

Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille

Présentée par

Stéphanie VERBEKE

**ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION DU RECEPTEUR P75^{NTR} IMPLIQUEES
DANS LA CROISSANCE DES CELLULES DE CANCER DU SEIN**

Soutenue le 10 Décembre 2010 devant la commission d'examen :

Président du jury :	Pr. Philippe DELANNOY	Université de Lille
Rapporteurs :	Dr. Vincent CAVAILLES	Université de Montpellier
	Dr. Olivier MICHEAU	Université de Bourgogne
Examineur :	Dr. Philippe JUIN	Université de Nantes
	Pr. Hubert HONDERMARCK	Université de Lille
Directeur de Thèse :	Pr. Eric ADRIAENSSENS	Université de Lille

REMERCIEMENTS

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au sein du laboratoire INSERM U908, « Signalisation des facteurs de croissance dans le cancer du sein – Protéomique fonctionnelle » dirigé par le Professeur Hubert Hondermarck que je remercie pour m'avoir fait confiance en m'accueillant dans son laboratoire.

Je remercie mon directeur de thèse, le Professeur Eric Adriaenssens pour son soutien, sa bonne humeur et son optimisme à toute épreuve. Vous m'avez fait confiance dès le début ce qui m'a permis d'acquérir une grande autonomie, merci Chef !

Je tiens également à remercier les organismes qui ont soutenu financièrement mes recherches : L'INSERM et la Région Nord-Pas de Calais pour m'avoir alloué une bourse durant mes 3 premières années de thèse et l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) qui a permis la finalisation de ces travaux grâce à une aide individuelle de 4^{ème} année.

Pour l'honneur qu'ils me font en faisant parti de ce jury, je remercie profondément le Professeur Philippe Delannoy qui a accepté de le présider, le Docteur Vincent Cavaillès et le Docteur Olivier Micheau qui ont bien voulu juger ce travail et le Docteur Philippe Juin qui a accepté de l'examiner.

Un grand Merci à tous les membres du laboratoire qui m'ont accompagné (et supporté !) pendant cette aventure:

Xuefen, pour votre co-encadrement officieux. Votre disponibilité et vos conseils m'ont beaucoup apporté.

Manue, ta générosité et ta modestie sont exemplaires. Merci pour tous nos échanges aussi bien scientifiques que personnels. Tu as toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments et je suis heureuse de te compter parmi mes amies. Merci pour tout ma chopine !

Christophe, merci d'avoir égayé nos journées en apportant toutes ces nouvelles couleurs au labo et ne perd surtout pas cet enthousiasme qui te caractérise si bien.

Ingrid, ta bonne humeur et ton petit grain de folie ont fait de notre collocation de bureau une période très agréable.

Robert-Alain, malgré nos incompatibilités de caractère, merci pour ton investissement dans la vie du laboratoire.

Laura, j'aurai aimé faire plus amplement ta connaissance, bon courage pour la suite.

REMERCIEMENTS

Nathalie, ton arrivée a redonné un second souffle à la bio mol, dommage que tu ne sois pas arrivée plus tôt !

Valérie, ton rire qu'on entend d'un bout à l'autre du couloir va me manquer ! Merci de m'avoir toujours accueillie avec le sourire quand je venais t'embêter avec mes problèmes de commandes.

Emilie, toujours là pour proposer ton aide, tu as la main sur le cœur. Merci pour cette gentillesse.

Isa, merci pour les litres de milieux, les boîtes de cônes, les coupes histo et aussi les conversations surréalistes !!!

Et enfin merci à Véro sans qui le labo brillerait beaucoup moins !

Je voudrais remercier mes collègues et surtout ami(e)s thésard(e)s pour la bonne ambiance qu'il y a toujours eu entre nous, pour nos délires et pour avoir supporté mon côté « colonel » !

JP, nos pauses clopes à parler manips, labo et foot me manqueront !! Je te transmets (non, non pas la mémoire du labo... trop risqué ;)) la dure tâche de t'occuper de notre bébé p75, je sais que tu fais déjà du super boulot alors continue comme ça Padawan.

Cyril, ton côté zen et bosseur m'ont toujours impressionné, bon ok tes pronostics au foot un peu moins ;). Grâce à toi j'aurai repris le Bad, tu es un adversaire redoutable, JP n'a qu'à bien se tenir !

Elisa, la meilleure chanteuse de jingles que je connaisse ! Avec toi la relève féminine est assurée. Bon courage pour la suite.

Léo, l'aventure ne fait que commencer pour toi donc je te souhaite ce dont rêve tout thésard : pleins de résultats !

Un grand Merci au récent Docteur Yo, l'homme aux bons plans, jamais avare de conseils, toujours disponible et champion du monde de Tétris ! Et au Docteur Rod, pour perpétuer des expressions désuètes et m'avoir permis d'être témoin de ta belle progression.

Je remercie également ceux qui m'ont accompagné d'une manière ou d'une autre: Ikram, pour notre bonne entente ; Elsa, pour tout ce que tu m'as appris et tous nos fous rires; Sam, pour notre collaboration ; Chann, pour ton enthousiasme communicatif ; Vaïk, pour tes flatteries gratuites ; Aless ; Ginger ; Emma ; les 2 Béné et tous ceux que j'aurais oublié.

Enfin, je terminerai en remerciant du fond du cœur mes amis et ma famille qui m'ont toujours encouragé et Andra sans qui tout serait tellement plus difficile.

*On fait la science avec des faits comme une maison avec des pierres :
mais une accumulation de faits n'est pas plus une science
qu'un tas de pierres n'est une maison.*

Henri Poincaré

Résumé

Les données accumulées par notre laboratoire montrent une action pro-tumorale des neurotrophines dans le cancer du sein *via* notamment des effets anti-apoptotiques du NGF, du BDNF et de la NT4/5. Ces effets sont tous relayés par leur récepteur commun p75^{NTR}, plaçant celui-ci au centre de la signalisation des neurotrophines. A travers mes travaux de thèse, je me suis donc appliquée à préciser le rôle de ce récepteur et sa signalisation dans le cancer du sein. Pour cela, nous avons établi une lignée cellulaire surexprimant de manière inductible p75^{NTR}. Ce nouveau modèle d'étude a permis d'une part de confirmer l'action anti-apoptotique du récepteur et d'autre part, de mettre en évidence son rôle dans la régulation du cycle cellulaire. Aussi, nous avons montré que la survie induite par le récepteur était associée à une augmentation de la protéine anti-apoptotique c-IAP1, à une diminution du clivage de PARP et des procaspases-9 et -3 ainsi qu'à une diminution du relargage du cytochrome C par la mitochondrie ce qui suggère une inhibition de la voie intrinsèque (ou mitochondriale) de l'apoptose. De plus, p75^{NTR} ralentit la prolifération en provoquant une accumulation des cellules dans les phases G0/G1 du cycle cellulaire. Cet effet anti-prolifératif est associé à une diminution de la phosphorylation de Rb et à une augmentation de la protéine p21^{Waf1}. Nos travaux montrent que, *in vitro*, l'invalidation par siRNA de p21^{Waf1}, non seulement restaure la prolifération, mais abolit totalement la survie induite par le récepteur p75^{NTR}, faisant de p21^{Waf1} une protéine clé dans la signalisation de p75^{NTR}. De plus, *in vivo*, la surexpression de p75^{NTR} conduit à une augmentation du volume tumoral et à une résistance accrue à l'apoptogène TRAIL. Enfin, l'analyse de la protéolyse de p75^{NTR} montre que celui-ci subit deux clivages successifs dans les cellules cancéreuses mammaires. Le premier clivage réalisé par l'enzyme ADAM17/TACE semble indispensable à l'effet anti-apoptotique de p75^{NTR}. Le second clivage, réalisé par le complexe γ -sécrétase, semble quant à lui ne pas intervenir dans cet effet suggérant plutôt un processus de dégradation du récepteur.

Ces travaux ont permis d'approfondir les mécanismes d'action de p75^{NTR} dans les cellules cancéreuses mammaires et suggèrent que ce récepteur pourrait contribuer à la croissance tumorale en favorisant la résistance aux drogues anticancéreuses.

Abstract

Our laboratory has shown a pro-tumoral action of the neurotrophins in breast cancer especially by the anti-apoptotic effects of NGF, BDNF and NT4/5. These effects are all mediated by their common receptor p75^{NTR}, indicating its key role in the neurotrophins signaling. My thesis work has therefore been to elucidate further the role of p75^{NTR} in breast cancer cells and its signaling. For this purpose, we established breast cancer cells which stably overexpress p75^{NTR} in an inducible manner. This model allowed us to confirm the anti-apoptotic function of the receptor and to discover a new role of p75^{NTR} in the cell cycle regulation. Thus, we have shown that its pro-survival effect is associated with an increased expression of the inhibitor of apoptosis protein-1 (c-IAP1), a decrease of TRAIL-induced cleavage of PARP, procaspase-9 and -3, and a decrease of cytochrome C release from the mitochondria suggesting a regulation of the intrinsic (or mitochondrial) pathway of apoptosis. Moreover, p75^{NTR} slows down the cell growth through a cell accumulation in G0/G1 phases. This anti-proliferative effect is associated with a decrease of Rb phosphorylation and an increase of the cyclin kinase inhibitor p21^{waf1}. Interestingly, inhibition of p21^{waf1} with siRNA not only restores proliferation but also abolishes the pro-survival effect of p75^{NTR}, indicating the key role of p21^{waf1} in the biological functions of p75^{NTR}. In a SCID mice xenograft model, p75^{NTR} overexpression favors tumor growth and strongly increases tumor resistance to TRAIL treatment. Finally, the study of p75^{NTR} proteolysis has shown that this receptor undergoes two sequential cleavages in breast cancer cells. The first cleavage by the enzyme ADAM17/TACE is essential to its anti-apoptotic effect. Meanwhile, the second cleavage by the γ -secretase complex doesn't seem to be involved rather suggesting a degradation process.

Together, our findings have improved the knowledge of p75^{NTR} functions in breast cancer cells and suggest that p75^{NTR} overexpression in breast tumor cells could favor tumor survival and contribute to tumor resistance to drugs.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
SOMMAIRE DES FIGURES	4
SOMMAIRE DES TABLES	4
ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	7
I. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCERISATION	9
A. LA GLANDE MAMMAIRE NORMALE	9
1. Anatomie de la glande mammaire	9
2. Une évolution sous contrôle	11
B. LE CANCER DU SEIN	12
1. Généralités	12
2. Stades de développement d'un cancer	13
3. Les tumeurs mammaires	15
a) Les types de cancer du sein	15
b) Classifications des cancers du sein	16
4. Mécanismes de la tumorigénèse mammaire	18
a) Altérations génétiques	19
b) Origine cellulaire du cancer du sein	21
c) Influence du microenvironnement tumoral	23
5. Stratégies thérapeutiques émergentes	25
a) Ciblage des voies pro- et anti-apoptotiques	25
b) Inhibition des voies de signalisation	26
c) Inhibition de l'angiogénèse	27
6. Neurotrophines, p75 ^{NTR} et cancer du sein	29
II. P75^{NTR}, RECEPTEUR AUX MULTIPLES FACETTES	30
A. LE RECEPTEUR P75 ^{NTR}	30
1. Gène de p75 ^{NTR}	30

SOMMAIRE

2.	Structure protéique de p75 ^{NTR}	31
3.	Différentes formes de p75 ^{NTR}	33
	a) <i>Epissage alternatif</i>	33
	b) <i>Protéolyse de p75^{NTR}</i>	34
B.	UNE FAMILLE DE LIGANDS, LES NEUROTROPHINES	36
1.	La découverte	36
2.	Des gènes aux protéines	37
3.	Interactions avec p75 ^{NTR}	38
4.	p75 ^{NTR} , un récepteur à dépendance ?.....	39
C.	SIGNALISATION DE P75 ^{NTR} ET PARTENAIRES ASSOCIES	40
1.	Les voies pro-apoptotiques.....	42
2.	Les voies de survie	44
3.	Les autres voies activées par p75 ^{NTR}	46
D.	P75 ^{NTR} ET SES CORECEPTEURS	48
1.	Les récepteurs Tropomyosin-related kinases (Trk).....	49
	a) <i>La découverte</i>	49
	b) <i>Des gènes aux protéines</i>	50
	c) <i>Les isoformes des Trk</i>	51
	d) <i>p75^{NTR} et les récepteurs Trk, de vieux amis</i>	54
2.	La sortiline.....	56
	a) <i>Du gène à la protéine</i>	56
	b) <i>p75^{NTR} et la sortiline, complices de crime</i>	58
3.	Les récepteurs Nogo et LINGO-1	59
	a) <i>Des gènes aux protéines</i>	59
	b) <i>p75^{NTR} + Nogo + LINGO = zéro élévation !</i>	60
E.	LE RECEPTEUR P75 ^{NTR} DANS LES CANCERS	61
1.	Effet anti-tumoral	61
2.	Effet pro-tumoral	63
OBJECTIFS DE LA THESE		67
CONTEXTE DE LA THESE		69
OBJECTIFS DE LA THESE		70
RESULTATS		71
OVEREXPRESSION OF P75^{NTR} INCREASES SURVIVAL OF BREAST CANCER CELLS THROUGH P21^{WAF1}		73
TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES : LE CLIVAGE DE P75^{NTR} DANS LE CANCER DU SEIN		87

DISCUSSION & PERSPECTIVES	93
POUVOIR PRO-TUMORAL DE p75 ^{NTR} DANS LE CANCER DU SEIN	95
ACTIVATION CONSTITUTIVE DE p75 ^{NTR} ?	98
p75 ^{NTR} , CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LE CANCER DU SEIN ?	99
ANNEXE	103
BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR AND NEUROTROPHIN-4/5 STIMULATE BREAST CANCER CELL SURVIVAL THROUGH AN AUTOCRINE LOOP MEDIATED BY p75 ^{NTR} AND TrkB-T1	105
BIBLIOGRAPHIE	135

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la glande mammaire.....	9
Figure 2 : Structure d'un lobe mammaire.....	10
Figure 3 : Histologie de la glande mammaire normale.....	11
Figure 4 : Développement de la glande mammaire.....	12
Figure 5 : Stades de la cancérisation d'un épithélium canalaire mammaire.....	14
Figure 6 : Coupes histologiques des principaux types de cancers du sein.....	16
Figure 7 : Deux modèles hypothétiques de l'origine cellulaire du cancer du sein.....	23
Figure 8 : Thérapies ciblées dans le cancer du sein.....	29
Figure 9 : Représentation schématique du récepteur p75 ^{NTR}	33
Figure 10 : Les différentes formes du récepteur p75 ^{NTR}	36
Figure 11 : Association transmembranaire de p75 ^{NTR} et liaison des neurotrophines.....	39
Figure 12 : Représentation schématique des voies de signalisation de p75 ^{NTR}	41
Figure 13 : Représentation schématique des corécepteurs de p75 ^{NTR}	49
Figure 14 : Liaison des neurotrophines aux récepteurs Trk.....	49
Figure 15 : Représentation schématique des récepteurs Trk.....	51
Figure 16 : Les isoformes de TrkA.....	52
Figure 17 : Les isoformes majoritaires de TrkB.....	53
Figure 18 : Les isoformes de TrkC.....	54
Figure 19 : Représentation schématique de la sortiline.....	58
Figure 20 : Représentation schématique des récepteurs Nogo et LINGO-1.....	60
Figure 21 : Action des neurotrophines dans le cancer du sein.....	69
Figure 22 : Clivages de p75 ^{NTR} dans les cellules cancéreuses mammaires.....	89
Figure 23: Le 1 ^{er} clivage de p75 ^{NTR} est nécessaire à son effet de survie.....	89
Figure 24 : L'invalidation d'ADAM17 inhibe la survie et le clivage de p75 ^{NTR}	90
Figure 25 : Les voies PI3K/Akt et Erk ne sont pas impliquées dans le clivage et la survie de p75 ^{NTR}	91

SOMMAIRE DES TABLES

Table 1 : Classification des stades des cancers du sein.....	17
Table 2 : Classification moléculaire des cancers du sein.....	18
Table 3 : Caractéristiques des neurotrophines.....	37
Table 4 : Caractéristiques des récepteurs Trk humains.....	50
Table 5 : Caractéristiques de la sortiline.....	56
Table 6 : Caractéristiques des récepteurs Nogo et LINGO-1.....	59

ABREVIATIONS

A

ANT: Adenine Nucleotide Translocase
APP: β -Amyloid Precursor Protein
ADAM17/TACE: A Disintegrin And Metalloprotease/TNF α Converting Enzyme
Arf6: ADP-ribosylation factor 6
ARMS: Ankyrin repeat-Rich Membrane Spanning
Ask-1: Apoptosis signal-regulating kinase 1

B

BRCA: BReast CAncer
Bcl-2: B-cell lymphoma protein-2
Bcl-XL: B-cell leukemia-XL
BDNF: Brain-Derived Growth Factor
bHLH: basic Helix-Loop-Helix
Bad: Bcl-2 antagonist of cell death
Bax: Bcl-2 associated X protein
Bex: Brain-expressed X-linked
Bim: Bcl-2 interacting mediator of cell death
BH3: Bcl-2 Homology
Bik: Bcl-2 interacting killer
Bak: Bcl-2-associated killer

C

Cdk: Cyclin dependent kinase
Cdc25: Cycle Division Control protein 25
CD24/44: Cluster Designation 24/44
CXCR4: CXC chemokine Receptor 4
CSF-1: Colony-Stimulating Factor-1
CRD: Cystein Rich Domain
c-Cbl: Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene
Crk: chicken tumour virus 10 regulator of kinase
CKII: Casein Kinase II

