkA. *J Neuroimmunol* 136: 130-9.

Brat DJ, Van Meir EG (2001). Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research. *Am J Pathol* 158: 789-96.

Brem SS, Jensen HM, Gullino PM (1978). Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer* 41: 239-44.

Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, Thorner J, Gibson HL, Brake AJ, Barr PJ, 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 FC, Fainzilber M (2004). Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep* 5: 867-71.

Introduction

Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J (2000). Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 60: 1878-86.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-68.

Brunner F, Maier R, Andrew P, Wolkart G, Zechner R, Mayer B (2003). Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 57: 55-62.

Bui NT, Konig HG, Culmsee C, Bauerbach E, Poppe M, Krieglstein J, Prehn JH (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 RK, Reeves WJ, Jr. (1974a). Tissue culture studies on pleural effusions from breast carcinoma patients. *Cancer Res* 34: 801-9.

Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. (1974b). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 53: 661-74.

Calza L, Giardino L, Giuliani A, Aloe L, Levi-Montalcini R (2001). Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4160-5.

Campos X, Munoz Y, Selman A, Yazigi R, Moyano L, Weinstein-Opppenheimer C, Lara HE, 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.

Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P, Zappala G, Pafumi C, Bernardini R (2002). Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB J* 16: 1307-9.

Caporali A, Emanuelli C (2009). Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiol Rev* 89: 279-308.

Caporali A, Pani E, Horrevoets AJ, Kraenkel N, Oikawa A, Sala-Newby GB, Meloni M, Cristofaro B, Graiani G, Leroyer AS, Boulanger CM, Spinetti G, Yoon SO, Madeddu P, Emanuelli C (2008). Neurotrophin p75 receptor (p75NTR) promotes endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: implications for diabetes-induced impaired neovascularization in ischemic limb muscles. *Circ Res* 103: e15-26.

Bibliographie

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282: 1318-21.

Carmeliet P (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-95.

Chang CF, Westbrook R, Ma J, Cao D (2007). Transforming growth factor-beta signaling in breast cancer. *Front Biosci* 12: 4393-401.

Chao MV (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4: 299-309.

Chao MV, Bothwell MA, Ross AH, Koprowski H, Lanahan AA, Buck CR, Sehgal A (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 232: 518-21.

Chao MV, Hempstead BL (1995). p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* 18: 321-6.

Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A (2001a). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 276: 9519-25.

Chen EY, Mazure NM, Cooper JA, Giaccia AJ (2001b). Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res* 61: 2429-33.

Chen J, Zacharek A, Zhang C, Jiang H, Li Y, Roberts C, Lu M, Kapke A, Chopp M (2005a). Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci* 25: 2366-75.

Chen J, Zhang C, Jiang H, Li Y, Zhang L, Robin A, Katakowski M, Lu M, Chopp M (2005b). Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 281-90.

Chen L, Shen R, Ye Y, Pu XA, Liu X, Duan W, Wen J, Zimmerer J, Wang Y, Liu Y, Lasky LC, Heerema NA, Perrotti D, Ozato K, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Yates AJ, Carson WE, 3rd, Lin H, Barsky SH, Gao JX (2007). Precancerous stem cells have the potential for both benign and malignant differentiation. *PLoS One* 2: e293.

Chiaromello A, Neuman K, Palm K, Metsis M, Neuman T (1995). Helix-loop-helix transcription factors mediate activation and repression of the p75LNGFR gene. *Mol Cell Biol* 15: 6036-44.

Choong PF, Nadesapillai AP (2003). Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop Relat Res*: S46-58.

Introduction

Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N, Perna F, Fabbroni V, Di Felice A, Perigli G, Mazzanti R, Masini E (2004). Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10: 2694-704.

Clary DO, Reichardt LF (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.

Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 275: 25733-41.

Cohen S, Levi-Montalcini R, 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.

Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, Baili P, Rachet B, Gatta G, Hakulinen T, Micheli A, Sant M, Weir HK, Elwood JM, Tsukuma H, Koifman S, GA ES, Francisci S, Santaquilani M, Verdecchia A, Storm HH, Young JL (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol* 9: 730-56.

Colleoni M, Orlando L, Sanna G, Rocca A, Maisonneuve P, Peruzzotti G, Ghisini R, Sandri MT, Zorzino L, Nole F, Viale G, Goldhirsch A (2006). Metronomic low-dose oral cyclophosphamide and methotrexate plus or minus thalidomide in metastatic breast cancer: antitumor activity and biological effects. *Ann Oncol* 17: 232-8.

Colleoni M, Rocca A, Sandri MT, Zorzino L, Masci G, Nole F, Peruzzotti G, Robertson C, Orlando L, Cinieri S, de BF, Viale G, Goldhirsch A (2002). Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. *Ann Oncol* 13: 73-80.