D

DD: Death Domain
DCC: Deleted in Colorectal Cancer

E

EGF: Epidermal Growth Factor
ER: Estrogen Receptor
EGFR: EGF Receptor
E2F1: E2 promoter binding Factor-1
Erk: Extracellular regulated kinase

F

FGF: Fibroblast Growth Factor
FLT3: FMS-Like Tyrosine kinase-3
FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer
FAP1: Fas-Associated Protein-1
FRS-2: FGF Receptor Substrate-2
FAIM: Fas Apoptosis Inhibitor Molecule
FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting

G

GDNF: Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
GDP/GTP: Guanosine 5'-DiPhosphate/Guanosine 5'-TriPhosphate
GIRK: G-protein-coupled Inwardly Rectifying potassium (K)
GEF: guanine nucleotide exchange factor
GPI: Glycosyl Phosphatidyl Inositol

H

HER2: human epidermal growth factor receptor-2
HGF: Hepatocyte Growth Factor
HSP90: Heat Shock Protein 90
HEK293: Human Embryonic Kidney 293
HDAC: Histone DeAcetylase

I

IGF-1: Insulin Growth Factor-1
IKK: I κ B Kinase
I κ B: Inhibitor of kappa B
IRAK: Interleukine-1 Receptor-Associated Kinase
IAP1: Inhibitor of Apoptosis 1

J

JNK: Jun N-terminal Kinase

L

LINGO-1: LRR an Ig domain-containing, Nogo receptor-interacting protein-1
LNGFR: Low affinity NGF Receptor

M

MDGF-1: Mammary Derived Growth Factor
MEK: MAPK ERK kinase
Myc: myelocytomatosis viral oncogene
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MMP: Matrix MetalloProtease
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
Mcl-1: Myeloid cell leukemia-1
MAGE-G1: Melanoma-Associated antigen-G1
MBGI: CNS-derived Myelin-Based Growth Inhibitor
MyD88: Myeloid Differentiation factor 88
MUL: Mulibrey Nanism
MAG: Myelin-Associated Glycoprotein
M6P: Mannose 6-phosphate

N

NGF: Nerve Growth factor
NT3-4/5: Neurotrophin 3-4/5
NGFR: Nerve Growth Factor Receptor
NFκB: Nuclear Factor kappa B
NRIF: Neurotrophin Receptor Interacting Protein
NADE: NGFR (p75^{NTR})-Associated cell Death Executor
NRAGE: Neurotrophin Receptor-interacting MAGE homolog

O

OMgP: Oligodendrocyte Myelin glycoProtein

P

PgR: Progesteron Receptor
PTEN: Phosphatase and TENsin homologue deleted on chromosome 10
PI3K: Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
p21^{waf1/cip1}: p21 wild-type p53-activated fragment 1/Cdk-interacting protein 1
PTPC: Permeability Transition Pore Complex
p75^{NTR}: p75 Neurotrophin Receptor
PDZ: Post-synaptic Disc-large Zona
PKA: c-AMP-dependent Protein Kinase A
PKCι: Protein Kinase C iota
p75-ECD: p75-ExtraCellular Domain
p75-CTF: p75-C-Terminal Fragment
p75-ICD: p75-IntraCellular Domain
PC12: Pheochromocytoma Cell
PIP2: Phosphatidyl Inositol (4,5) biPhosphate

p62: PKC-interacting protein p62
p27^{kip1}: p27 Kinase inhibitor protein 1
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
p16^{INK4a}: p16 Inhibitor of Cdk4
PLCγ: Phospholipase C gamma
PARP: poly(ADP-ribose) polymerase
PA: Ponasterone A

R

Rb: Retinoblastoma
RET: REarranged during Transfection
Rac: Ras-related C3 botulinum toxin
RIP2: Receptor Interacting Protein-2
RhoGDI: Rho-GDP Dissociation Inhibitor

S

SDF1/CXCL12: Stromal cell-Derived Factor 1/Chemokine CXC motif Ligand 12
SCF: Stem-Cell Factor
Sp1: Stimulatory protein 1
Sall2: Sal-like 2
Sc-1: Schwann cell factor-1
SMase: SphingoMyelinase
Shc: Src homology-2 containing protein
SMAC: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases

T

TGF: Transforming Growth Factor
TNF: Tumor Necrosis Factor
TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Trk: Tropomyosin receptor kinase
TRAF: TNF Receptor-Associated Factor
TRADD: TNF Receptor-Associated Death Domain protein
TIMP-1: Tissue Inhibitor of MMP-1
TAPI-1: TNF-Alpha Protease Inhibitor-1

U

uPA: urokinase-type Plasminogen Activator

V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VPS10: Vacuolar Protein Sorting 10

X

XIAP: X-linked Inhibitor of APoptosis

INTRODUCTION

I. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCERISATION

A. La glande mammaire normale

1. Anatomie de la glande mammaire

Le sein est un organe constitué principalement d'un tissu graisseux qui repose sur les muscles pectoraux à l'aide de ligaments appelés ligament de Cooper. Chez la femme, sa principale fonction est la lactation alors que chez l'homme, les seins demeurent immatures et n'ont aucun rôle. La glande mammaire humaine consiste en une structure tubulo-alvéolaire composite formée par 15 à 25 lobes irréguliers irradiant à partir du mamelon. La peau qui entoure le mamelon, l'aréole, est pigmentée et contient des glandes sébacées (glandes de Morgani) qui s'hypertrophient à la grossesse et prennent alors le nom de tubercule de Montgomery. Les sécrétions de ces glandes participent probablement à la protection du mamelon et de l'aréole lors de l'allaitement. Les lobes qui forment la glande mammaire sont séparés par une couche de tissu conjonctif dense et se trouvent enfouis dans du tissu graisseux. Un canal unique, le canal galactophore, draine chaque lobe par l'intermédiaire d'un orifice propre à la surface du mamelon. Juste avant de s'ouvrir à la surface, le canal galactophore forme une dilatation appelée sinus lactifère. Le mamelon contient des travées de muscles lisses orientées parallèlement aux galactophores et circulairement près de sa base. A l'intérieur de chaque lobe, le canal principal se ramifie en de nombreuses branches pour former les canaux terminaux, aboutissant chacun à un lobule constitué de multiples acini ou alvéoles. (Figure 1 et 2).

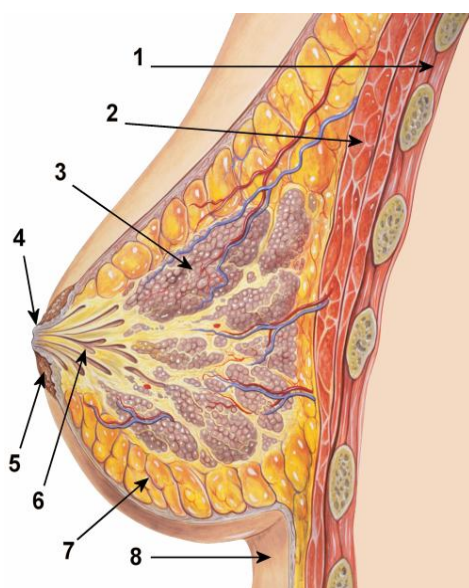


Figure 1 : Structure de la glande mammaire.

Représentation schématique d'une coupe sagittale de sein.

1 : Cage thoracique

2 : Muscles pectoraux

3 : Lobe mammaire

4 : Mamelon

5 : Aréole

6 : Canal galactophore

7 : Tissu adipeux

8 : Peau

(Medical Illustrations by Patrick Lynch)

Chaque canal terminal forme avec le lobule associé une unité terminale ducto-lobulaire (UTDL). Ces unités sont très sensibles aux variations hormonales et il est admis que la plupart des lésions mammaires mastosiques et carcinomateuses se développent à partir de l'UTDL. Les lobules sont séparés les uns des autres par du tissu conjonctif interlobulaire moyennement dense, tandis que le tissu conjonctif intralobulaire entourant les canaux à l'intérieur de chaque lobule est moins fibreux et plus vascularisé.

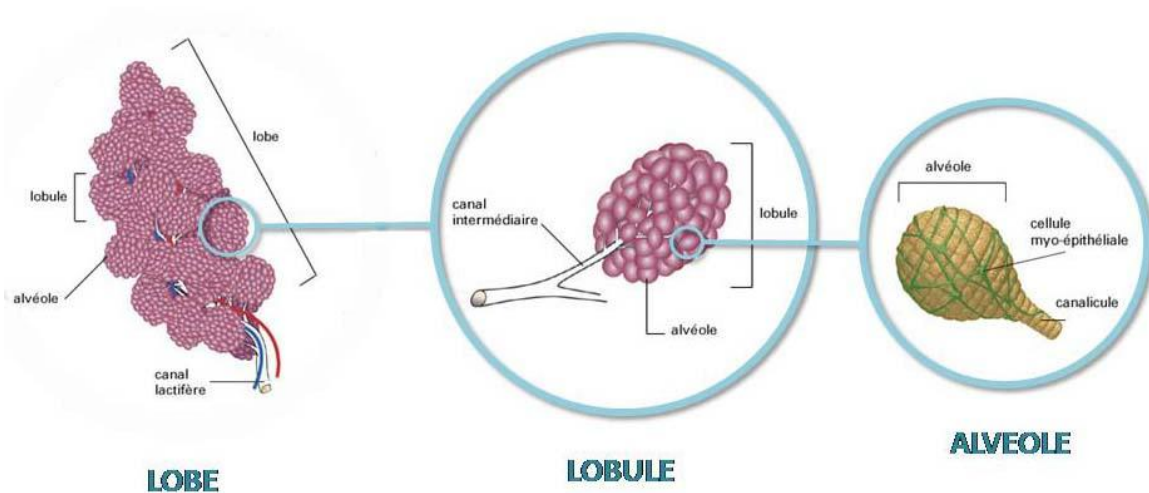


Figure 2 : Structure d'un lobe mammaire.

Représentation schématique d'un lobe mammaire. Un lobe mammaire compte environ 20 à 40 lobules eux mêmes formés de 10 à 100 alvéoles. Les alvéoles sont composées d'un épithélium sécrétoire qui éjecte le lait dans la lumière de l'alvéole vers les canalicules jusqu'au canal galactophore grâce à la contraction des cellules myoépithéliales.

(Adapté de www.santeallaitementmaternel.com)

La glande mammaire est composée de plusieurs types cellulaires bien distincts. Bien que le système canalaire constitue la composante fonctionnelle, le tissu fibro-adipeux entourant les canaux représente la majeure partie du sein. Le système canalaire, dans son ensemble, est bordé par deux couches cellulaires : une couche interne de cellules épithéliales sécrétrices de lait entourée par une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales fusiformes contractiles. Ces deux couches cellulaires sont délimitées par une membrane basale et baignent dans le stroma, ou tissu palléal, formé de matrice extracellulaire (notamment des fibres de collagène), de cellules fibroblastiques, d'adipocytes et de vaisseaux sanguins nécessaires au développement de l'épithélium mammaire (Figure 3). L'éjection du lait dans les canaux alvéolaires, lobulaires et enfin galactophores, se fait en réponse au stimulus de succion qui provoque la contraction des cellules myoépithéliales.

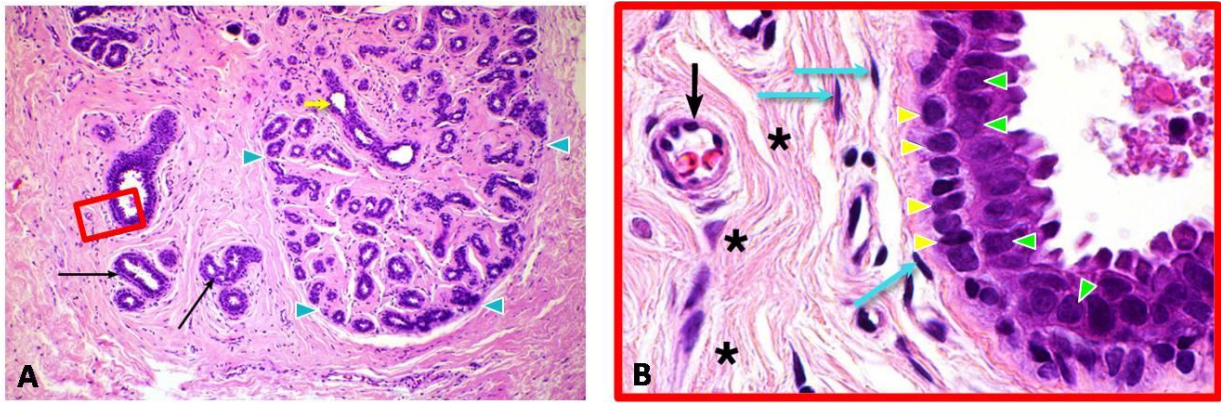


Figure 3 : Histologie de la glande mammaire normale.

A. Lobule mammaire post-pubertaire hors lactation. Les pointes de flèches bleues délimitent le lobule, la flèche jaune indique le canal terminal alvéolaire menant au réseau canalaire (flèches noires).

B. Agrandissement de la coupe A (rectangle rouge). Les pointes de flèches jaunes indiquent les cellules myoépithéliales du canal, les pointes de flèches vertes montrent l'assise de cellules épithéliales du canal, les flèches bleues 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 mammary gland*: <http://mammary.nih.gov>)

2. Une évolution sous contrôle

La glande mammaire est en constante évolution au cours de la vie d'une femme. L'essentiel de sa croissance se fait après la puberté et elle ne se termine qu'au cours de la première grossesse menée à terme. A la naissance, les structures mammaires sont rudimentaires. Le sein reste quiescent pendant l'enfance et la croissance se limite à quelques canaux qui se terminent par des bourgeons constitués de cellules épithéliales. Au moment de la puberté, sous l'influence des stéroïdes sexuels (œstrogènes, progestérone) mais aussi de l'hormone de croissance (GH) et de corticostéroïdes, survient une phase de croissance des canaux et du stroma. Il y a cependant peu de développement des alvéoles, et la majeure partie de l'augmentation de volumes des seins est attribuable aux dépôts lipidiques. C'est au cours de la grossesse que les alvéoles se développeront activement, prenant la place du tissu adipeux qui se trouve réduit. En effet, pendant la gestation, les concentrations plasmatiques de progestérone, d'œstrogènes et d'hormone lactogène placentaire (hPL) sont élevées. La progestérone et les œstrogènes agissent directement au niveau des cellules souches épithéliales situées à l'extrémité des canaux mammaires favorisant ainsi leurs proliférations. Des facteurs de croissance comme le TGF α (*Transforming Growth Factor*), le MDGF-1 (*Mammary Derived Growth Factor*), l'IGF-1 (*Insulin Growth Factor*) et l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) sont également impliqués dans cette prolifération. A la fin de la grossesse, les cellules épithéliales alvéolaires se polarisent et deviennent ainsi fonctionnelles. Cependant, la progestérone, en inhibant la prolactine, inhibe la lactation jusqu'à l'accouchement. Après celui-ci, le placenta qui est une source de grandes quantités d'hormones stéroïdes est éliminé, on assiste alors à un renversement de l'équilibre progestérone/prolactine en

faveur de la production du lait. Lors des tétées, la succion du mamelon va permettre d'une part l'entretien de la sécrétion de prolactine par l'adénohypophyse, et d'autre part la sécrétion d'ocytocine responsable de la contraction des cellules myoépithéliales nécessaire à l'éjection du lait. Après la période d'allaitement, la glande mammaire involue : l'activité sécrétoire cesse et la glande retourne à un état moins différencié grâce à l'apoptose des cellules épithéliales, myoépithéliales et des fibroblastes (Figure 4).

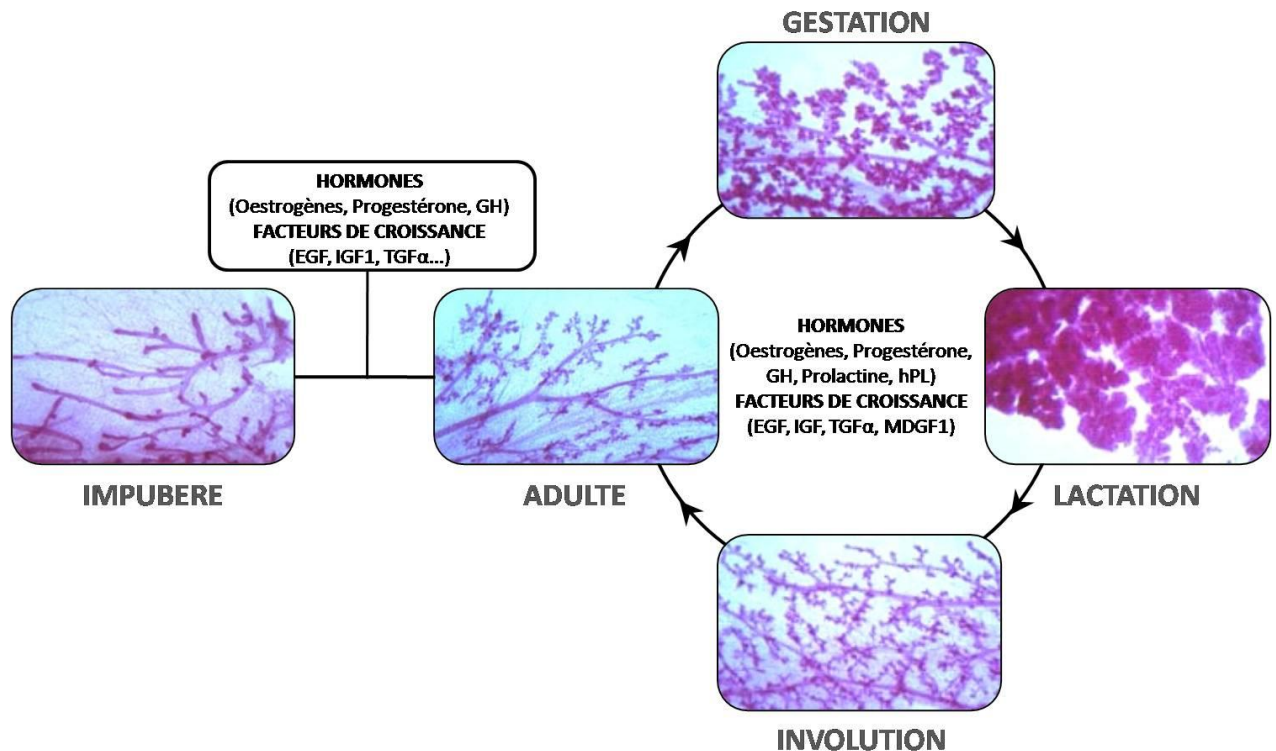


Figure 4 : Développement de la glande mammaire.

*A la puberté, la glande mammaire subit l'influence de diverses hormones et facteurs de croissance provoquant le développement des canaux et du stroma. Lors d'une grossesse, les cellules épithéliales des alvéoles prolifèrent et se différencient en vue de la production de lait. Après l'allaitement, le sevrage entraîne la disparition de ces cellules et l'involution de la glande. Photos de glandes mammaires murines issues de *Biology of the mammary gland* (<http://mammary.nih.gov>).*

B. Le cancer du sein

1. Généralités

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers féminins. Dans le monde, plus de 1 050 000 nouveaux cas surviennent chaque année, dont plus de 580 000 dans les pays développés (Europe de l'ouest, Amérique du nord) où il est plus fréquent qu'en Asie ou en Afrique. Il est responsable chaque année de plus de 400 000 décès de femmes. En France, il représente plus du tiers de l'ensemble des nouveaux cas de cancer chez la femme. Les estimations nationales pour 2010 prévoient plus de

52 000 nouveaux cas et 11 000 décès liés à ce cancer. Entre 1980 et 2005, le nombre de nouveaux cas a doublé alors que dans le même temps la mortalité est restée relativement stable grâce à l'amélioration des thérapeutiques. Il faut noter 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 de Veille Sanitaire ; <http://www.invs.sante.fr/applications/cancers/projections2010/default.htm>)

Heureusement aujourd'hui, le taux de survie relative à 5 ans après le diagnostic est de 85 % et, entre 2004 et 2006, un recul de l'incidence a été pour la première fois observé depuis 20 ans. La baisse de l'incidence en période de déploiement du dépistage est paradoxale (augmentation de 335% des dépistages par mammographie) mais peut être attribuée à la diminution massive des traitements hormonaux de la ménopause (baisse de 62% entre 2000 et 2006) (Allemand *et al.*, 2008).

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

2. Stades de développement d'un cancer

Plusieurs étapes jalonnent la progression tumorale, de la transformation d'une cellule à sa prolifération clonale puis à l'apparition de métastases. La figure 5 décrit les différents stades de la cancérisation en s'appuyant sur l'exemple de la tumorigénèse de l'épithélium canalaire mammaire.

L'hyperplasie correspond à un stade préliminaire de cancérisation. Elle est caractérisée par la prolifération accrue de cellules normales. Dans le cas du sein, il s'agit d'une prolifération intracanaire de cellules épithéliales de sous-type luminal et basal. L'augmentation de l'épaisseur de la couche épithéliale entraîne une obstruction partielle ou complète du canal galactophore. Néanmoins cette hyperplasie canalaire dite « simple » n'augmente pas le risque absolu de cancer chez les femmes de moins de 55 ans et ne nécessite donc pas de traitement particulier (Schnitt, 2003). En revanche, l'hyperplasie canalaire dite « atypique » augmente de 4 à 5 fois le risque de cancer du sein et présente les prémisses d'un carcinome *in situ*. Elle est caractérisée par la prolifération des cellules épithéliales de sous-type luminal uniquement.

Avant la formation du cancer proprement dit, on observe une dédifférenciation des cellules accompagnée d'anomalies cyto-nucléaires et d'une désorganisation architecturale, on parle alors de dysplasie aussi notée comme lésion précancéreuse. L'accumulation de modifications génétiques aboutit à la formation d'un carcinome *in situ*, la prolifération des cellules épithéliales reste à un niveau local et ne franchit pas la membrane basale. Lorsque les cellules tumorales envahissent le tissu conjonctif, on parle alors de cancer invasif. Le franchissement de la membrane basale est une étape décisive de la cancérogénèse car il apporte la preuve que les cellules malignes ont acquis des modifications génétiques nécessaires à l'invasion du stroma (perte de l'adhérence et de l'inhibition de contact, sécrétion de protéases, augmentation de l'angiogénèse). Enfin la dernière étape est caractérisée par la formation de métastases, les cellules essaient à partir de la tumeur primaire par les voies lymphatiques et sanguines et colonisent un nouvel organe pour former une tumeur secondaire.

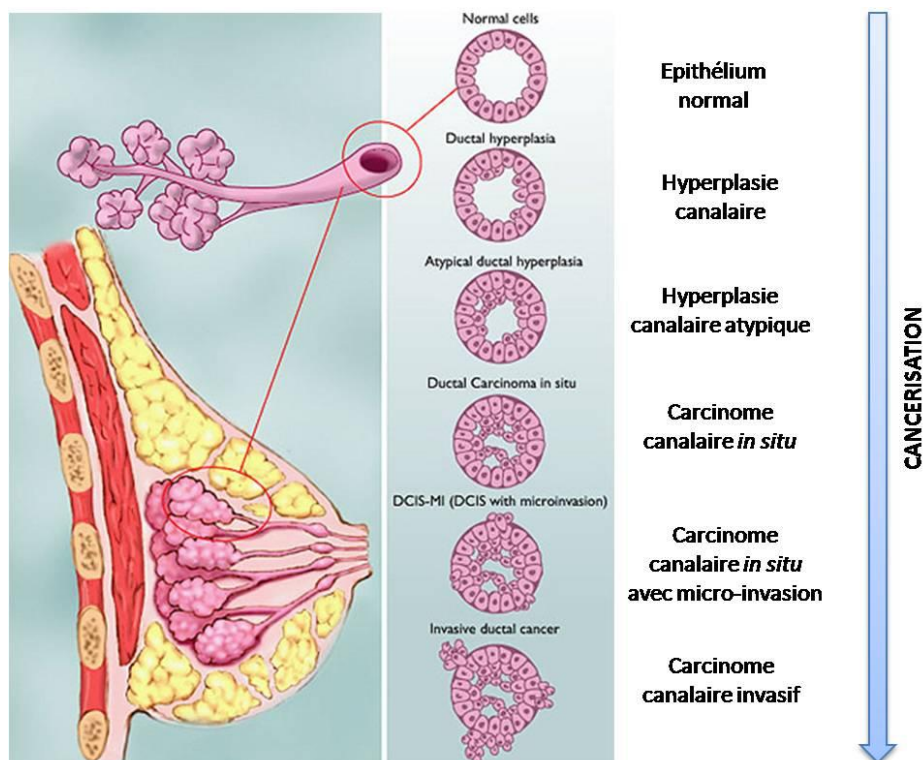


Figure 5 : Stades de la cancérisation d'un épithélium canalaire mammaire.

Sous l'influence de divers signaux, les cellules épithéliales vont proliférer de façon anarchique jusqu'au stade de l'hyperplasie atypique. Ensuite vient une étape de dédifférenciation, les cellules acquièrent des modifications génétiques et prolifèrent au niveau local pour former un carcinome in situ. L'accumulation de ces modifications permet aux cellules de traverser la membrane basale pour donner un cancer invasif et métastatique. Image issue du site BC Cancer Agency (<http://www.bccancer.bc.ca/default.htm>)

3. Les tumeurs mammaires

a) *Les 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. La plus fréquente des tumeurs bénignes du sein est l'adénofibrome, le plus souvent découvert avant 30 ans.

La seconde classe de tumeurs de sein, qualifiées de **malignes**, sont au contraire mal délimitées et non-encapsulées. Ce sont des cellules à croissance rapide qui tendent à infiltrer et détruire les tissus adjacents. La grande majorité (plus de 95% des cas) des tumeurs malignes sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire issus de la cancérisation de l'épithélium glandulaire à partir soit des cellules des canaux, on parle alors de cancer canalaire, soit des cellules des lobes, on parle alors de cancer lobulaire. Les adénocarcinomes peuvent être subdivisés en fonction de leurs caractéristiques d'infiltration des tissus environnants.

- **Les carcinomes *in situ* (non infiltrants) :** La prolifération épithéliale maligne est dans la lumière soit du canal galactophorique, il s'agit alors d'un carcinome canalaire (CCIS), soit des acinis situés dans les lobules, on parle alors de carcinome lobulaire (CLIS). Dans tous les cas, la membrane basale est toujours respectée et le tissu conjonctif n'est pas envahi. Les carcinomes mammaires *in situ* sont rares (2 à 3% des cas) et généralement de bon pronostic mais peuvent toutefois évoluer vers une forme infiltrante dans environ 20% des cas.
- **Les carcinomes invasifs (ou infiltrants) :** Les carcinomes dits infiltrants envahissent le tissu mammaire en traversant la membrane basale. Ils représentent une très large majorité des cancers du sein (98%) et sont le plus souvent canaux (75%) ou lobulaires (4 à 11%). Il existe d'autres formes, plus rares, que sont les carcinomes tubuleux, mucineux, médullaires, ou encore les carcinomes apocrines, adénoïdes kystiques, cribriformes, eux extrêmement rares (-de 1%) et dits de bon pronostic.
- **Les cancers du sein métastatiques :** Les cellules néoplasiques des carcinomes invasifs envahissent le tissu mammaire environnant et peuvent disséminer à partir de la tumeur primaire, le plus souvent par le réseau lymphatique mais aussi par les vaisseaux sanguins. Les premiers relais ganglionnaires sont colonisés et peuvent être à l'origine d'une dissémination générale du cancer. Cet envahissement des ganglions lymphatiques est le reflet du potentiel métastatique des cellules tumorales et est important dans le pronostic de la tumeur. Dans la plupart des cancers du sein, les métastases sont principalement localisées au niveau des os, des poumons et du cerveau et peuvent être également retrouvées dans le foie, la plèvre et la peau.

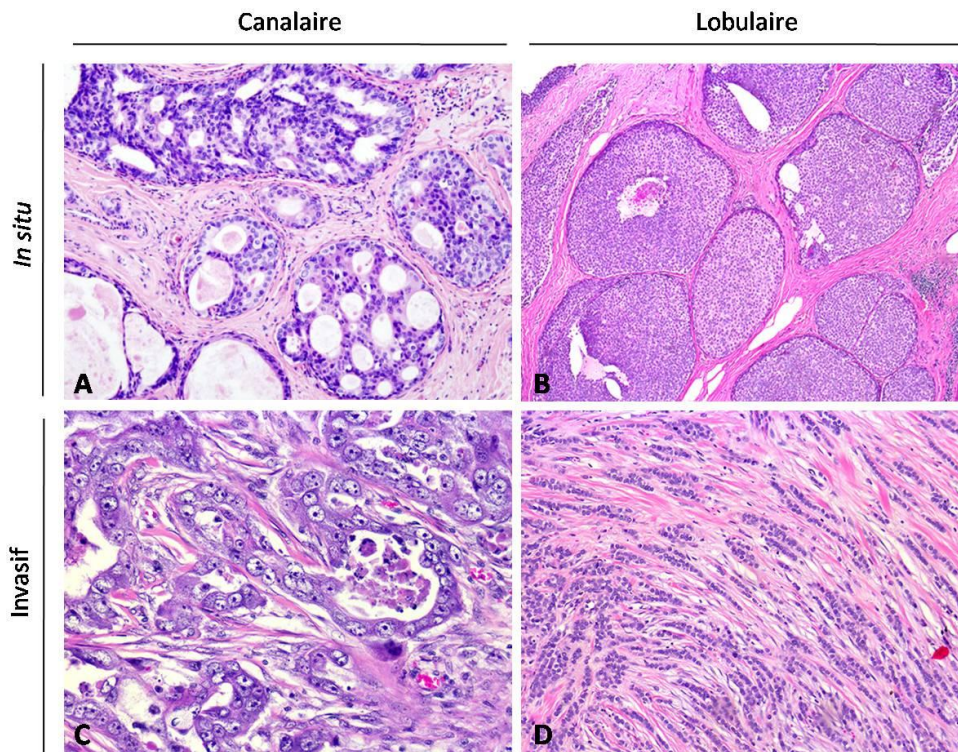


Figure 6 : Coupes histologiques des principaux types de cancers du sein.

Coupes histologiques de carcinomes *in situ* canaux (A) et lobulaires (B), et de carcinomes invasifs canaux (C) et lobulaires (D). Marquage à l'hématoxyline et éosine. (Images issues du site : <http://www.hopkinsbreastcenter.org/pathology/malignant/>)

b) Classifications des cancers du sein

A l'heure actuelle, il n'est plus possible de parler de stades précoces et de stades tardifs d'un cancer car cette terminologie repose sur la notion obsolète d'une progression tumorale régulière. En revanche, il est toujours important de classer les tumeurs dans le but de créer des groupes homogènes : homogènes sur un plan pronostique et également sur un plan thérapeutique. C'est dans ce but qu'a été créée la classification TNM basée sur l'extension locale (Tumeur), régionale (Node ou ganglion) et générale (Métastase) de la tumeur. Néanmoins, notre connaissance des tumeurs s'améliore de jour en jour et il est nécessaire de faire évoluer les classifications. C'est le cas avec la classification moléculaire qui tient compte de l'expression de différents gènes.

- **Classification TNM** : Elle est fondée sur l'extension anatomique de la tumeur déterminée par la clinique et l'histopathologie. Elle regroupe l'atteinte locale (T0 à T4), ganglionnaire (N0 à N3) et métastatique (M0 ou M1) où les chiffres associés à chaque critère augmentent en fonction de la gravité du cancer. Ainsi la cotation du T dépend du volume tumoral et de son extension à la cage thoracique ou à la peau. La cotation du N dépend du territoire

ganglionnaire, plus ou moins proche de la tumeur, des dimensions des adénopathies, de leur nombre et de leur éventuelle fixation aux tissus voisins. Enfin la lettre M est notée M0 en absence de métastases ou M1 en leur présence, quelque soit leur siège, unique ou multiple.

On peut ainsi définir différents stades :

Stade	Tumeur (T)	Ganglion (N)	Métastase (M)	Description
0	Tis (in situ)	N0	M0	Cancer non invasif
I	T1	N0	M0	Tumeur < 2 cm, pas de propagation à l'extérieure du sein
II	T0/1	N1	M0	Tumeur de 2 à 5 cm et/ou atteinte ganglionnaire satellite mineure
	T2	N0/1		
	T3	N0		
III	T0/1/2	N2	M0	Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure
	T4	N0/1/2		
	Tout T	N3		
IV	Tout T	Tout N	M1	Tumeur avancée localement et métastases à distance

Table 1 : Classification des stades des cancers du sein.

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

- **Classification moléculaire** : Plus récente, elle est rendue possible grâce au développement des techniques d'analyse génomique à large échelle comme les biopuces à ADN. Ces techniques ont permis de dresser une carte d'identité moléculaire des tumeurs et de dégager de nouveaux facteurs pronostiques et prédictifs qui apportent de précieux compléments d'information pour la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein. C'est à l'équipe de Perou *et al.*, en 2000, que revient le mérite d'avoir identifié 5 sous-types de carcinomes mammaires qui ont par la suite été corrélés à des valeurs pronostiques comme une estimation du risque de rechute ou du bénéfice d'un traitement spécifique (Brenton *et al.*, 2005; Geyer *et al.*, 2009; Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001; Sotiriou *et al.*, 2003).

Sous-type	Description
Luminal A	Cancers de bas grade, représentant une réceptivité hormonale importante (ERα++) et une faible prolifération. Expression des cytokératines luminales 8, 18 et du gène <i>GATA3</i> impliqué dans le contrôle de la croissance et le maintien de la différenciation des tumeurs ER+. Généralement traités par hormonothérapie et de bon pronostic. P53 muté dans moins de 15% des cas.
Luminal B/C	Expression du ERα moins importante et prolifération plus forte que les cancers de type « Luminal A ». De pronostics moins bons et donc généralement traités par hormonothérapie + chimiothérapie. P53 muté dans 40 à 80% des cas.
HER2	Surexpression de HER2 mais également d'autres gènes situés dans l'amplicon <i>ErbB2</i> comme <i>GRB7</i> . Tumeurs négatives pour les récepteurs hormonaux et généralement de grade III. Associé à une surexpression de c-myc et à une forte prolifération. Pronostic défavorable mais bonne réponse aux traitements de type anthracycline, taxane et Trastuzumab (Herceptin®). P53 muté dans environ 70% des cas.
Basal-like	Tumeurs dites « triples négatives » c'est à dire n'exprimant pas les récepteurs hormonaux (ER et PgR) et ne surexprimant pas le récepteur HER2. Expression des cytokératines basales 5/6, 14 et 17, des caveolines 1 et 2, de l'EGFR et de c-kit. P53 muté dans 80% des cas et tumeurs souvent associées à une mutation de BRCA1. Pronostic le plus défavorable. Ne répondent pas aux traitements hormonaux et au Trastuzumab mais les chimiothérapies classiques peuvent aider. Présente un intérêt pour les essais cliniques d'anti-EGFR ou d'anti-angiogène.
Normal-like	Sous-type assez mal défini. Exprime des gènes connus pour être exprimé dans les cellules non-épithéliales et le tissu adipeux. Pronostic intermédiaire

Table 2 : Classification moléculaire des cancers du sein.