Coulson EJ, Reid K, Baca M, Shipham KA, Hulett SM, Kilpatrick TJ, Bartlett PF (2000). Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem* 275: 30537-45.

Coulson EJ, Reid K, Barrett GL, Bartlett PF (1999). p75 neurotrophin receptor-mediated neuronal death is promoted by Bcl-2 and prevented by Bcl-xL. *J Biol Chem* 274: 16387-91.

Cowell S, Knauper V, Stewart ML, D'Ortho MP, Stanton H, Hembry RM, Lopez-Otin C, Reynolds JJ, Murphy G (1998). Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochem J* 331 (Pt 2): 453-8.

Cowin P, Rowlands TM, Hatsell SJ (2005). Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* 17: 499-508.

Bibliographie

Daenen LG, Shaked Y, Man S, Xu P, Voest EE, Hoffman RM, Chaplin DJ, Kerbel RS (2009). Low-dose metronomic cyclophosphamide combined with vascular disrupting therapy induces potent antitumor activity in preclinical human tumor xenograft models. *Mol Cancer Ther* 8: 2872-81.

Dales JP, Garcia S, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Haddad O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C (2005). Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1 α predicts early relapse in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients. *Int J Cancer* 116: 734-9.

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N (1994). The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 483-9.

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: 119-28.

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

de Pablo Y, Perez-Garcia MJ, Georgieva MV, Sanchis D, Lindqvist N, Soler RM, Comella JX, Llovera M (2008). Tyr-701 is a new regulatory site for neurotrophin receptor TrkA trafficking and function. *J Neurochem* 104: 124-39.

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

Dellapasqua S, Bertolini F, Bagnardi V, Campagnoli E, Scarano E, Torrisi R, Shaked Y, Mancuso P, Goldhirsch A, Rocca A, Pietri E, Colleoni M (2008). Metronomic cyclophosphamide and capecitabine combined with bevacizumab in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 26: 4899-905.

Descamps S, Lebourhis X, Delehedde M, Boilly B, 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, Peyrat JP (2001a). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res* 61: 4337-40.

Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V, Le Bourhis X, Boilly B, Peyrat JP, Hondermarck H (2001b). Nerve growth factor stimulates proliferation and

Introduction

survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 276: 17864-70.

Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM (2000). Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477: 258-62.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-5.

Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, Ojeda SR (2001). Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology* 142: 2078-86.

Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao MV, Hannun YA (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 265: 1596-9.

Dolle JP, Rezvan A, Allen FD, Lazarovici P, Lelkes PI (2005a). 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, Hondermarck H (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 22: 5592-601.

Dolle L, Oliveira MJ, Bruyneel E, Hondermarck H, Bracke M (2005b). Nerve growth factor mediates its pro-invasive effect in parallel with the release of a soluble E-cadherin fragment from breast cancer MCF-7/AZ cells. *J Dairy Res* 72 Spec No: 20-6.

Dome B, Hendrix MJ, Paku S, Tovari J, Timar J (2007). Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 170: 1-15.

Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, Wang S, Ibanez CF, Rafii S, Hempstead BL (2000). Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 127: 4531-40.

Duval M, Le Boeuf F, Huot J, Gratton JP (2007). Src-mediated phosphorylation of Hsp90 in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is required for VEGF receptor-2 signaling to endothelial NO synthase. *Mol Biol Cell* 18: 4659-68.

Dvorak HF (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315: 1650-9.

Dvorak HF (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 20: 4368-80.

Bibliographie

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146: 1029-39.

Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM (1999). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 97-132.

Eide FF, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY, Reichardt LF (1996). Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 16: 3123-9.

Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, Madeddu P (2002). Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation* 106: 2257-62.

Endo Y, Deonauth K, Prahalad P, Hoxter B, Zhu Y, Byers SW (2008). Role of Sox-9, ER81 and VE-cadherin in retinoic acid-mediated trans-differentiation of breast cancer cells. *PLoS One* 3: e2714.

Fahnestock M, Yu G, Michalski B, Mathew S, Colquhoun A, Ross GM, Coughlin MD (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, 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.

Fayette J, Soria JC, Armand JP (2005). Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer* 41: 1109-16.

Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 59: 3915-8.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-76.

Folkman J (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-6.

Fotsis T, Breit S, Lutz W, Rossler J, Hatzi E, Schwab M, Schweigerer L (1999). Down-regulation of endothelial cell growth inhibitors by enhanced MYCN oncogene expression in human neuroblastoma cells. *Eur J Biochem* 263: 757-64.

Fox SB, Generali DG, Harris AL (2007). Breast tumour angiogenesis. *Breast Cancer Res* 9: 216.

Introduction

Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL (2002). Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 277: 38205-11.

Furstenberger G, von Moos R, Lucas R, Thurlimann B, Senn HJ, Hamacher J, Boneberg EM (2006). Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *Br J Cancer* 94: 524-31.

Furstenberger G, von Moos R, Senn HJ, Boneberg EM (2005). Real-time PCR of CD146 mRNA in peripheral blood enables the relative quantification of circulating endothelial cells and is an indicator of angiogenesis. *Br J Cancer* 93: 793-8.

Gabellini C, Del Bufalo D, Zupi G (2006). Involvement of RB gene family in tumor angiogenesis. *Oncogene* 25: 5326-32.

Garcia M, Derocq D, Freiss G, 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.

Gasparini G (2000). Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 5 Suppl 1: 37-44.

Geetha T, Kenchappa RS, Wooten MW, Carter BD (2005). TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *EMBO J* 24: 3859-68.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273: 30336-43.

Ghiran I, Glodek AM, Weaver G, Klickstein LB, Nicholson-Weller A (2008). Ligation of erythrocyte CR1 induces its clustering in complex with scaffolding protein FAP-1. *Blood* 112: 3465-73.

Goodale D, Phay C, Brown W, Gray-Statchuk L, Furlong P, Lock M, Chin-Yee I, Keeney M, Allan AL (2009). Flow cytometric assessment of monocyte activation markers and circulating endothelial cells in patients with localized or metastatic breast cancer. *Cytometry B Clin Cytom* 76: 107-17.

Graiani G, Emanuelli C, Desortes E, Van Linthout S, Pinna A, Figueroa CD, Manni L, Madeddu P (2004). Nerve growth factor promotes reparative angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis in cutaneous wounds of Type 1 diabetic mice. *Diabetologia* 47: 1047-54.

Bibliographie

Grant DS, Williams TL, Zahaczewsky M, Dicker AP (2003). Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *Int J Cancer* 104: 121-9.

Grob PM, Ross AH, Koprowski H, Bothwell M (1985). Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 260: 8044-9.

Guinebretiere JM, Le Monique G, Gavaille A, Bahi J, Contesso G (1994). Angiogenesis and risk of breast cancer in women with fibrocystic disease. *J Natl Cancer Inst* 86: 635-6.

Gunsilius E (2003). Evidence from a leukemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 522: 17-24.

Hallbook F, Ibanez CF, Persson H (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6: 845-58.

Hamanou M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT, Davies AM (1999). p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 14: 28-40.

Han Y, Qi Y, Kang J, Li N, Tian X, Yan C (2008). Nerve growth factor promotes formation of lumen-like structures in vitro through inducing apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 685-91.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Hansen-Algenstaedt N, Algenstaedt P, Schaefer C, Hamann A, Wolfram L, Cingoz G, Kilic N, Schwarzloh B, Schroeder M, Joscheck C, Wiesner L, Ruther W, Ergun S (2006). Neural driven angiogenesis by overexpression of nerve growth factor. *Histochem Cell Biol* 125: 637-49.

Harris AL (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2: 38-47.

He XL, Garcia KC (2004). Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304: 870-5.

Heimann R, Lan F, McBride R, Hellman S (2000). Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res* 60: 298-304.

Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W (1999). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94: 1561-7.

Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 3: 411-21.

Introduction

Hermann C, Assmus B, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S (2000). Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 402-9.

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

Hicklin DJ, Ellis LM (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23: 1011-27.

Hida K, Hida Y, Amin DN, Flint AF, Panigrahy D, Morton CC, Klagsbrun M (2004). Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res* 64: 8249-55.

Hofer MM, Barde YA (1988). Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature* 331: 261-2.

Hofer T, Desbaillets I, Hopfl G, Gassmann M, Wenger RH (2001). Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1alpha activation cascade: implications for HIF-1alpha gene therapy. *FASEB J* 15: 2715-7.

Huang EJ, Reichardt LF (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72: 609-42.

Hur E, Chang KY, Lee E, Lee SK, Park H (2001). Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Pharmacol* 59: 1216-24.

Ilic D, Almeida EA, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, Damsky CH (1998). Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol* 143: 547-60.

Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L, Le Beau MM, Espinosa R, 3rd, Squinto SP, et al. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3060-4.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292: 464-8.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-72.

Jain RK (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685-93.

Bibliographie

Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL (1997). V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* 57: 5328-35.

Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 12: 363-9.

Jin H, Pan Y, He L, Zhai H, Li X, Zhao L, Sun L, Liu J, Hong L, Song J, Xie H, Gao J, Han S, Li Y, Fan D (2007a). p75 neurotrophin receptor inhibits invasion and metastasis of gastric cancer. *Mol Cancer Res* 5: 423-33.

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

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

Jones KR, Reichardt LF (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8060-4.