Les cancers de sous-types « Luminal » représentent environ 70% des cancers du sein, les « Basal-like » 10 à 20%, les « HER2 » 7 à 15% et les « Normal-like » 5 à 10%.

4. Mécanismes de la tumorigénèse mammaire

La tumorigénèse mammaire est un processus multifactoriel où la succession d'altérations génétiques amène progressivement à la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses. Ces altérations peuvent aboutir à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et/ou à l'activation d'oncogènes. Selon Hanahan et Weinberg, six modifications de la physiologie cellulaire sont considérées comme essentielles pour permettre aux cellules transformées de prendre l'ascendant sur les autres cellules (Hanahan et Weinberg, 2000) :

- Indépendance vis à vis des signaux de croissance
- Perte de la sensibilité aux signaux anti-prolifératifs
- Résistance à l'apoptose
- Potentiel réplcatif illimité
- Capacité à envahir les tissus et à métastaser
- Néo-angiogénèse

a) Altérations génétiques

❖ Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs

On considère comme gène suppresseur de tumeurs, tout gène dont la perte de fonction participe à l'oncogenèse. Certains jouent un rôle fondamental dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, on les appelle « gatekeepers » comme la protéine Rb (inhibiteur du cycle cellulaire) ou PTEN (inhibiteur de la PI3Kinase). D'autres sont impliqués dans la réparation de l'ADN, ce sont des garants de la stabilité génomique ou « caretakers » tel que p53 ou BRCA. Enfin, certains gènes peuvent moduler le microenvironnement cellulaire et l'implantation tumorale, ce sont les « landscapers » (E-cadhérine, CD44). La participation des gènes suppresseurs de tumeurs à l'oncogenèse nécessite le plus souvent une altération concomitante des deux allèles du même gène, nécessaire pour aboutir à une perte de fonction. Selon le modèle de Knudson expliquant les syndromes de prédisposition héréditaire aux cancers, cette situation peut également arriver lorsqu'un allèle est altéré dans la lignée germinale (donc dans toutes les cellules de l'organisme), la seconde altération survenant de façon sporadique sur le deuxième allèle (Knudson, 2001).

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

- **p53**, également appelé « gardien du génome », est responsable de l'arrêt temporaire du cycle cellulaire permettant la réparation des éventuels dommages à l'ADN. Lorsque les lésions sont trop importantes, p53 peut alors orienter la cellule vers l'apoptose, débarrassant ainsi l'organisme des cellules potentiellement malignes. En règle générale, sa perte de fonction est liée à une délétion d'un des allèles et à une mutation du second. Le gène *TP53* est situé sur la région 17p13, des mutations sont retrouvées dans 25% des cancers du sein et sont associées à un mauvais pronostic (IARC TP53 Database, novembre 2009).
- **Rb**, premier gène suppresseur de tumeurs découvert, intervient dans le contrôle du cycle cellulaire. Selon son état de phosphorylation dû aux complexes cycline/cdk, la protéine Rb permet la libération du facteur de transcription E2F autorisant ainsi la transition G1/S. La perte du contrôle des « checkpoint » par Rb conduit donc à une prolifération anarchique des cellules. Dans le cancer du sein, on observe une perte d'expression de la protéine Rb ou une perte d'hétérozygotie dans 25 à 30% des cas (Bosco et Knudsen, 2007).
- **BRCA1 et BRCA2** sont des gènes suppresseurs de tumeurs dont les mutations prédisposent aux cancers du sein mais également aux cancers de l'ovaire, du pancréas et de la prostate. On estime aujourd'hui qu'une femme porteuse de l'un de ces gènes mutés a un risque de développer un cancer de sein avant 50 ans évalué entre 30 et 50% contre un risque de 2% pour

la population générale. Ces gènes codent des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN mais aussi dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la régulation de la transcription *via* leur interaction avec Rad51, p53 ou encore l'ARN polymérase II (Venkitaraman, 2002; Yoshida et Miki, 2004).

❖ *Activation d'oncogènes*

On considère comme oncogènes tous les gènes dont la régulation positive participe au processus oncogénique. Ces altérations génétiques peuvent être quantitatives (protéine produite en excès) ou qualitatives (protéine mutée hyperactive ou non régulée). Ces oncogènes peuvent être impliqués dans la transduction des signaux de prolifération (FGF, PDGF, EGFR, Erb-B2, Ras, Raf, MEK, Myc, Jun..), dans le contrôle du cycle cellulaire (Cycline D1, Cdk4, Cdc25), dans la régulation négative de l'apoptose (Bcl2, Bcl-XL, Survivine), dans la dissémination métastatique (métalloprotéases, protéines d'adhésion cellulaire) ou encore dans l'angiogénèse (VEGF). Dans le cancer du sein, les anomalies génétiques les plus fréquemment observées sont les amplifications de l'ADN alors que les autres mécanismes d'activation d'un oncogène tels que les mutations ponctuelles, les insertions géniques ou les réarrangements ne sont que très rarement observés (Osborne *et al.*, 2004).

Les amplifications les plus fréquentes dans le cancer du sein concernent les oncogènes c-myc, Erb-B2 et CCND1 (cycline D1).

- **c-myc** est localisé sur le chromosome 8q24 et code une phospho-protéine nucléaire qui régule la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Il est amplifié dans environ 15 à 25% des cancers du sein et plusieurs études montrent une corrélation avec des tumeurs de haut grade et un mauvais pronostic (Blancato *et al.*, 2004; Liao et Dickson, 2000).
- **Erb-B2 (HER2)**, localisé en 17q21-22, est l'homologue humain du gène *neu* isolé des cellules de neuroblastomes de rat. La protéine HER2 est un récepteur tyrosine kinase de la famille de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor* ou Erb-B1). *Via* l'activation des voies de signalisation des MAP-Kinases ou PI3K/Akt, il est impliqué dans de nombreux processus tels que la prolifération, l'angiogénèse, les interactions cellule/cellule, la formation de métastases ou encore la résistance à l'apoptose (Moasser, 2007). L'amplification du gène HER2 est parfaitement corrélée à la surexpression de sa protéine et est retrouvée dans environ 25% des cancers du sein. Les tumeurs HER2+ sont le plus souvent de haut grade histologique, négatives pour les récepteurs hormonaux, associées à un phénotype invasif et à un mauvais pronostic et résistantes à l'hormonothérapie et à certaines chimiothérapies.

C'est pourquoi ces tumeurs font aujourd'hui l'objet de traitements ciblés basés soit sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-HER2, le Trastuzumab (ou Herceptin™), soit sur un inhibiteur de tyrosine kinase spécifique de HER2 et de l'EGFR, le Tyverb (ou Lapatinib™) (Ross *et al.*, 2009). Actuellement, une nouvelle génération d'agents thérapeutiques plus spécifiques ou ciblant par exemple la dimérisation du récepteur sont entrés en phase clinique (Dean-Colomb et Esteva, 2008).

- **ccdn1**, localisé sur le chromosome 11q13, code la cycline D1, un régulateur majeur des transitions G1/S et G2/M mais également un facteur de transcription. La surexpression de cette cycline est retrouvée dans environ 50% des carcinomes mammaires alors que l'amplification de son gène ne se retrouve que dans 15% des tumeurs (Arnold et Papanikolaou, 2005). Cette différence s'explique par le fait que d'autres facteurs tel que les œstrogènes ou p53 (*via* p21^{WAF1}) interviennent dans la surexpression de la cycline D1 (Roy et Thompson, 2006). De plus, il a été montré que cette surexpression était corrélée à une résistance aux traitements par Tamoxifen dans les cancers hormono-dépendants (Stendahl *et al.*, 2004).

b) Origine cellulaire du cancer du sein

L'origine cellulaire des cancers a longtemps été expliquée par le modèle stochastique dans lequel chaque cellule d'un tissu, même différenciée, peut, à la suite de l'accumulation de mutations acquises de façon aléatoire, proliférer de façon indéfinie et former un clone tumoral indépendant. C'est le concept d'origine clonale des tumeurs. Cependant, certaines observations sont difficilement conciliables avec ce modèle. En particulier, les cellules différenciées prolifèrent peu et sont souvent renouvelées, ce qui rend la probabilité d'accumuler des mutations très faible. De plus, la plupart des tumeurs, y compris les tumeurs mammaires, sont très hétérogènes et présentent divers degrés de différenciation et de transformation ; il est alors difficile de comprendre comment une cellule bien différenciée peut aboutir à tout un panel de cellules moins différenciées. Enfin, si on considère que chaque cellule cancéreuse arbore un set de mutations suffisant pour former une tumeur, comment expliquer qu'il faille en injecter un si grand nombre pour former une nouvelle tumeur dans des modèles expérimentaux de xénogreffes (Polyak et Hahn, 2006; Shipitsin et Polyak, 2008).

Ces diverses questions trouvent réponses dans un concept plus récent : le modèle hiérarchique. En effet, de nombreuses données montrent, à l'instar du système hématopoïétique, que les tissus épithéliaux sont sujets à un constant remodelage hautement régulé. Ce renouvellement tissulaire implique une hiérarchie cellulaire qui comprend des cellules souches donnant naissance à des

cellules progénitrices précoces puis tardives. Cette notion présente plusieurs avantages conceptuels ; tout d'abord, les cellules souches ou progénitrices sont capables de donner naissance à tous les types cellulaires du tissu dans lequel elles se trouvent. De plus, elles sont caractérisées par un potentiel de renouvellement illimité ce qui font d'elles de parfaits candidats susceptibles d'acquérir les mutations nécessaires à l'initiation de la transformation tumorale. C'est en 1997, par l'équipe de John Dick, que le terme de cellules souches cancéreuses (CSC) apparaît pour la première fois grâce à ses travaux sur la leucémie où il a démontré que seule une petite partie des cellules tumorales était capable d'initier une leucémie dans un modèle animal et que ces cellules partageaient des propriétés propres aux cellules souches (Bonnet et Dick, 1997). Depuis, des CSC ont été isolées dans de nombreux cancers, y compris le cancer du sein (Charafe-Jauffret *et al.*, 2008).

Dans les tumeurs mammaires, les CSC proviendraient directement des cellules souches normales adultes de l'épithélium qui seraient seules le siège des altérations génétiques tumorales. Ainsi, les caractéristiques de ces CSC vont être celles des cellules souches normales, auto-renouvellement, longue durée de vie, capacité à reproduire l'hétérogénéité cellulaire, auxquelles s'ajoutent d'autres propriétés acquises à la suite des altérations génétiques, comme la prolifération continue et l'autonomie vis-à-vis de la « niche » environnementale dans laquelle se développent les cellules souches (Figure 7). Dans la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7, il a été estimé que les CSC ne représentaient que 2% de la population totale mais seul ces 2% furent capables de former une tumeur et de reconstituer l'hétérogénéité initiale de la lignée MCF-7 après injection dans des souris NOD/SCID (Kondo *et al.*, 2004; Patrawala *et al.*, 2005). Un phénotype fondée sur l'expression de marqueurs de surface a également été mis en évidence et est défini par l'expression de CD44 et l'absence ou la faible expression de CD24 ($CD44^{+}/CD24^{-/low}$) (Al-Hajj *et al.*, 2003; Ponti *et al.*, 2005). Toutefois, il existe des divergences sur la relevance de ces marqueurs moléculaires et il se pourrait que les caractéristiques des cellules dites « CSC » ne soient qu'un phénotype associé aux avantages sélectifs que confère l'accumulation des altérations du génome pendant l'évolution tumorale.

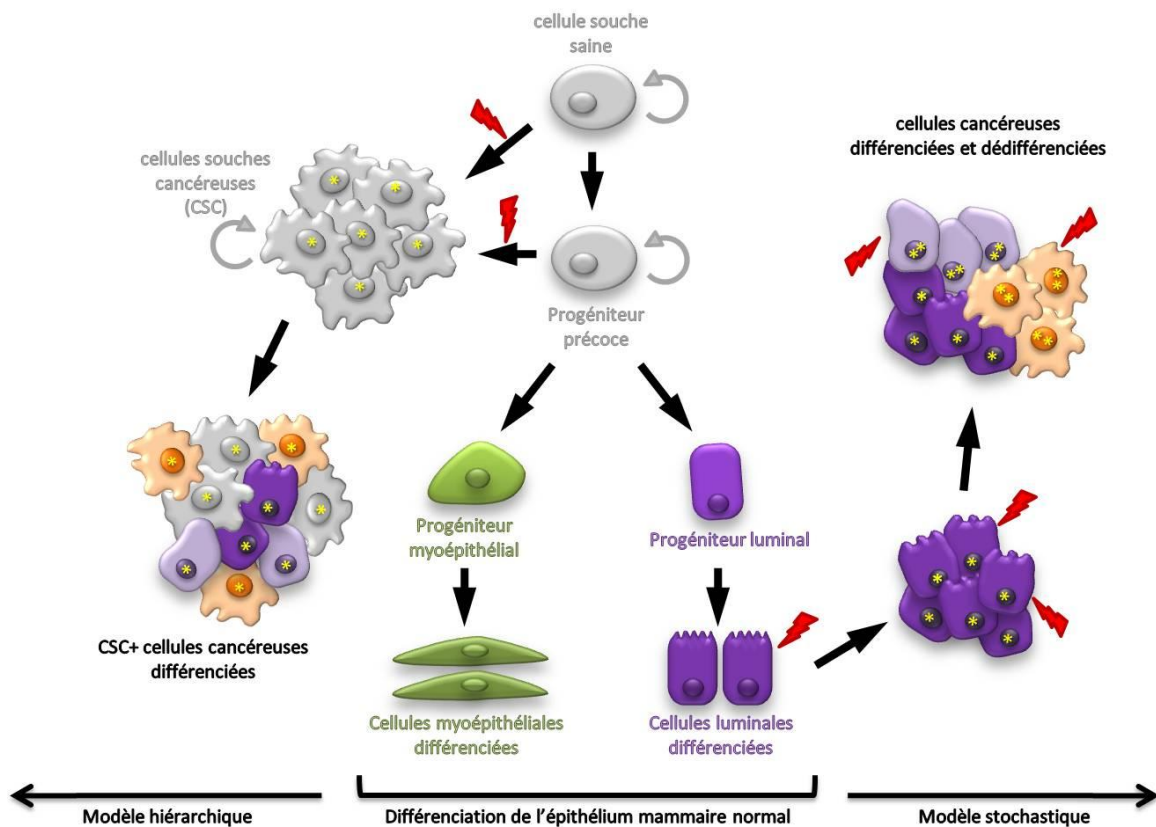


Figure 7 : Deux modèles hypothétiques de l'origine cellulaire du cancer du sein.

Dans le modèle stochastique, chaque cellule de l'épithélium mammaire (ici une cellule lumentale) peut être transformée et donner un clone tumoral composé de cellules qui ont toutes la capacité de proliférer de façon indéfinie et d'évoluer (dédifférenciation, redifférenciation..) en réponse à l'accumulation de nouvelles altérations oncogéniques (étoiles jaunes). Dans le modèle hiérarchique, seule une cellule souche ou progénitrice peut être la cible de l'oncogenèse. Ainsi, seules les cellules souches cancéreuses vont proliférer de façon indéfinie et donneront naissance à l'hétérogénéité tumorale en contrôlant la différenciation (Ginestier et al., 2007; Shipitsin et Polyak, 2008).

c) Influence du microenvironnement tumoral

Les cellules épithéliales mammaires font partie d'un microenvironnement complexe qui comprend la matrice extracellulaire, des facteurs diffusibles tels que les cytokines ou les facteurs de croissance, et une grande variété de cellules non épithéliales comme les cellules endothéliales, les lymphocytes, les macrophages ou encore les fibroblastes. Lors de la tumorigénèse, les cellules épithéliales cancéreuses modifient le stroma notamment grâce aux facteurs de croissance qui peuvent induire l'angiogénèse, altérer la matrice extracellulaire, accélérer la croissance des fibroblastes ou encore accroître le recrutement des cellules inflammatoires. En retour, les cellules du stroma, en contribuant au remodelage de la matrice et en tant que source importante de facteurs de croissance, sont également capables d'avoir une action protumorale.

L'importance de la communication entre les cellules épithéliales et les cellules du stroma lors de la tumorigénèse a notamment été démontrée par des études récentes de Moses et collaborateurs. Bien qu'il soit connu que le TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) présente un effet anti-prolifératif sur les cellules tumorales à des stades précoces (Chang *et al.*, 2007), l'équipe de Moses a montré grâce à un modèle de co-transplantation chez la souris que des fibroblastes KO pour le récepteur au TGF- β favorisaient la croissance et l'invasion des cellules épithéliales cancéreuses mammaires en augmentant l'expression de l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) et de sa signalisation (Bhowmick *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007, 2008).

Le facteur de croissance VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) est un autre exemple d'interaction stroma-épithélium favorisant la tumorigénèse. En effet, le VEGF est sécrété par les cellules tumorales mais également par les cellules endothéliales. Il favorise la formation de métastases par différentes actions puisqu'il induit à la fois la résistance à l'apoptose et la migration des cellules cancéreuses, mais augmente aussi la prolifération des cellules endothéliales, la perméabilité microvasculaire et l'angiogénèse ce qui aboutit à une meilleure nutrition de la tumeur et à l'essaimage des cellules cancéreuses. Son expression est d'ailleurs associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein et il est la cible de nombreuses approches thérapeutiques prometteuses (Grothey et Galanis, 2009; Mohammed *et al.*, 2007).

A la longue liste des facteurs de croissance capables d'agir de façon autocrine ou paracrine sur les cellules cancéreuses de sein, notre laboratoire a ajouté la famille des neurotrophines. En effet, les cellules cancéreuses mammaires sécrètent le NGF (*Nerve Growth Factor*), le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) ainsi que la NT4/5 (*Neurotrophin 4/5*) et ces facteurs induisent la prolifération et/ou la survie de ces mêmes cellules (Descamps *et al.*, 2001b; Dolle *et al.*, 2003)(Vanhecke *et al.*, 2010, en annexe). De plus, ils constituent de potentielles cibles thérapeutiques dans la mesure où l'utilisation d'anticorps bloquant anti-NGF, anti-BDNF ou anti-NT4/5 réduit la formation de tumeurs mammaires dans un modèle de xénogreffes (Adriaenssens *et al.*, 2008)(Vanhecke *et al.*, 2010, en annexe). Le NGF produit par les cellules cancéreuses mammaires agit également de manière paracrine en augmentant la migration et l'invasion des cellules endothéliales (Dolle *et al.*, 2005a; Romon *et al.*, 2010).

Notons que les facteurs de croissance ne sont pas le seul mode d'action des cellules du microenvironnement sur les cellules cancéreuses mammaires. C'est le cas par exemple des métalloprotéases (MMPs) capables de dégrader la matrice extracellulaire favorisant ainsi l'invasion des cellules tumorales ou des chimiokines, comme la SDF1/CXCL12 (*Stromal cell-Derived Factor 1/Chemokine CXC motif Ligand 12*) sécrétée par les fibroblastes et les péricytes. Elle favorise la prolifération des cellules tumorales exprimant son récepteur CXCR4 (*CXC chemokine Receptor 4*) et

contribue à l'angiogénèse *via* le recrutement de progéniteurs endothéliaux (Orimo *et al.*, 2005). Ainsi, étant données les nombreuses observations concernant l'action paracrine du microenvironnement dans la tumorigénèse mammaire, cibler les différentes molécules dérégulées pourrait faire émerger de nouvelles opportunités thérapeutiques (Joyce, 2005; Joyce et Pollard, 2009).

5. Stratégies thérapeutiques émergentes

Les thérapies actuelles telles que la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont souvent complétées par l'hormonothérapie (Tamoxifen, inhibiteurs d'aromatases) et/ou des thérapies ciblées telles que l'Herceptine™ (ou trastuzumab, anticorps monoclonal humanisé anti-ErbB-2) ou plus récemment l'Avastin™ (ou bevacizumab, anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF). Cependant ces traitements ciblés ne sont indiqués que dans certains cas, le plus souvent dans les cancers du sein métastatiques et/ou qui surexpriment le récepteur ErbB-2. De plus, la résistance intrinsèque ou acquise à ces traitements est toujours une limite et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques reste primordiale pour améliorer l'efficacité des traitements du cancer du sein. Actuellement, les nouvelles approches faisant l'objet d'essais cliniques ciblent l'induction de l'apoptose ou l'inhibition de protéines anti-apoptotiques, la transduction du signal et l'angiogénèse (Normanno *et al.*, 2009; Schlotter *et al.*, 2008).

a) Ciblage des voies pro- et anti-apoptotiques

La résistance à l'apoptose est une des grandes caractéristiques du cancer et est une cause majeure d'échec des traitements. Elle peut être due à des mutations ou modifications épigénétiques qui conduisent à une faible expression des protéines pro-apoptotiques ou à une surexpression de protéines anti-apoptotiques. Par conséquent, le design de nouvelles drogues capables de réactiver les processus de mort cellulaire représente une option thérapeutique prometteuse. La cytokine TRAIL (*tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*), de part sa capacité à induire l'apoptose dans de nombreuses cellules cancéreuses sans affecter la viabilité des cellules normales, en fait partie. Deux approches sont actuellement utilisées : la synthèse de différentes formes solubles de TRAIL recombinant et des anticorps monoclonaux agonistes dirigés contre les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Newsom-Davis *et al.*, 2009). Dans le premier cas, différentes versions taguées de la protéine ont été testées mais c'est la version non modifiée du TRAIL recombinant humain, appelé Apo2L/TRAIL ou **dulanermin**, qui semble avoir la meilleure activité anti-tumorale *in vivo* et qui fait d'ailleurs l'objet de plusieurs essais cliniques de phase I et II dans les cancers colorectaux, les cancers du poumon non à petites cellules et les lymphomes non-Hodgkinien (<http://clinicaltrials.gov/>). Bien que les résultats soient encourageants, cette molécule a une demi-vie

courte dans le plasma et peut être toxique à des doses élevées, c'est pour résoudre ces problèmes qu'ont été développés les anticorps monoclonaux agonistes, plus spécifiques et ayant une durée de vie plus longue. On peut citer le **conatumumab**, un anticorps monoclonal anti-TRAIL-R2, actuellement en essais cliniques dans de nombreux cancers, en monothérapie ou en association avec d'autres agents cytotoxiques, et en phase II dans le cancer du sein (Wiezorek *et al.*, 2010).

Une autre stratégie consiste à cibler les protéines impliquées dans la voie mitochondriale de l'apoptose voire à cibler la mitochondrie elle-même (Fulda *et al.*, 2010). En effet, un grand nombre de protéines pro- ou anti-apoptotiques convergent vers la membrane mitochondriale pour activer ou inhiber le relargage de facteurs pro-apoptotiques vers le cytosol. Parmi celles-ci, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein-2*), de part sa surexpression dans de nombreux cancers, est associée à la résistance aux drogues cytotoxiques des cellules cancéreuses. Plusieurs composés visent à inhiber cette protéine, parmi eux l'**Oblimersen** (ou G3139) est un oligonucléotide antisense dirigé contre l'ARNm de Bcl-2 inhibant ainsi sa traduction. Un essai clinique de phase I/II a été mené chez des patientes atteintes d'un cancer du sein afin d'évaluer son efficacité et son éventuelle toxicité en combinaison avec la doxorubicine et le docetaxel. Malgré une bonne tolérance au traitement, cet essai fut plutôt décevant dans la mesure où aucune amélioration significative n'a pu être montrée. Ces résultats sont en partie dus à la faible diminution de la protéine Bcl-2 dans les conditions d'administration de l'Oblimersen utilisées pour cet essai (Moulder *et al.*, 2008). Un autre composé faisant partie de la famille des biphosphonates, le **clodronate** agit, lui, directement sur le potentiel membranaire de la mitochondrie en inhibant la protéine ANT (*Adenine Nucleotide Translocase*) qui fait partie du pore de transition de perméabilité (*PTPC, Permeability Transition Pore Complex*). L'inhibition de ce pore perturbe la consommation d'oxygène de la mitochondrie et induit l'apoptose. Une étude effectuée sur 302 patientes a montré que cette molécule améliorait la survie globale des patientes atteintes d'un cancer du sein et de micrométastases dans la moelle osseuse (Diel *et al.*, 2008).

b) Inhibition des voies de signalisation

La voie de signalisation mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) joue un rôle central dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la survie, la migration, l'angiogénèse ou la synthèse protéique (Dancey, 2010). Bien qu'aucune mutation ni de surexpression de mTOR ne soit reportée, les voies de signalisation en amont de cette protéine telles que celles de l'IGF-1, de l'EGF ou encore du VEGF sont souvent dérégulées dans les cancers (Bjornsti et Houghton, 2004; Guertin et Sabatini, 2007). De plus, la rapamycine, un inhibiteur naturel de mTOR, présente une activité anti-tumorale dans plusieurs modèles de tumeurs solides. Pour le cancer du sein, la rapamycine inhibe la croissance dans 20 lignées de cellules cancéreuses mammaires et augmente de manière significative

l'efficacité de l'Herceptine™ dans les cellules surexprimant HER2 (Wang *et al.*, 2007). Par conséquent, des dérivés de la rapamycine comme le **temsirolimus** ou l'**everolimus**, ayant une meilleure solubilité et stabilité, ont été développés et sont actuellement en essais cliniques dans le cancer du sein. Pour exemple, une étude sur 270 patientes a montré que l'everolimus augmentait l'efficacité du letrozole, un anti-aromatase, chez les patientes atteintes d'un cancer du sein hormono-dépendant (ER+) (Baselga *et al.*, 2009).

Une autre cible intéressante est la protéine chaperonne HSP90 (*Heat Shock Protein 90*). En effet, cette protéine intervient dans la maturation et la stabilisation de nombreuses oncoprotéines, ce qui rend les cellules cancéreuses particulièrement dépendantes de sa bonne fonctionnalité. Parmi les « clients » de cette chaperonne, on retrouve des récepteurs tyrosine kinase (HER2, EGFR, PDGFR), des protéines de signalisation (p53, v-Src, Akt, Raf-1, IKK), des régulateurs du cycle cellulaire (cdk4, cdk6) ou encore des récepteurs aux stéroïdes (récepteurs aux androgènes, œstrogènes et progestérone), la plupart de ces protéines étant mutées et/ou surexprimées dans de nombreux cancers. En tant que tel, un seul composé inhibant HSP90 permettrait donc de court-circuiter de multiples voies de signalisation cruciales pour les cellules cancéreuses (Di Cosimo et Baselga, 2008; Li *et al.*, 2009a). Dans ce sens, des composés comme la **tanespimycine** ciblant le site de fixation de l'ATP de la chaperonne HSP90 ont été développés. Cet inhibiteur a fait l'objet d'un essai clinique chez des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+ métastatique, réfractaires à l'Herceptine™. Les résultats ont été encourageants puisqu'un co-traitement tanespimycine/Herceptine™ a montré une bonne activité anti-tumorale suggérant une potentialisation de l'Herceptine™ par l'inhibiteur de HSP90 ou un effet propre de l'inhibiteur (Modi *et al.*, 2007). Il serait donc intéressant de tester l'activité anti-tumorale des inhibiteurs de HSP90 en monothérapie.

c) Inhibition de l'angiogénèse

Après le succès de l'Avastin™ (ou bevacizumab, anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF), de nouveaux agents anti-angiogéniques ont vu le jour. La majorité de ces agents sont des inhibiteurs « multikinases », ils ciblent les récepteurs du VEGF ainsi que d'autres tyrosine kinases. Le **sorafenib** (ou Nexavar®) en est un exemple ; à l'origine développé pour cibler la kinase Raf, il inhibe également les trois récepteurs du VEGF, le récepteur du PDGF- β (*Platelet-Derived Growth Factor- β*) et le récepteur du SCF (*Stem-Cell Factor*), c-Kit (Wilhelm *et al.*, 2008). Le sorafenib est donc un agent anti-angiogénique mais également anti-prolifératif et il a été montré *in vitro* dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 qu'il pouvait induire l'apoptose *via* l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (*Myeloid Cell Leukemia-1*) (Yu *et al.*, 2005). Cette molécule est d'ores et déjà approuvée aux Etats-Unis et en Europe pour les traitements des cancers du rein et du foie.

Concernant le cancer du sein, un premier essai clinique avec le sorafenib en monothérapie a montré des résultats décevants chez des patientes atteintes de cancers du sein métastatiques (Moreno-Aspitia *et al.*, 2009). Toutefois, plusieurs essais cliniques sont en cours pour étudier son effet en combinaison avec des thérapies plus classiques telles que des anti-aromatases (Letrozole, Anastrozole) ou des anti-mitotiques (Paclitaxel, Doxorubicine, Cyclophosphamide).

Un autre inhibiteur « multikinase », le **sunitinib**, déjà approuvé pour les cancers du rein et les tumeurs stromales digestives, a montré des résultats prometteurs contre le cancer du sein. Il cible les trois récepteurs du VEGF, les PDGFR α et β , c-Kit, le récepteur RET (*REarranged during Transfection*), FLT-3 (*FMS-Like Tyrosine kinase-3*) et le récepteur du CSF-1 (*Colony-Stimulating Factor-1*). Un essai clinique de phase II chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique résistant aux taxanes et anthracyclines a montré un taux de réponse de 11% au sunitinib en monothérapie. De manière intéressante, le taux de réponse passe à 15% si l'on considère les patientes atteintes d'un cancer dit « triple négatif » (ER-/PgR-/HER2-) et à 25% chez les patientes HER2 positive prétraitées à l'Herceptine™ (Burstein *et al.*, 2008). D'autres études ont été menées plus récemment avec des traitements combinés ; brièvement, sunitinib+paclitaxel a un taux de réponse de 38,9% (Kozloff *et al.*, 2010) ; sunitinib+Herceptine, 24% (Blay *et al.*, 2010); sunitinib+Herceptine+docetaxel, 77,7% (Dirix *et al.*, 2010; Rosen *et al.*, 2010). Notons qu'un autre essai clinique avec un co-traitement sunitinib+paclitaxel+Avastin s'est montré trop toxique pour les patientes et a dû être stoppé, suggérant que la combinaison de deux traitements anti-angiogéniques n'est pas réalisable avec le protocole utilisé lors de cet essai (Mayer *et al.*, 2010).

Comme nous venons de le voir, le développement de thérapies ciblées dans le cancer du sein ne cesse de s'accroître. La liste, non exhaustive, des molécules citées précédemment permet d'avoir un aperçu des stratégies actuelles les plus prometteuses (Figure 8). Cependant, à l'image de l'Herceptine™ pour les cancers du sein HER2 positifs, la plupart de ces composés ne sont actifs que dans certains cas. Rappelons que les cancers du sein HER2+ ne représentent que 15% des cancers du sein et que parmi ces 15%, on évalue à environ 30% les patients répondant à l'Herceptine™ en premier traitement et à 15% pour ceux préalablement traités par d'autres drogues. De plus, de nombreux patients deviennent résistants au cours de leurs traitements mettant en exergue la complexité et l'hétérogénéité du cancer du sein. En effet, seule une minorité de tumeurs mammaires dépendent de l'activation d'une seule voie de signalisation. La majorité des tumeurs présentent un réseau complexe de différentes voies activées de manière aberrante et par conséquent sont capables de s'adapter et d'entraver l'efficacité d'un inhibiteur ne ciblant qu'une seule voie. Il est donc primordial aujourd'hui de continuer à découvrir et développer de nouvelles drogues pouvant agir en association avec celles existantes et/ou ciblant plusieurs voies simultanément.

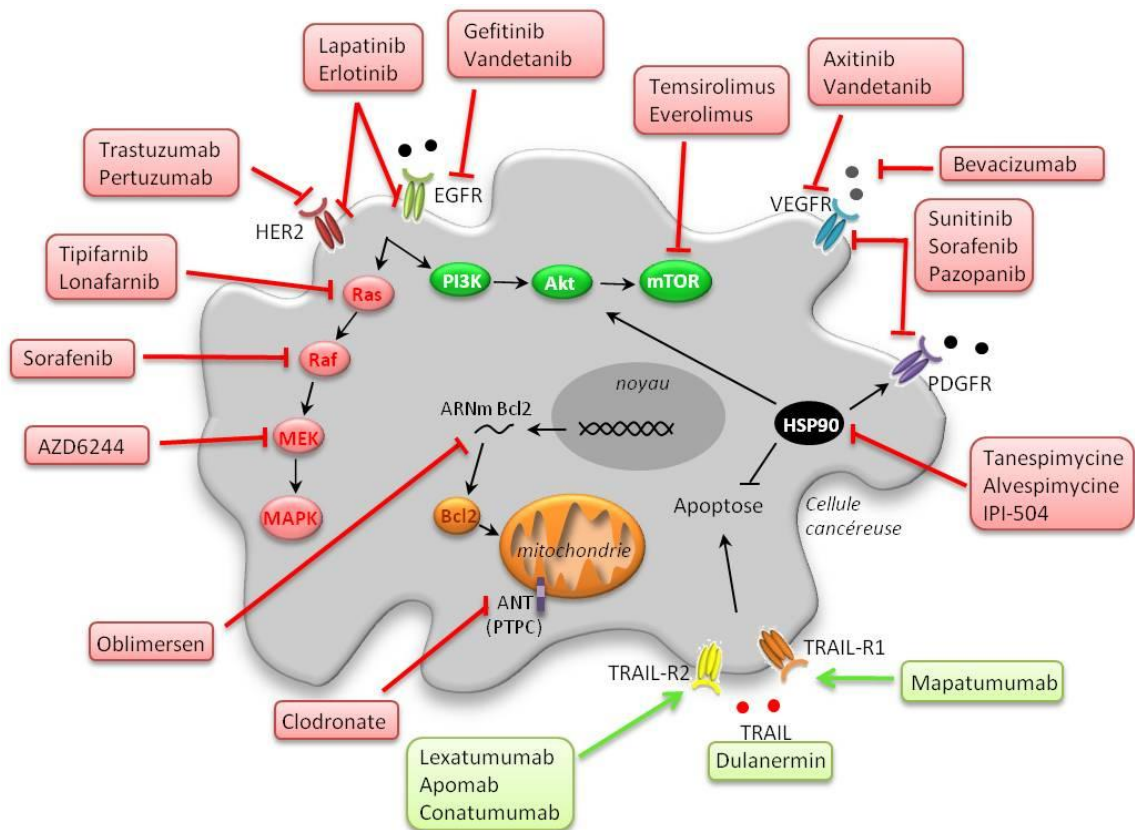


Figure 8 : Thérapies ciblées dans le cancer du sein.