Julio-Pieper M, Lozada P, Tapia V, Vega M, Miranda C, Vantman D, Ojeda SR, Romero C (2009). Nerve growth factor induces vascular endothelial growth factor expression in granulosa cells via a trkA receptor/mitogen-activated protein kinase-extracellularly regulated kinase 2-dependent pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 3065-71.

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

Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE (2001). Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 276: 18169-77.

Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF (1991). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252: 554-8.

Karni R, Dor Y, Keshet E, Meyuhas O, Levitzki A (2002). Activated pp60c-Src leads to elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α expression under normoxia. *J Biol Chem* 277: 42919-25.

Kenchappa RS, Zampieri N, Chao MV, Barker PA, Teng HK, Hempstead BL, Carter BD (2006). Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* 50: 219-32.

Introduction

Kendall SE, Ryczko MC, Mehan M, Verdi JM (2003). Characterization of NADE, NRIF and SC-1 gene expression during mouse neurogenesis. *Brain Res Dev Brain Res* 144: 151-8.

Kerbel R, Folkman J (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2: 727-39.

Kerbel RS, Kamen BA (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 4: 423-36.

Kermani P, Rafii D, Jin DK, Whitlock P, Schaffer W, Chiang A, Vincent L, Friedrich M, Shido K, Hackett NR, Crystal RG, Rafii S, Hempstead BL (2005). Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB⁺ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest* 115: 653-63.

Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV (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.

Khursigara G, Orlinick JR, Chao MV (1999). Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* 274: 2597-600.

Kim H, Li Q, Hempstead BL, Madri JA (2004). Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J Biol Chem* 279: 33538-46.

Kim HK, Song KS, Kim HO, Chung JH, Lee KR, Lee YJ, Lee DH, Lee ES, Ryu KW, Bae JM (2003). Circulating numbers of endothelial progenitor cells in patients with gastric and breast cancer. *Cancer Lett* 198: 83-8.

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362: 841-4.

Kim LC, Song L, Haura EB (2009a). Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 6: 587-95.

Kim MR, Choi HS, Yang JW, Park BC, Kim JA, Kang KW (2009b). Enhancement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in tamoxifen-resistant breast cancer cells: role of Pin1 overexpression. *Mol Cancer Ther* 8: 2163-71.

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

Bibliographie

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

Klement G, Huang P, Mayer B, Green SK, Man S, Bohlen P, Hicklin D, Kerbel RS (2002). Differences in therapeutic indexes of combination metronomic chemotherapy and an anti-VEGFR-2 antibody in multidrug-resistant human breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 8: 221-32.

Klos KS, Wyszomierski SL, Sun M, Tan M, Zhou X, Li P, Yang W, Yin G, Hittelman WN, Yu D (2006). ErbB2 increases vascular endothelial growth factor protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin/p70S6K leading to increased angiogenesis and spontaneous metastasis of human breast cancer cells. *Cancer Res* 66: 2028-37.

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

Kowanetz M, Ferrara N (2006). Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res* 12: 5018-22.

Krygier S, Djakiew D (2001). Molecular characterization of the loss of p75(NTR) expression in human prostate tumor cells. *Mol Carcinog* 31: 46-55.

Krygier S, 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.

Labouyrie E, Dubus P, Groppi A, Mahon FX, Ferrer J, Parrens M, Reiffers J, de Mascarel A, Merlio JP (1999). Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol* 154: 405-15.

Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, Foveau B, Vanhecke E, Romon R, Toillon RA, Oxombre B, Hondermarck H, Le Bourhis X (2009). TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* 28: 1960-70.

Landry J, Huot J (1999). Regulation of actin dynamics by stress-activated protein kinase 2 (SAPK2)-dependent phosphorylation of heat-shock protein of 27 kDa (Hsp27). *Biochem Soc Symp* 64: 79-89.

Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 21: 3995-4004.

Lazarovici P, Gazit A, Staniszevska I, Marcinkiewicz C, Lelkes PI (2006). Nerve growth factor (NGF) promotes angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane. *Endothelium* 13: 51-9.

Introduction

Lee H, Overall CM, McCulloch CA, Sodek J (2006). A critical role for the membrane-type 1 matrix metalloproteinase in collagen phagocytosis. *Mol Biol Cell* 17: 4812-26.

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294: 1945-8.

Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 116: 321-61.

Liekens S, De Clercq E, Neyts J (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 61: 253-70.

Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105: 71-7.

Linderholm B, Andersson J, Lindh B, Beckman L, Erlanson M, Edin K, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R (2004). Overexpression of c-erbB-2 is related to a higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and constitutes an independent prognostic factor in primary node-positive breast cancer after adjuvant systemic treatment. *Eur J Cancer* 40: 33-42.

Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R (1998). Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 16: 3121-8.

Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, Elmberger G, Skoog L, Lehtio J, Lewensohn R (2009). Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 20: 1639-46.

Lipsick JS, Wang DM (1999). Transformation by v-Myb. *Oncogene* 18: 3047-55.

Lonze BE, Ginty DD (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35: 605-23.

Lu B, Pang PT, Woo NH (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6: 603-14.

Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7: 1194-201.

Bibliographie

Mamidipudi V, Li X, Wooten MW (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 ML, Wooten MW (2004). Regulation of interleukin receptor-associated kinase (IRAK) phosphorylation and signaling by iota protein kinase C. *J Biol Chem* 279: 4161-5.

Man S, Bocci G, Francia G, Green SK, Jothy S, Hanahan D, Bohlen P, Hicklin DJ, Bergers G, Kerbel RS (2002). Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water. *Cancer Res* 62: 2731-5.

Mancuso P, Colleoni M, Calleri A, Orlando L, Maisonneuve P, Pruneri G, Agliano A, Goldhirsch A, Shaked Y, Kerbel RS, Bertolini F (2006). Circulating endothelial-cell kinetics and viability predict survival in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy. *Blood* 108: 452-9.

Marshall CJ (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179-85.

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

Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 20: 5197-206.

Matsuo Y, Campbell PM, Brekken RA, Sung B, Ouellette MM, Fleming JB, Aggarwal BB, Der CJ, Guha S (2009). K-Ras promotes angiogenesis mediated by immortalized human pancreatic epithelial cells through mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Cancer Res* 7: 799-808.

Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ (1997). Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* 90: 3322-31.

McDonald DM, Choyke PL (2003). Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* 9: 713-25.

Meakin SO, Suter U, Drinkwater CC, Welcher AA, Shooter EM (1992). The rat trk protooncogene product exhibits properties characteristic of the slow nerve growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2374-8.

Introduction

Metsis M, Timmusk T, Allikmets R, Saarma M, 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.

Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL (2006). Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 333-57.

Miller KD (2003). E2100: a phase III trial of paclitaxel versus paclitaxel/bevacizumab for metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 3: 421-2.

Morabito A, Piccirillo MC, Falasconi F, De Feo G, Del Giudice A, Bryce J, Di Maio M, De Maio E, Normanno N, Perrone F (2009). Vandetanib (ZD6474), a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinases: current status and future directions. *Oncologist* 14: 378-90.

Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M (1996). Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* 270: H411-5.

Moser KV, Reindl M, Blasig I, Humpel C (2004). Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, express NGF receptors and secrete NGF after inflammation. *Brain Res* 1017: 53-60.

Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276: 12660-6.

Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP (1995). Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 55: 6161-5.

Munoz R, Man S, Shaked Y, Lee CR, Wong J, Francia G, Kerbel RS (2006). Highly efficacious nontoxic preclinical treatment for advanced metastatic breast cancer using combination oral UFT-cyclophosphamide metronomic chemotherapy. *Cancer Res* 66: 3386-91.

Munoz-Chapuli R, Quesada AR, Angel Medina M (2004). Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61: 2224-43.

Mura M, dos Santos CC, Stewart D, Liu M (2004). Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. *J Appl Physiol* 97: 1605-17.

Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF (2008). Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* 11: 109-19.

Bibliographie

Nagy JA, Feng D, Vasile E, Wong WH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF (2006). Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. *Lab Invest* 86: 767-80.

Naik RP, Jin D, Chuang E, Gold EG, Tousimis EA, Moore AL, Christos PJ, de Dalmas T, Donovan D, Rafii S, Vahdat LT (2008). Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 107: 133-8.

Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B (2000). Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 470: 113-7.

Nakamura K, Martin KC, Jackson JK, Beppu K, Woo CW, Thiele CJ (2006). Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 α in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 66: 4249-55.

Namkoong S, Lee SJ, Kim CK, Kim YM, Chung HT, Lee H, Han JA, Ha KS, Kwon YG (2005). Prostaglandin E2 stimulates angiogenesis by activating the nitric oxide/cGMP pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Exp Mol Med* 37: 588-600.

Naveilhan P, Neveu I, Baudet C, Funakoshi H, Wion D, Brachet P, Metsis M (1996). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of the low-affinity neurotrophin receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 41: 259-68.

Neumuller J, Neumuller-Guber SE, Lipovac M, Mosgoeller W, Vetterlein M, Pavelka M, Huber J (2006). Immunological and ultrastructural characterization of endothelial cell cultures differentiated from human cord blood derived endothelial progenitor cells. *Histochem Cell Biol* 126: 649-64.