Schéma résumant différents agents thérapeutiques actuellement en développement clinique ou préclinique dans le cancer du sein. Encadrés rouges : inhibiteurs ou anticorps monoclonaux humanisés antagonistes. Encadrés verts : protéine soluble ou anticorps monoclonaux humanisés agonistes. Aujourd'hui seuls le trastuzumab (Herceptin™), le lapatinib (Tyverb™) et le bevacizumab (Avastin™) sont utilisés en clinique pour le traitement des cancers du sein métastatiques (HER2+ pour l'Herceptin et le Tyverb).

6. Neurotrophines, p75^{NTR} et cancer du sein

Les neurotrophines, comme nous l'avons vu précédemment (§I.B.4.c), ont une influence sur le cancer du sein. En effet, notre laboratoire a montré que l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-NGF, anti-BDNF et anti-NT4/5 réduisait la formation de tumeurs mammaires dans un modèle de xénogreffes. Cette diminution de la croissance tumorale est notamment associée à une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques au sein des tumeurs (Adriaenssens *et al.*, 2008)(Vanhecke *et al.*, 2010, en annexe). *In vitro*, les cellules cancéreuses mammaires sécrètent le NGF, le BDNF ainsi que la NT4/5 pour induire leur propre prolifération et/ou survie (Descamps *et al.*, 2001b; Dolle *et al.*, 2003)(Vanhecke *et al.*, 2010, en annexe). De manière intéressante, notre laboratoire a également montré que cette résistance à l'apoptose induite par ces facteurs passait par un seul et même récepteur ; le récepteur commun à toutes les neurotrophines : p75^{NTR} (p75 NeuroTrophin Receptor). A l'heure où la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques reste primordiale et où contrecarrer les

phénomènes de résistance aux drogues est un enjeu majeur des nouvelles thérapies, l'étude de l'effet de survie associé au récepteur p75^{NTR} dans le cancer du sein apparait donc comme une évidence. C'est pourquoi, j'ai consacré ma thèse à décrypter les mécanismes d'action de ce récepteur dans les cellules cancéreuses mammaires.

II. P75^{NTR}, RECEPTEUR AUX MULTIPLES FACETTES

A. Le récepteur p75^{NTR}

La protéine p75^{NTR} fut identifiée en 1973 comme étant le récepteur du *Nerve Growth Factor* et fut logiquement appelé NGFR (*NGF Receptor*) (Herrup et Shooter, 1973). Son clonage en 1986 et des expériences de transfection ont révélé qu'il liait le NGF avec une faible affinité ($K_d=10^{-9}M$), il fut alors renommé récepteur de faible affinité du NGF, LNGFR (*low affinity NGFR*) (Chao *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 1986; Radeke *et al.*, 1987). Avec la découverte des autres membres de la famille des neurotrophines (BDNF, NT4-5, NT3), il est apparu que toutes liaient ce récepteur avec la même affinité dans la plupart des types cellulaires, d'où le nom de p75^{NTR} pour *Neurotrophin Receptor* (Rodriguez-Tebar *et al.*, 1990; Rodriguez-Tebar *et al.*, 1992).

1. Gène de p75^{NTR}

Le gène *NGFR* humain du récepteur p75^{NTR} (GeneID : 4804) contient 6 exons et couvre environ 23 kb du chromosome 17 en région q21-q22. Ce gène est transcrit en un ARNm de 3,4 kb (N° accession NCBI : NM_002507) contenant une région non codante de 300 nucléotides en 5' et de 2000 nucléotides en 3' avec une unique séquence consensus de polyadénylation (Johnson *et al.*, 1986). Son promoteur est très conservé chez le rat, la souris et l'homme. Il ne possède pas de séquence consensus TATA et CAAT mais contient plusieurs séquences riches en GC proches du site d'initiation de la transcription correspondant à un site de fixation du facteur de transcription Sp1. Plusieurs E-box sont également présentes dans le promoteur de *NGFR*, la plus proximale lie le facteur de transcription ME1 réprimant ainsi l'expression de p75^{NTR} alors que les facteurs NeuroD ou bHLH en se liant sur la même E-box activent sa transcription (Metsis, 2001). De plus, chez le rat, l'expression de p75^{NTR} est régulée par différents récepteurs nucléaires dont les éléments de réponses ont été trouvés dans son promoteur. Ainsi, le récepteur de la vitamine D3 réprime l'expression de p75^{NTR} dans les cellules de gliome (Naveilhan *et al.*, 1996). De même, la testostérone *via* le récepteur aux androgènes réprime la synthèse de p75^{NTR} au cours de la spermatogénèse (Lim *et al.*, 2009; Persson *et al.*, 1990). Enfin, l'acide rétinoïque permet la différenciation neuronale en activant directement la transcription de *NGFR* ou indirectement en induisant la synthèse du facteur de transcription NeuroD (Metsis *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2009).

2. Structure protéique de p75^{NTR}

Après le clivage de son peptide signal (28 aa), p75^{NTR} (N° accession NCBI : NP_002498) est un récepteur transmembranaire de type I de 399 acides aminés répartis en un domaine extracellulaire (222 aa), transmembranaire (19 aa) et intracellulaire (158 aa) (Figure 9).

❖ *Domaine extracellulaire et transmembranaire*

p75^{NTR} possède un site de N-glycosylation en N-terminal (position 33) et plusieurs sites de O-glycosylation dans le domaine juxtamembranaire, faisant passer sa masse moléculaire de 45 à 75 kDa (Large *et al.*, 1989). Ces glycosylations seraient impliquées dans l'adressage à la membrane du récepteur (Breuza *et al.*, 2002) ainsi que dans la liaison de ses ligands (Gong *et al.*, 2008). Le domaine extracellulaire de p75^{NTR} est également constitué de 4 domaines riches en cystéines appelés CRD (*Cystein-Rich Domain*), ce qui lui vaut d'appartenir à la superfamille des récepteurs du TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Chacun de ces CRD, numérotés de 1 à 4 à partir de l'extrémité N-terminale, contient 3 ponts disulfures conférant au récepteur sa conformation et permettant la liaison des ligands.

Le domaine transmembranaire consiste en une hélice transmembranaire unique de 19 acides aminés dans laquelle la cystéine C257 est hautement conservée chez l'homme, le rat, le xénope et l'amphioxus. Elle joue un rôle primordial dans la dimérisation du récepteur, dans le changement conformationnel induit par la liaison du ligand et par conséquent dans la transduction du signal (Vilar *et al.*, 2009).

❖ *Domaine intracellulaire*

Le domaine intracellulaire de p75^{NTR}, très conservé entre les espèces, ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque et doit donc sa signalisation à son association avec des adaptateurs cytoplasmiques qui peuvent se fixer sur différentes régions. Parmi celles-ci, la plus proéminente est le domaine de mort « DD » (*Death Domain*), il consiste en une structure globulaire de 80 acides aminés comprenant 6 hélices α . Contrairement aux autres membres de la famille des récepteurs du TNF (e.g. TNFR et Fas), il s'agit d'un domaine de mort de type II. Bien que les hélices 2 à 6 aient une orientation identique pour p75^{NTR} et Fas, c'est le réarrangement de l'hélice 1 qui diffère, avec un décalage de presque 90° entre les 2 domaines de mort (Liepinsh *et al.*, 1997). Cette différence a d'importantes conséquences physiologiques puisque le DD de p75^{NTR} ne présente pas les mêmes propriétés de multimérisation que Fas et il ne fixe pas les mêmes protéines adaptatrices (Wang *et al.*, 2001).

L'autre principale région du domaine intracellulaire, identifiée plus récemment, est un petit domaine de 29 acides aminés localisé dans la partie juxtamembranaire. C'est une équipe australienne qui

démontra que ce domaine était suffisant et nécessaire pour induire la mort neuronale et le baptisa « Chopper » en référence à un célèbre criminel australien. Il présente 95% d'homologie de séquence entre l'homme, le rat et le poulet mais n'est cependant pas conservé au sein des autres membres de la famille du TNFR. Notons que le domaine Chopper doit rester attaché à la membrane pour exercer son effet pro-apoptotique dans les neurones, la forme soluble agissant plutôt comme un dominant négatif et étant donc anti-apoptotique (Coulson *et al.*, 2000; Coulson *et al.*, 2004).

Situé à l'extrémité C-terminale de p75^{NTR}, on retrouve un tripeptide Serine-Proline-Valine (SPV) très conservé, qui est une séquence consensus de liaison aux protéines à domaines PDZ (*Post-synaptic Disc-large Zona*). Ces protéines permettent l'assemblage de complexes protéiques servant de plateforme de signalisation et pourraient également jouer un rôle dans la localisation cellulaire en interagissant directement avec les lipides membranaires (Gallardo *et al.*, 2010; Hung et Sheng, 2002).

Enfin, le domaine intracellulaire de p75^{NTR} est sujet à des modifications post-traductionnelles telles qu'une palmitoylation et plusieurs phosphorylations. En effet, une palmitoylation a été reportée sur la cystéine 279 juxtamembranaire et est nécessaire au clivage de p75^{NTR} par la γ -secrétase (§ II.A.3.b)(Barker *et al.*, 1994; Underwood *et al.*, 2008). Concernant les phosphorylations, il a été montré que le domaine de mort de p75^{NTR}, suite à la fixation du NGF, pouvait être phosphorylé sur 2 résidus tyrosine, Y336 et Y368, ce qui aboutit à l'activation/inactivation des GTPases Ras et RhoA intervenant dans la croissance des neurites (Blochl *et al.*, 2004; Blochl et Blochl, 2007). Dans une autre étude, la même tyrosine 336* phosphorylée permet la fixation d'une E3-ubiquitine ligase c-Cbl, favorisant ainsi l'ubiquitination de p75^{NTR} et probablement sa dégradation (Ohrt *et al.*, 2004). p75^{NTR} peut également être phosphorylé sur la sérine 304 par la PKA (*c-AMP-dependent Protein Kinase A*) permettant sa relocalisation dans les rafts lipidiques (Higuchi *et al.*, 2003). Enfin, une autre phosphorylation a été identifiée plus récemment sur la sérine 277. Ce résidu serait phosphorylé par la PKC (*Protein Kinase C*) et permettrait de contrôler la durée du signal du complexe p75^{NTR}/ligand après le transport rétrograde dans les neurones (Butow et Von Bartheld, 2009).

*Dans l'article original de Ohrt, la tyrosine en question est notée tyrosine 308 car le peptide signal n'est pas compté. Par souci de clarté et pour rester cohérente avec les autres résidus cités, qui eux le prennent en compte, j'ai ajouté les 28 acides aminés correspondant au peptide signal ce qui donne donc la tyrosine 336.

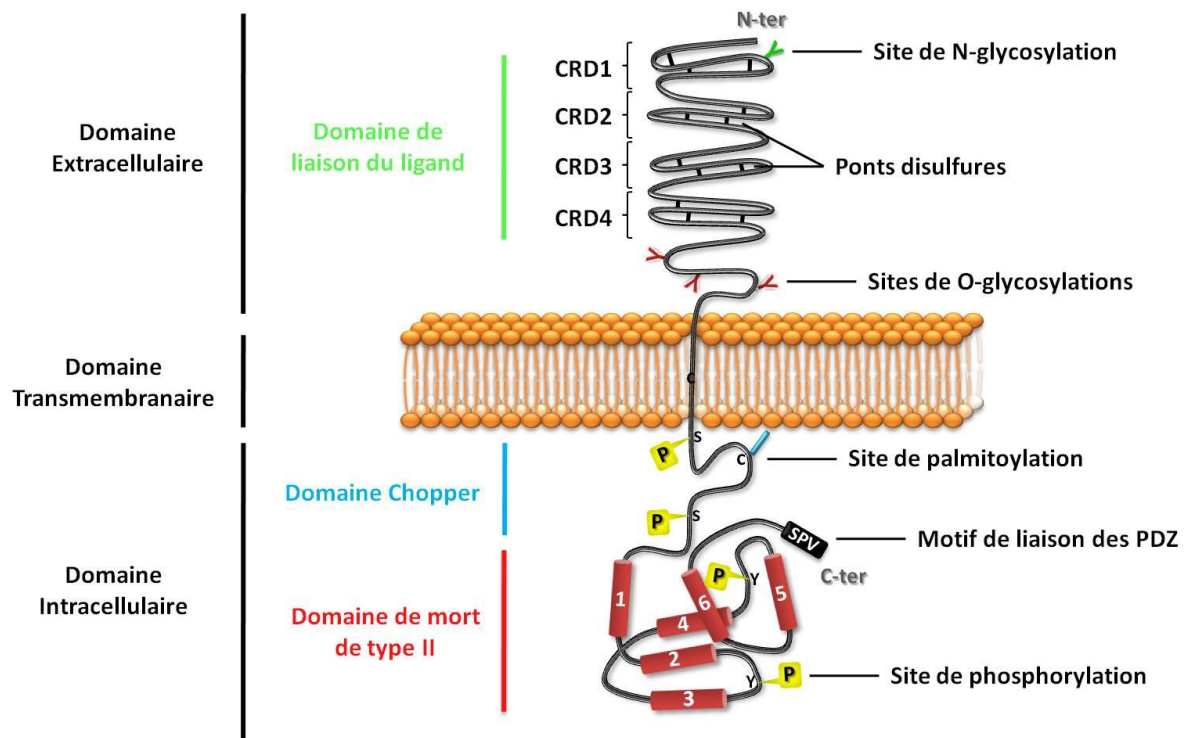


Figure 9 : Représentation schématique du récepteur p75^{NTR}.

Le récepteur p75^{NTR} est constitué d'un domaine extracellulaire comprenant 4 régions riches en cystéines (CRD1-4) permettant la liaison du ligand, d'un domaine transmembranaire unique contenant une cystéine conservée impliquée dans la dimérisation du récepteur et enfin d'un domaine intracellulaire comprenant un domaine Chopper juxtamembranaire, un domaine de mort formé de 6 hélices α et un tripeptide SPV en C-terminal permettant la liaison de protéines à domaine PDZ. Ce récepteur présente également plusieurs modifications post-traductionnelles telles que des N- et O-glycosylations, une palmitoylation permettant l'ancrage à la membrane ainsi que plusieurs phosphorylations impliquées dans le recrutement de partenaires protéiques et dans la transduction du signal (adapté de (Roux et Barker, 2002)).

3. Différentes formes de p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} peut être présent dans les cellules sous différentes formes. Celles-ci résultent soit d'un épissage alternatif de l'ARNm, soit d'une protéolyse du récepteur et sont présentées en Figure 10.

a) Epissage alternatif

Un transcrit alternatif de p75^{NTR} a été identifié dans les ganglions sympathiques de poulet. Sa séquence correspond à la séquence connue de p75^{NTR} excepté pour l'exon III qui est délété. Ce transcrit alternatif génère une isoforme dépourvue des CRD 2, 3 et 4 de son ectodomaine et est incapable de fixer le NGF, BDNF, NT3 ou NT4/5. Des analyses par RT-PCR ont montré que cette isoforme été exprimée également chez la souris, le rat et l'homme mais à un niveau plus faible que la forme pleine longueur (Von Schack *et al.*, 2001). Bien que les domaines transmembranaires et

intracellulaires de cette isoforme restent intacts et *a priori* fonctionnels, la fonction biologique de ce p75^{NTR} tronqué demeure inconnue.

b) Protéolyse de p75^{NTR}

Comme beaucoup d'autres protéines telles que l'APP (*β-Amyloid Precursor Protein*), Notch ou Erb-B4, le récepteur p75^{NTR} est la cible de deux clivages successifs connus sous le nom de RIP pour *Regulated Intramembrane Proteolysis*. Cette protéolyse de p75^{NTR} consiste tout d'abord en un premier clivage par la métalloprotéase ADAM17/TACE (*A Disintegrin And Metalloprotease/TNFα Converting Enzyme*) qui a lieu dans la partie extracellulaire juxtamembranaire. Ce clivage permet la libération d'un fragment soluble nommé p75^{NTR}-ECD (*ExtraCellular Domain*) comprenant le domaine extracellulaire de p75^{NTR} composé des 4 régions riches en cystéines capables de lier les neurotrophines. L'autre partie du récepteur, toujours liée à la membrane, comprend les domaines transmembranaires et intracellulaires et est appelée p75^{NTR}-CTF (*C-Terminal Fragment*). Le site exact de clivage par l'ADAM17 n'est pas connu, néanmoins des expériences de mutagenèse dirigée et une identification par spectrométrie de masse ont permis d'identifier 2 sites potentiels dans la séquence de p75^{NTR} : soit entre la proline 241 et la valine 242, soit entre la thréonine 244 et l'arginine 245 (Weskamp *et al.*, 2004; Zampieri *et al.*, 2005). De plus, la mutation de la valine 242 en asparagine permet la création d'un site de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) et inhibe le clivage de p75^{NTR} par ADAM17, probablement par encombrement stérique (Underwood *et al.*, 2008). Ce premier clivage est un pré-requis à un second réalisé sur le CTF par la presenilin-1 qui fait partie du complexe protéique γ-sécrétase. Ce second clivage a lieu dans la partie transmembranaire et libère dans le cytoplasme un fragment intracellulaire nommé p75^{NTR}-ICD (*IntraCellular Domain*). Le site de ce second clivage a été identifié par spectrométrie de masse et se situe entre les valines 263 et 264 juste après la séquence ²⁶⁰AAVV²⁶³. Notons que le clivage de l'APP par le complexe γ-sécrétase se fait après une séquence similaire GGVV (Jung *et al.*, 2003).

Au vue de cette protéolyse de p75^{NTR}, deux questions primordiales se posent : Ces clivages sont-ils régulés et, si oui, par quoi ? Ces clivages régulent-ils la signalisation de p75^{NTR} ou sont-ils « juste » un processus de dégradation du récepteur ? Plusieurs laboratoires ont apporté des éléments de réponses, parfois contradictoires. L'implication du second récepteur du NGF, TrkA (*Tropomyosin Receptor Kinase A*) a par exemple été reportée. En effet, dans les cellules de rat PC12 (*pheochromocytoma cell*), l'activation de TrkA par le NGF augmenterait le clivage de p75^{NTR} par ADAM17, le fragment p75^{NTR}-CTF serait alors transloqué dans les endosomes précoces pour y être clivé par le complexe γ-sécrétase (Urrea *et al.*, 2007). Dans la même lignée cellulaire, une autre équipe a montré que l'activation de TrkA par le NGF augmentait le clivage de p75^{NTR} *via* la voie des MAP-

kinases. Suite à ce clivage, p75^{NTR} activerait la voie Akt et provoquerait l'arrêt du cycle cellulaire (Ceni *et al.*, 2010). Dans un autre modèle, la lignée cellulaire HEK293 (*Human Embryonic Kidney*), la surexpression de TrkA augmente également le clivage de p75^{NTR}; de plus, le premier clivage est inhibé par un inhibiteur de Erk confirmant ainsi l'implication de la voie des MAP-kinase (Kanning *et al.*, 2003). Il est à noter que dans cette étude, aucune des neurotrophines testées (i.e. NGF, BDNF, NT3, proNGF et proBDNF) n'a d'effet sur le clivage de p75^{NTR}. Dans les mêmes cellules HEK293, il a été montré que suite au 1^{er} clivage, la palmitoylation de p75^{NTR} était nécessaire à la translocation du fragment CTF dans les rafts lipidiques où a lieu le 2nd clivage par le complexe γ -sécrétase. En revanche, dans cette étude, l'activation de TrkA inhibe la translocation du CTF et donc le 2nd clivage, remettant en question le rôle de TrkA dans la protéolyse de p75^{NTR} (Underwood *et al.*, 2008).

Hormis la voie des MAP-kinase, la voie JNK (*Jun N-terminal Kinase*) semble également impliquée. En effet, dans les neurones sympathiques de rat, le BDNF *via* p75^{NTR} active la kinase JNK3 qui va induire la transcription de la métalloprotéase ADAM17, p75^{NTR} sera alors clivé et le fragment soluble p75^{NTR}-ICD va de nouveau activer JNK3 pour induire la mort cellulaire de ces neurones. Il s'agit donc ici d'une activation biphasique de la voie JNK par p75^{NTR} qui autorégule ainsi son propre clivage (Kenchappa *et al.*, 2010). Enfin de nombreux articles ont reporté une translocation nucléaire du fragment p75^{NTR}-ICD suggérant une activité transcriptionnelle du récepteur (Bronfman, 2007). C'est le cas dans les cellules HEK293 où l'interaction de TRAF6 (*TNF Receptor-Associated Factor 6*) avec la presenilin-1 va induire l'ubiquitination et le clivage de p75^{NTR}, le fragment soluble p75^{NTR}-ICD sera alors transloqué dans le noyau et capable d'activer NF κ B (Kanning *et al.*, 2003; Powell *et al.*, 2009). De même, dans les neurones sympathiques, le clivage de p75^{NTR} induit par le BDNF entraîne l'ubiquitination de NRIF (*Neurotrophin Receptor Interacting Factor*), le complexe p75^{NTR}-ICD/NRIF est alors transloqué dans le noyau pour induire l'apoptose (Kenchappa *et al.*, 2006). Notons que la translocation nucléaire de NRIF due à p75^{NTR} est dépendante de son ubiquitination par TRAF6 (Geetha *et al.*, 2005). Il pourrait donc s'agir ici d'un nouveau mécanisme de signalisation de p75^{NTR} régulé par ubiquitination et translocation nucléaire. Néanmoins, malgré le nombre croissant de preuves suggérant une activité transcriptionnelle du fragment p75^{NTR}-ICD, un seul gène cible a été découvert à ce jour. En effet, des immunoprécipitations de la chromatine (ChIP) ont montré que, en réponse au NGF, ce fragment soluble interagissait avec le promoteur de la cycline E1 et réprimait la transcription de ce gène (Parkhurst *et al.*, 2010).

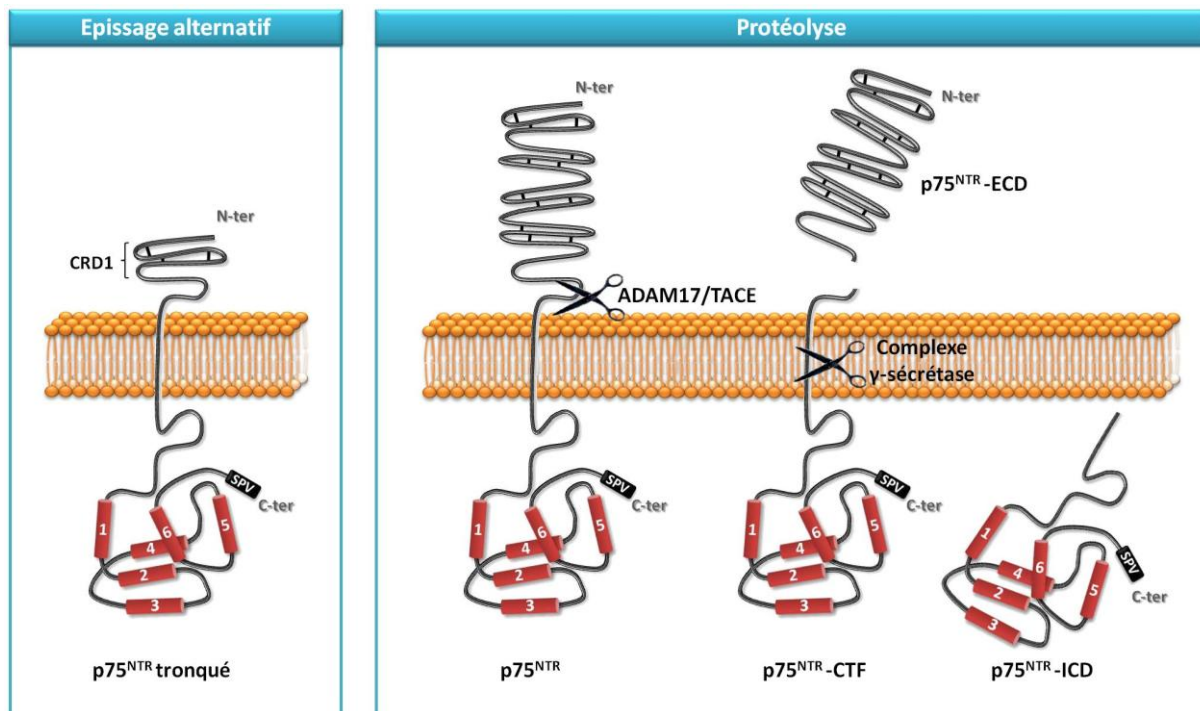


Figure 10 : Les différentes formes du récepteur p75^{NTR}.

La transcription du gène *NGFR* conduit à la forme complète du récepteur mais aussi à une forme tronquée résultant de l'épissage alternatif de l'exon III. Cette forme tronquée possède un domaine extracellulaire très court composé du seul CRD1 ne pouvant plus lier les neurotrophines. La forme complète de p75^{NTR} peut, elle, subir une protéolyse par une série de 2 clivages successifs. Le 1^{er} clivage par la métalloprotéase ADAM17/TACE libère d'une part, un fragment soluble correspondant à la partie extracellulaire du récepteur, le p75^{NTR}-ECD, pouvant toujours fixer les neurotrophines. D'autre part, l'autre partie ancrée à la membrane, le p75^{NTR}-CTF, comprend les domaines transmembranaires et intracellulaires étant toujours capables de recruter des partenaires protéiques. Le 2nd clivage par le complexe γ-sécrétase a lieu dans la partie transmembranaire du fragment CTF et libère dans le cytoplasme la partie intracellulaire nommée p75^{NTR}-ICD capable de se transloquer dans le noyau, suggérant une activité transcriptionnelle.

B. Une famille de ligands, les neurotrophines

1. La découverte

Il y a maintenant plus de 50 ans, Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger et Stanley Cohen découvrirent le premier facteur de croissance en observant qu'une tumeur de souris transplantée dans un embryon de poulet était capable de sécréter une substance favorisant l'innervation de la tumeur. Ils appelèrent cette substance « nerve growth factor ». Ainsi, le NGF fut isolé en 1954 (Cohen *et al.*, 1954) et vaudra à Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen le prix Nobel en 1986. Ce n'est que 30 ans plus tard, en 1982, que le BDNF fut purifié à partir de tissu issu du cerveau de cochon (Barde *et al.*, 1982). Feront suite les découvertes de la neurotrophine 3 (NT3) par plusieurs équipes simultanément en 1990 (Hohn *et al.*, 1990; Jones et Reichardt, 1990; Maisonpierre *et al.*, 1990;

Rosenthal *et al.*, 1990) et de la neurotrophine 4/5 découverte consécutivement chez le xénope, le rat et l'homme (Berkemeier *et al.*, 1991; Hallbook *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1992).

Chaque neurotrophine est issue de la maturation protéique de la proneurotrophine correspondante. Bien que ces proformes soient connues, elles étaient considérées comme inactives et ce n'est qu'au début des années 2000 que les proneurotrophines furent « redécouvertes ». Ainsi, Lee et ses collaborateurs montrèrent que le proNGF et le proBDNF pouvaient être sécrétés et avoir une action pro-apoptotique sur les neurones *via* p75^{NTR} alors que les formes matures activaient les récepteurs Trk pour promouvoir leur survie (Lee *et al.*, 2001).

2. Des gènes aux protéines

Issus de la duplication d'un gène ancestral, les gènes des neurotrophines sont très conservés et se répartissent, respectivement, sur les chromosomes 1, 11, 12 et 19 pour les gènes du NGF, BDNF, NT3 et NT4/5. Leurs synthèses aboutissent à des précurseurs protéiques de tailles voisines présentant une forte homologie de séquence et des poids moléculaires très proches (Table 3).

Neurotrophine	Localisation du gène	Taille de l'ARNm (pb)	N° NCBI	Taille en acides aminés	N° Uniprot
NGF	1p13,1	1052	NM_002506	241	P01138
BDNF	11p13	4659	NM_170735	247	P23560
NT3	12p13	1204	NM_002527	257	P20783
NT4/5	19q13,3	1021	NM_006179	210	P34130

Table 3 : Caractéristiques des neurotrophines.

Neurotrophines humaines et leurs localisations chromosomiques. Taille du transcrit majoritaire avec son numéro d'accèsion NCBI. Taille en acides aminés de la préproneurotrophine avec son numéro d'accèsion Uniprot.

La synthèse des neurotrophines se fait par le même processus de maturation pour tous les membres de la famille. D'abord sous la forme de préproneurotrophines immatures d'environ 30kDa, ils sont dans un premier temps séparés de leur peptide signal dans le réticulum endoplasmique. Les proneurotrophines peuvent, ensuite, être clivées au niveau d'un site d'acides aminés dibasiques par des protéases intracellulaires telles que la furine ou des proconvertases (Bresnahan *et al.*, 1990; Seidah *et al.*, 1996) ou par des protéases extracellulaires après sécrétion comme la plasmine et certaines métalloprotéases (MMP-3 et MMP-7) pour donner les neurotrophines matures (Lee *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2004). Une fois maturées, les neurotrophines s'homodimérisent de façon non covalente où les deux monomères sont orientés en miroir (Bradshaw *et al.*, 1994). Chaque

monomère est constitué, entre autres, de 6 cystéines conservées, formant 3 ponts disulfures permettant de rigidifier la structure (Mcdonald et Hendrickson, 1993). Les motifs structuraux des neurotrophines étant très conservés, elles peuvent également s'hétérodimériser *in vitro* (Arakawa *et al.*, 1994; Heymach et Shooter, 1995). Néanmoins, ces formes sont moins stables et réversent vers leurs homodimères respectifs (Radziejewski et Robinson, 1993). De plus, le rôle biologique de ces hétérodimères *in vivo* demeure incertain.

3. Interactions avec p75^{NTR}

Contrairement aux autres membres de la superfamille des TNFR qui lient des ligands trimériques, p75^{NTR} fixe les neurotrophines sous leur forme homodimère suggérant une interaction ligand/récepteur différente.

La première cristallisation du NGF complexé avec le domaine extracellulaire de p75^{NTR} propose un rapport asymétrique 2:1 où un dimère de NGF s'associe à une molécule p75^{NTR} (He et Garcia, 2004). Dans ce modèle, le complexe est relié par deux sites bien distincts. Le site 1 est une interaction hydrophobique renforcée par 2 liaisons hydrogènes entre la partie « haute » du dimère de NGF et les domaines CRD1 et CRD2 de p75^{NTR}. Le site 2 est lui constitué de la jonction CRD3-CRD4 de p75^{NTR} qui interagit avec les boucles terminales du dimère de NGF. On y retrouve une complémentarité de type leucine-zipper renforcé par 2 liaisons ioniques. Bien que sur la face opposée du dimère de NGF on retrouve les mêmes sites, appelés pseudo-sites 1 et 2, sa fixation à p75^{NTR} entrainerait un changement de conformation interdisant la fixation d'un 2^{ème} p75^{NTR}. Notons que la séquence en acides aminés des 2 sites de liaisons est très conservée parmi les autres neurotrophines ce qui expliquerait leur affinité très proche pour le récepteur p75^{NTR} (Kd=10⁻⁹M).

Cependant, la cristallisation de He et Garcia a été réalisée avec un p75^{NTR} non glycosylé de rat et un modèle plus récent réalisé, lui, sur le domaine extracellulaire du récepteur humain N-glycosylé met clairement en exergue une stœchiométrie de 2:2 (Aurikko *et al.*, 2005). De la même manière, la cristallisation du complexe NT3-p75^{NTR} (humain et N-glycosylé) montre également un rapport symétrique 2:2 (Gong *et al.*, 2008). Ces études suggèrent, qu'en plus des CRD, la glycosylation de p75^{NTR} joue un rôle primordial dans la liaison avec ses ligands.

Ces 2 dernières études dans lesquelles p75^{NTR} est dimérique, sont d'ailleurs en accord avec des travaux récents (Vilar *et al.*, 2009). Vilar et ses collaborateurs ont montré qu'un pont disulfure s'établit entre deux monomères de p75^{NTR} au niveau de la cystéine 257 du domaine transmembranaire et que cette cystéine était indispensable à l'activation de p75^{NTR} par les neurotrophines. En effet, sans cette cystéine 257, p75^{NTR} n'est plus capable de recruter les

adaptateurs NRIF et TRAF6, ni de cliver la procaspase 3 pour ainsi induire l'apoptose en réponse au NGF dans les cellules HEK293. De la même manière, le BDNF n'est plus capable d'activer la voie JNK, ni d'induire l'apoptose des neurones SCG (*Superior Cervical Ganglion*) lorsque cette C257 est mutée. De plus, des expériences de FRET ont montré que les 2 domaines intracellulaires du dimère de $p75^{\text{NTR}}$ étaient proches dans des conditions basales alors qu'ils s'écartaient lors de la liaison du NGF. Les auteurs proposent 2 modèles pour expliquer ce phénomène dans lesquels le pont établi entre les 2 cystéines 257 servirait de pivot au dimère $p75^{\text{NTR}}$ qui s'ouvrirait à la façon soit d'une pince à escargots (« Snail-Tong » mechanism) soit d'une paire de ciseaux (Figure 11). Ce changement de conformation suite à la liaison des neurotrophines permettrait le recrutement des adaptateurs trimériques que $p75^{\text{NTR}}$ partage avec les autres membres de la superfamille des TNFR (Barker, 2009).

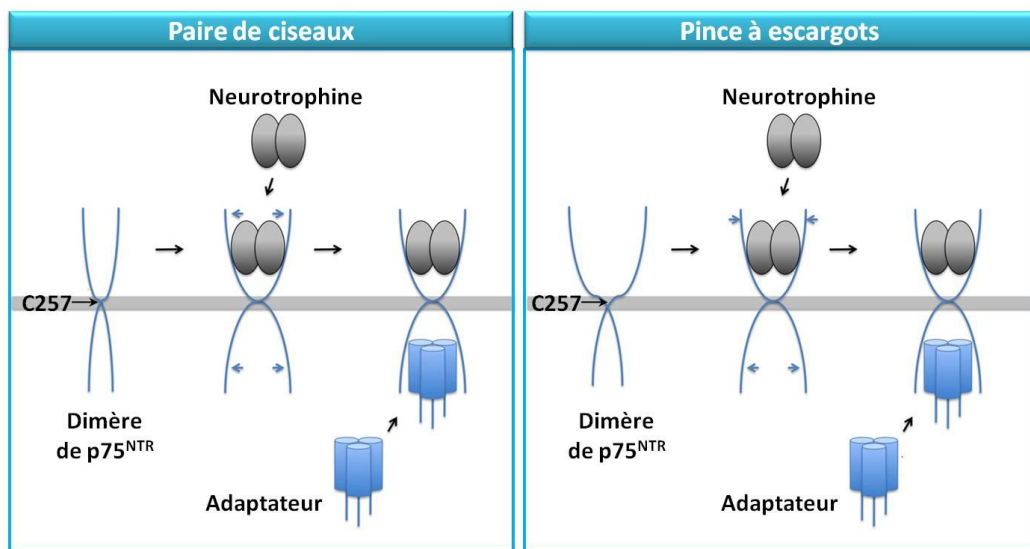


Figure 11 : Association transmembranaire de $p75^{\text{NTR}}$ et liaison des neurotrophines.