Ng SS, Sparreboom A, Shaked Y, Lee C, Man S, Desai N, Soon-Shiong P, Figg WD, Kerbel RS (2006). Influence of formulation vehicle on metronomic taxane chemotherapy: albumin-bound versus cremophor EL-based paclitaxel. *Clin Cancer Res* 12: 4331-8.

Ngo CV, Gee M, Akhtar N, Yu D, Volpert O, Auerbach R, Thomas-Tikhonenko A (2000). An in vivo function for the transforming Myc protein: elicitation of the angiogenic phenotype. *Cell Growth Differ* 11: 201-10.

Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ (2001). Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 960-70.

Nimnual AS, Yatsula BA, Bar-Sagi D (1998). Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* 279: 560-3.

Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S, Heikamp E, McDevitt MR, Scheinberg DA, Benezra R, Mittal V (2007). Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev* 21: 1546-58.

Introduction

Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM (2005). p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 15: 49-57.

Obermeier A, Halfter H, Wiesmuller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A (1993). Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *EMBO J* 12: 933-41.

Odegaard E, Staff AC, Abeler VM, Kopolovic J, Onsrud M, Lazarovici P, Davidson B (2007). The activated nerve growth factor receptor p-TrkA is selectively expressed in advanced-stage ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 38: 140-6.

Overmoyer B, Fu P, Hoppel C, Radivoyevitch T, Shenk R, Persons M, Silverman P, Robertson K, Ziats NP, Wasman JK, Abdul-Karim FW, Jesberger JA, Duerk J, Hartman P, Hanks S, Lewin J, Dowlati A, McCrae K, Ivy P, Remick SC (2007). Inflammatory breast cancer as a model disease to study tumor angiogenesis: results of a phase IB trial of combination SU5416 and doxorubicin. *Clin Cancer Res* 13: 5862-8.

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, 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 DU, Pham CG, Nelsbach AH, Melis T, De Smaele E, Tang WJ, D'Adamio L, Franzoso G (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 CG, Bubici C, Franzoso G (2004b). Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* 117: 5197-208.

Papatsoris AG, Liolitsa D, Deliveliotis C (2007). Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 16: 303-9.

Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, Ledda F, Ziche M (1998). Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem* 273: 4220-6.

Park JA, Lee JY, Sato TA, Koh JY (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.

Park MJ, Kwak HJ, Lee HC, Yoo DH, Park IC, Kim MS, Lee SH, Rhee CH, Hong SI (2007). Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and AP-2 transcription factor. *J Biol Chem* 282: 30485-96.

Bibliographie

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153-83.

Perez P, Coll PM, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV (1995). NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol Cell Neurosci* 6: 97-105.

Polyak K, Hahn WC (2006). Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 12: 296-300.

Polyzos A (2008). Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma and various other solid tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108: 261-6.

Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM (1987). Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* 325: 593-7.

Rahbek UL, Dissing S, Thomassen C, Hansen AJ, Tritsarlis K (2005). Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK-dependent migration. *Pflugers Arch* 450: 355-61.

Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C, Tamir A, Vilorio-Petit A, Filmus J, Mansour SJ, Ahn NG, Kerbel RS (2000). Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res* 60: 490-8.

Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP, Weltman H, Farber EM (2001). Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Arch Dermatol Res* 293: 291-5.

Reichardt LF (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1545-64.

Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP (1998). ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 34: 791-808.

Richter-Ehrenstein C, Rentzsch J, Runkel S, Schneider A, Schonfelder G (2007). Endothelial progenitor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 106: 343-9.

Rippe B, Rosengren BI, Carlsson O, Venturoli D (2002). Transendothelial transport: the vesicle controversy. *J Vasc Res* 39: 375-90.

Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4: 487-92.

Introduction

Romashkova JA, Makarov SS (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401: 86-90.

Romero C, Paredes A, Dissen GA, Ojeda SR (2002). Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 143: 1485-94.

Ross SR (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 PP, Barker PA (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67: 203-33.

Roux PP, Bhakar AL, Kennedy TE, Barker PA (2001). The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 276: 23097-104.

Roy PG, Thompson AM (2006). Cyclin D1 and breast cancer. *Breast* 15: 718-27.

Sachdev JC, Jahanzeb M (2008). Evolution of bevacizumab-based therapy in the management of breast cancer. *Clin Breast Cancer* 8: 402-10.

Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastronardi C, Kerr B, Ojeda SR, Lara HE, 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 AH, Roux PP, Kubu CJ, Zeindler C, Bhakar A, Tannis LL, Verdi JM, Barker PA (2000). NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 27: 279-88.

Salis MB, Graiani G, Desortes E, Caldwell RB, Madeddu P, Emanuelli C (2004). Nerve growth factor supplementation reverses the impairment, induced by Type 1 diabetes, of hindlimb post-ischaemic recovery in mice. *Diabetologia* 47: 1055-63.

Salven P, Perhoniemi V, Tykka H, Maenpaa H, Joensuu H (1999). Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor or breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 53: 161-6.

Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J (2003). MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem* 278: 14013-9.

Santos PM, Winterowd JG, Allen GG, Bothwell MA, Rubel EW (1991). Nerve growth factor: increased angiogenesis without improved nerve regeneration. *Otolaryngol Head Neck Surg* 105: 12-25.

Bibliographie

Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, Jakesz R, Kubista E, Birner P, Oberhuber G (2002). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 8: 1831-7.

Schor NF (2005). The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol* 77: 201-14.

Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Chretien M, Murphy RA (1996a). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett* 379: 247-50.

Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chretien M, Murphy RA (1996b). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* 314 (Pt 3): 951-60.

Seo K, Choi J, Park M, Rhee C (2001). Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas. *J Vet Sci* 2: 125-30.

Shaked Y, Bertolini F, Man S, Rogers MS, Cervi D, Foutz T, Rawn K, Voskas D, Dumont DJ, Ben-David Y, Lawler J, Henkin J, Huber J, Hicklin DJ, D'Amato RJ, Kerbel RS (2005a). Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell* 7: 101-11.

Shaked Y, Ciarrocchi A, Franco M, Lee CR, Man S, Cheung AM, Hicklin DJ, Chaplin D, Foster FS, Benezra R, Kerbel RS (2006). Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science* 313: 1785-7.

Shaked Y, Emmenegger U, Francia G, Chen L, Lee CR, Man S, Paraghamian A, Ben-David Y, Kerbel RS (2005b). Low-dose metronomic combined with intermittent bolus-dose cyclophosphamide is an effective long-term chemotherapy treatment strategy. *Cancer Res* 65: 7045-51.

Shaked Y, Emmenegger U, Man S, Cervi D, Bertolini F, Ben-David Y, Kerbel RS (2005c). Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity. *Blood* 106: 3058-61.

Shaked Y, Henke E, Roodhart JM, Mancuso P, Langenberg MH, Colleoni M, Daenen LG, Man S, Xu P, Emmenegger U, Tang T, Zhu Z, Witte L, Strieter RM, Bertolini F, Voest EE, Benezra R, Kerbel RS (2008). Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell* 14: 263-73.

Introduction

Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, Camerato T, Armanini MP, Phillips HS, Carroll K, Spencer SD, Levinson AD (1995). Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci* 15: 477-91.

Shen R, Ye Y, Chen L, Yan Q, Barsky SH, Gao JX (2008). Precancerous stem cells can serve as tumor vasculogenic progenitors. *PLoS One* 3: e1652.

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

Shiojima I, Walsh K (2002). Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 90: 1243-50.

Shirakawa K, Furuhata S, Watanabe I, Hayase H, Shimizu A, Ikarashi Y, Yoshida T, Terada M, Hashimoto D, Wakasugi H (2002a). Induction of vasculogenesis in breast cancer models. *Br J Cancer* 87: 1454-61.

Shirakawa K, Shibuya M, Heike Y, Takashima S, Watanabe I, Konishi F, Kasumi F, Goldman CK, Thomas KA, Bett A, Terada M, Wakasugi H (2002b). Tumor-infiltrating endothelial cells and endothelial precursor cells in inflammatory breast cancer. *Int J Cancer* 99: 344-51.

Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, Watanabe I, Yamada S, Saito K, Konishi F (2002c). Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer* 99: 821-8.

Shuin T, Kondo K, Ashida S, Okuda H, Yoshida M, Kanno H, Yao M (1999). Germline and somatic mutations in von Hippel-Lindau disease gene and its significance in the development of kidney cancer. *Contrib Nephrol* 128: 1-10.

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

Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24: 1217-81.

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET (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 SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, Glass DJ, Masiakowski P, Furth ME, Valenzuela DM, 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.

Stebbins CE, Kaelin WG, Jr., Pavletich NP (1999). Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 284: 455-61.

Bibliographie

Steinle JJ, Granger HJ (2003). Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation. *Auton Neurosci* 108: 57-62.

Stimpfl M, Tong D, Fasching B, Schuster E, Obermair A, Leodolter S, Zeillinger R (2002). Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 8: 2253-9.

Straume O, Chappuis PO, Salvesen HB, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Goffin JR, Begin LR, Foulkes WD, Akslen LA (2002). Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. *Cancer Res* 62: 6808-11.

Streubel B, Chott A, Huber D, Exner M, Jager U, Wagner O, Schwarzingler I (2004). Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 351: 250-9.

Strohmaier C, Carter BD, Urfer R, Barde YA, Dechant G (1996). A splice variant of the neurotrophin receptor *trkB* with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* 15: 3332-7.

Sun L, Zhang G, Li Z, Lei T, Huang C, Song T, 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.

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

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

Torrise R, Bagnardi V, Cardillo A, Bertolini F, Scarano E, Orlando L, Mancuso P, Luini A, Calleri A, Viale G, Goldhirsch A, Colleoni M (2008). Preoperative bevacizumab combined with letrozole and chemotherapy in locally advanced ER- and/or PgR-positive breast cancer: clinical and biological activity. *Br J Cancer* 99: 1564-71.

Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS (2002). A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4349-54.

Trastour C, Benizri E, Ettore F, Ramaioli A, Chamorey E, Pouyssegur J, Berra E (2007). HIF-1 α and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. *Int J Cancer* 120: 1451-8.

Introduction

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

Underwood CK, Reid K, May LM, Bartlett PF, Coulson EJ (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 DL, Parada LF, Presta LG (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J* 14: 2795-805.

Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY (2004). Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* 64: 2941-55.

Vacca A, Iurlaro M, Ribatti D, Minischetti M, Nico B, Ria R, Pellegrino A, Dammacco F (1999). Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine. *Blood* 94: 4143-55.

Vleugel MM, Greijer AE, Shvarts A, van der Groep P, van Berkel M, Aarbodem Y, van Tinteren H, Harris AL, van Diest PJ, van der Wall E (2005). Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1alpha expression in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* 58: 172-7.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ (2001). First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer. *Oncology* 61 Suppl 2: 37-42.

Wang H, Ward N, Boswell M, Katz DM (2006a). Secretion of brain-derived neurotrophic factor from brain microvascular endothelial cells. *Eur J Neurosci* 23: 1665-70.

Wang J, Lou P, Lesniewski R, Henkin J (2003). Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly. *Anticancer Drugs* 14: 13-9.

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

Wang YD, Hu Y, Sun CY, He WJ, Zhang XP (2006b). [Involvement of AKT/eNOS in brain derived neurotrophic factor-induced angiogenesis]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 27: 529-33.

Wang YD, Hu Y, Zhang L, Sun CY (2008). Brain derived neurotrophic factor induces endothelial cells angiogenesis through AKT and ERK1/2 signal pathway. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 16: 175-80.

Watson FL, Porcionatto MA, Bhattacharyya A, Stiles CD, Segal RA (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J Neurobiol* 39: 323-36.

Bibliographie

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

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8.

Wen CJ, Xue B, Qin WX, Yu M, Zhang MY, Zhao DH, Gao X, Gu JR, Li CJ (2004). hNRAGE, a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation. *FEBS Lett* 564: 171-6.

Weston GC, Haviv I, Rogers PA (2002). Microarray analysis of VEGF-responsive genes in myometrial endothelial cells. *Mol Hum Reprod* 8: 855-63.

Wiesmann C, Ultsch MH, Bass SH, de Vos AM (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* 401: 184-8.

Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, Diaz-Meco MT, Barker PA, 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.

Yamada M, Ohnishi H, Sano S, Araki T, Nakatani A, Ikeuchi T, Hatanaka H (1999). Brain-derived neurotrophic factor stimulates interactions of Shp2 with phosphatidylinositol 3-kinase and Grb2 in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem* 73: 41-9.

Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA (2001). Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J Biol Chem* 276: 12645-53.

Yan H, Chao MV (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 JJ, Leo E, Zapata J, Hauser CA, Reed JC, Bredesen DE (1999). TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* 274: 30202-8.

Yeiser EC, Rutkoski NJ, Naito A, Inoue J, Carter BD (2004). Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in traf6^{-/-} mice. *J Neurosci* 24: 10521-9.

Yoo MH, Kim JT, Rhee CH, Park MJ, Bae IJ, Yi NY, Jeong MB, Jeong SM, Nam TC, Seo KM (2004). Reverse effects of tetraarsenic oxide on the angiogenesis induced by nerve growth factor in the rat cornea. *J Vet Med Sci* 66: 1091-5.

Yoshiji H, Kuriyama S, Hicklin DJ, Huber J, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H (2001). The vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk-1 is a

Introduction

major regulator of malignant ascites formation in the mouse hepatocellular carcinoma model. *Hepatology* 33: 841-7.

Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, Jain RK (1996). Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14765-70.

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

Yung LY, Tso PH, Wu EH, Yu JC, Ip NY, Wong YH (2008). Nerve growth factor-induced stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase in PC12 cells is partially mediated via G(i/o) proteins. *Cell Signal* 20: 1538-44.

Zachary I, Gliki G (2001). Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 49: 568-81.

Zhang W, Ran S, Sambade M, Huang X, Thorpe PE (2002). A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibits vascular expression of Flk-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model. *Angiogenesis* 5: 35-44.

Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ (2000). Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 14: 391-6.