$p75^{\text{NTR}}$ s'homodimérise par l'établissement d'un pont disulfure entre les cystéines 257 de chaque monomère. A la façon d'une paire de ciseaux ou d'une pince à escargots, les domaines intracellulaires du récepteur s'écartent lors de la liaison des neurotrophines. Ce changement conformationnel permet le recrutement de protéines adaptatrices. Adapté de Barker, 2009.

4. $p75^{\text{NTR}}$, un récepteur à dépendance ?

Le dogme classique veut qu'un récepteur associé à son ligand induise une signalisation et un effet biologique alors qu'en absence de ligand, un récepteur est généralement considéré comme inactif. Dans ce sens, de nombreuses études visent à éclaircir les mécanismes d'action associés au complexe neurotrophines/ $p75^{\text{NTR}}$ et à sa signalisation. Néanmoins, certains travaux ont montré un effet propre au récepteur $p75^{\text{NTR}}$ en absence de ligand. En effet, pour la 1^{ère} fois en 1993, Rabizadeh et ses collaborateurs montrent que $p75^{\text{NTR}}$ induit la mort cellulaire de certains neurones en absence de ligand alors que l'ajout de NGF inhibe cet effet et protège donc les cellules de l'apoptose (Rabizadeh

et al., 1993). Ces résultats suggèrent que p75^{NTR} créerait ainsi une dépendance de la cellule au NGF et introduisent pour la première fois la notion de récepteur à dépendance. Dans ce concept, la liaison du ligand sur son récepteur induit une signalisation « positive » telle que la différenciation ou la survie alors que l'absence de ligand induit une signalisation « négative » et provoque la mort cellulaire caspase-dépendante (Mehlen et Bredesen, 2003). Des expériences *in vivo* confirment également cette notion ; des souris hémizygotes pour le NGF (mais exprimant normalement p75^{NTR}) montrent une réduction du nombre et de la taille des neurones cholinergiques du septum médian alors que le croisement de ces souris avec des souris p75^{-/-} permet de reverser cette réduction. Les auteurs ont donc conclu qu'en présence d'une très faible concentration en NGF, p75^{NTR} était responsable de cette atrophie neuronale (Naumann *et al.*, 2002). Depuis, la liste des récepteurs dit « à dépendance » ne cesse de s'agrandir avec par exemple les récepteurs à la netrine 1 et 4, DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*), RET (*Rearranged During Transfection*), ou encore le récepteur tyrosine kinase du GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*) (Goldschneider et Mehlen, 2010). Cependant, bien que p75^{NTR} fût le 1^{er} récepteur à dépendance décrit, certaines études montrent que le NGF est capable d'induire l'apoptose *via* ce récepteur dans les oligodendrocytes ou encore dans les neurones rétinien (Casaccia-Bonnel *et al.*, 1996; Frade *et al.*, 1996). Ces données contredisent le concept de récepteur à dépendance pour p75^{NTR} et l'arrivée des proneurotrophines étant capable d'induire l'apoptose *via* p75^{NTR} n'a fait que compliquer la vue d'ensemble (Beattie *et al.*, 2002; Yano *et al.*, 2009). Certains expliquent ces contradictions par les différents types cellulaires étudiés, d'autres par la présence ou non des récepteurs Trk et le ratio p75^{NTR}:Trk au sein des cellules. Aujourd'hui encore, le débat est toujours ouvert.

C. Signalisation de p75^{NTR} et partenaires associés

Le récepteur p75^{NTR}, comme les autres membres de la superfamille des TNFR, ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque et il doit donc sa signalisation au recrutement de partenaires protéiques menant à l'activation de diverses voies de signalisation (Figure 12). Ces voies de signalisation ont été principalement établies dans des modèles neuronaux et dans les cellules PC12. Elles aboutissent, selon le contexte cellulaire, à la survie, la mort par apoptose ou la régulation de la neuritogénèse et du cycle cellulaire.

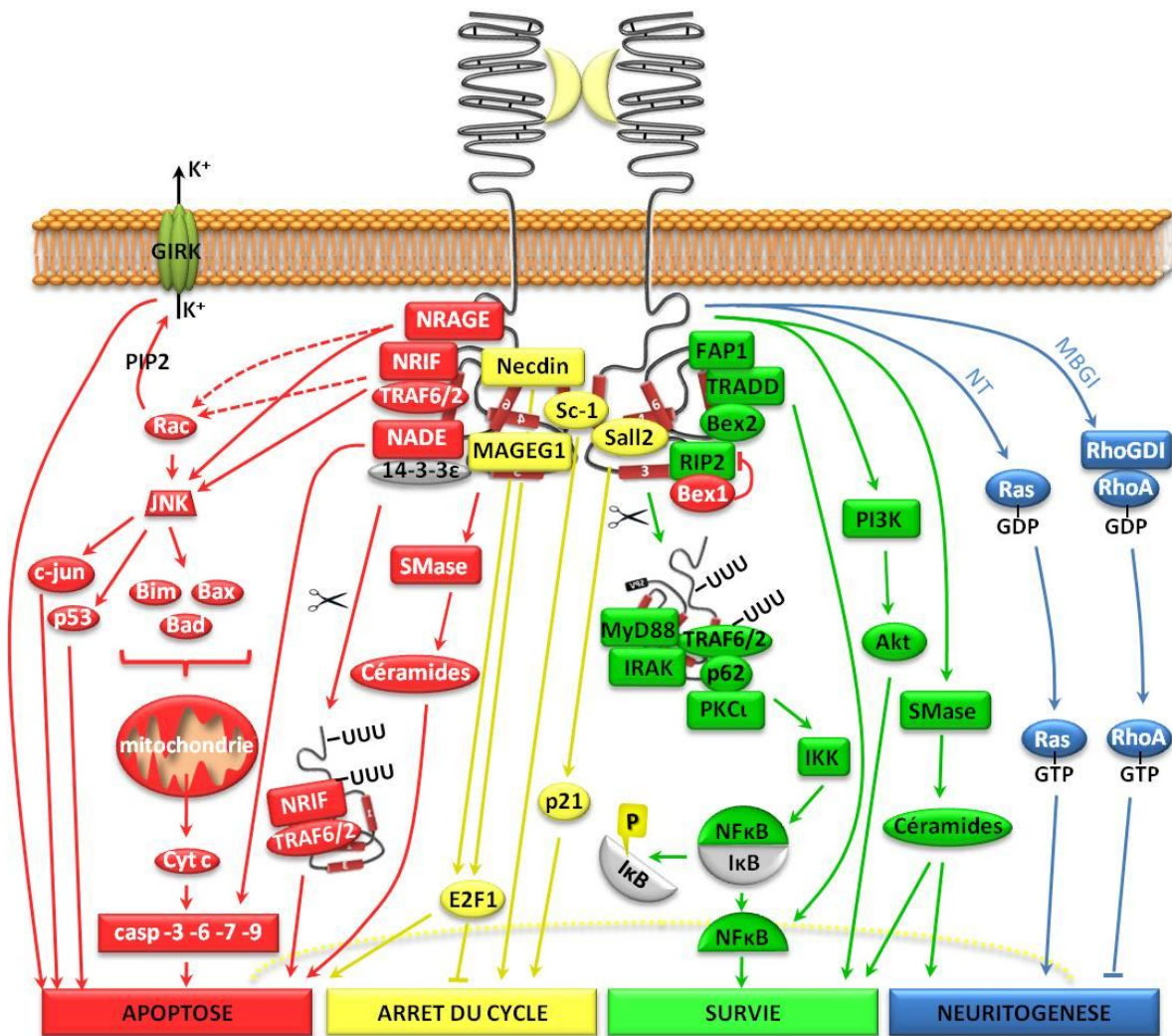


Figure 12 : Représentation schématique des voies de signalisation de p75^{NTR}.

La fixation des ligands à p75^{NTR} entraîne le recrutement de protéines adaptatrices au niveau des domaines intracellulaires du récepteur. Celles-ci initient des voies de signalisation d'apoptose (rouge), de survie (vert), un arrêt du cycle (jaune) ou la neuritogénèse (bleu).

Bad : Bcl-2 antagonist of cell death ; **Bax** : Bcl-2 associated X protein ; **Bex1/2** : Brain-expressed X-linked 1/2 ; **Bim** : Bcl-2 interacting mediator of cell death ; **casp** : caspases ; **Cyt c** : cytochrome c ; **E2F1** : E2 promoter binding Factor 1 ; **FAP1** : Fas-associated protein 1 ; **GDP/GTP** : Guanosine 5'-Diphosphate/Guanosine 5'-Triphosphate ; **GIRK** : G-protein-coupled Inwardly Rectifying potassium (K) ; **IκB** : Inhibitor of kappa B ; **IKK** : IκB Kinase ; **IRAK** : Interleukin 1 Receptor-Associated Kinase ; **JNK** : c-Jun N-terminal Kinase ; **MAGE-G1** : Melanoma-associated antigen-G1 ; **MBGI** : CNS-derived Myelin-Based Growth Inhibitor ; **MyD88** : Myeloid Differentiation factor 88 ; **NADE** : p75^{NTR}-associated cell death executor ; **NFκB** : Nuclear Factor kappa B ; **NRAGE** : Neurotrophin Receptor-interacting MAGE homolog ; **NRIF** : Neurotrophin Receptor Interacting Factor ; **NT** : Neurotrophin ; **PI3K** : Phosphatidylinositol 3-kinase ; **PIP2** : Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate ; **PKCι** : Protein Kinase C iota ; **Rac** : Ras-related C3 botulinum toxin ; **RIP2** : Receptor Interacting Protein 2 ; **RhoGDI** : Rho-GDP Dissociation Inhibitor ; **Sal12** : Sal-like 2 ; **Sc-1** : Schwann cell factor 1 ; **SMase** : Sphingomyelinase ; **TRAF** : TNF Receptor-Associated Factor ; **TRADD** : TNF Receptor-Associated Death Domain protein ; **U** : Ubiquitin.

1. Les voies pro-apoptotiques

Les deux domaines intracellulaires de p75^{NTR} (i.e. Chopper et domaine de mort) sont impliqués dans l'induction de l'apoptose grâce au recrutement de partenaires protéiques spécifiques (Coulson *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2001). Les mécanismes exacts conduisant à cette mort cellulaire sont encore incertains mais il semble que l'activation de la voie JNK est un point commun à beaucoup d'entre eux. En effet, la liaison du NGF sur p75^{NTR} permet l'activation de la GTPase Rac qui va induire à son tour la voie JNK (Harrington *et al.*, 2002). La phosphorylation de JNK peut alors conduire à l'activation des facteurs de transcription c-jun et p53, à l'activation des protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 (*Bcl-2 Homology*) comme Bad (*Bcl-2 Antagonist of cell Death*) et Bim (*Bcl-2-Interacting Mediator of cell death*) et à la translocation mitochondriale de Bax (*Bcl-2 Associated X protein*). S'en suit alors le relargage du cytochrome C dans le cytosol stimulant à son tour les caspases 9, 7, 6 et 3 (Becker *et al.*, 2004; Bhakar *et al.*, 2003; Nykjaer *et al.*, 2005). Par l'intermédiaire de Rac, p75^{NTR} peut également induire la génération de PIP2 (*Phosphatidylinositol(4,5)biPhosphate*) qui activent le canal potassique GIRK (*G-protein-coupled Inwardly Rectifying potassium (K)*) provoquant ainsi un efflux de potassium et la mort cellulaire (Coulson *et al.*, 2008). Bien que le lien direct entre p75^{NTR} et Rac ne soit pas connu, de nombreux adaptateurs impliqués dans l'activation de la voie JNK et l'apoptose induite par p75^{NTR} ont été décrits :

- **NRAGE** (*Neurotrophin Receptor-interacting MAGE homolog*), aussi connue sous le nom de MAGE-D1 ou Dlxin, interagit avec le domaine intracellulaire juxtamembranaire de p75^{NTR}. Cette interaction entraîne la phosphorylation de JNK et c-jun favorisant ainsi la libération du cytochrome c dans le cytoplasme et l'activation des caspases 9, 3 et 7 (Salehi *et al.*, 2000; Salehi *et al.*, 2002). L'apoptose induite par cette interaction est inhibée par l'expression de TrkA qui semble entrer compétition avec NRAGE pour se lier à p75^{NTR}. De plus, des souris knock-out (KO) pour NRAGE présentent une augmentation du nombre de neurones sympathiques dans le ganglion cervical supérieur, augmentation retrouvée également chez les souris KO pour p75^{NTR}. Les neurones dérivés de ces souris NRAGE^{-/-} sont résistantes à l'apoptose induite par le BDNF et montrent une diminution de l'activation de la voie JNK (Bertrand *et al.*, 2008). De façon intéressante, deux autres protéines de la même famille, la **Necdin** et **MAGE-G1**, interagissent aussi avec p75^{NTR} respectivement *via* le domaine juxtamembranaire et le domaine de mort du récepteur. Cette interaction va réduire leur association avec le facteur de transcription E2F1. Une fois libéré, ce facteur va inhiber l'arrêt du cycle cellulaire pour induire l'apoptose dans les cellules de neuroblastomes (Kuwako *et al.*, 2004).

- **NADE** (*p75^{NTR}-associated cell death executor*) s'associe à p75^{NTR} via le domaine de mort du récepteur. Cette interaction induit par le NGF (mais pas par le BDNF, la NT3 et la NT4/5) permet l'activation des caspases 2 et 3 suivie de l'apoptose des cellules PC12, HEK293 et des oligodendrocytes (Mukai *et al.*, 2000). Contrairement à ce qui est observé pour NRAGE, l'expression de TrkA n'a aucun effet sur la mort cellulaire induite par le complexe p75^{NTR}/NADE suggérant que cet adaptateur pourrait inhiber la signalisation de survie de TrkA. De plus, NADE interagit avec la protéine 14-3-3ε, interaction nécessaire à l'induction de l'apoptose par le NGF (Kimura *et al.*, 2001). Un autre membre de la famille, **Bex1** (*brain-expressed X-linked 1, ou NADE4*) se lie à p75^{NTR} pour inhiber l'activation de NFκB par le NGF et la différenciation neuronale des PC12. Pour cela, Bex1 entre en compétition avec un autre adaptateur de p75^{NTR}, RIP2, connu lui pour son implication dans l'effet de survie du récepteur (Vilar *et al.*, 2006). Enfin, **Bex2**, alias NADE5, a lui, un rôle anti-apoptotique et anti-prolifératif dans les cellules cancéreuses mammaires puisqu'il est nécessaire à l'activation de NFκB et à l'inhibition de l'apoptose par le NGF ainsi qu'à l'effet anti-prolifératif du Tamoxifen (Naderi *et al.*, 2007).

- **NRIF** (*Neurotrophin Receptor Interacting Factor*) est une protéine ubiquitaire capable d'interagir avec la partie intracellulaire de p75^{NTR} (Casademunt *et al.*, 1999). Elle intervient dans l'induction de l'apoptose par p75^{NTR} via l'activation de la voie JNK et de p53 (Linggi *et al.*, 2005). Son mécanisme d'action a été relativement bien décrit et fait intervenir un autre partenaire de p75^{NTR}, la protéine **TRAF6** (*TNF Receptor Associated Factor 6*). En effet, l'activation du récepteur par le NGF entraîne le recrutement de TRAF6 et NRIF qui interagissent ensemble. TRAF6, de part sa fonction ubiquitine ligase, va polyubiquitiner NRIF ce qui est nécessaire à sa translocation nucléaire. De son côté, NRIF favorise l'activation de la voie JNK par TRAF6 pour au final induire l'apoptose (Geetha *et al.*, 2005; Gentry *et al.*, 2004). Notons que le proNGF, le proBDNF et le BDNF peuvent également activer ce mécanisme et que le clivage de p75^{NTR} semble être un prérequis à la translocation nucléaire de NRIF (Kenchappa *et al.*, 2006). De plus, dans les neurones de l'hippocampe n'exprimant pas TRAF6, NRIF est également polyubiquitiné et est capable d'interagir avec TRAF2, suggérant une redondance de ces deux protéines TRAF (Volosin *et al.*, 2008). Dans la même étude, les auteurs montrent une interaction directe entre NRIF et NRAGE suite à un traitement par le NGF ou le proNGF. Ainsi, la plupart des adaptateurs recrutés par p75^{NTR} pourrait interagir ensemble pour former une plateforme protéique capable d'induire la mort cellulaire des neurones.

2. Les voies de survie

La principale caractéristique des voies de survie induites par le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ est l'activation du facteur de transcription NF κ B. Elle a pour la première fois été reportée dans les cellules de Schwann où le NGF *via* $p75^{\text{NTR}}$ induit la translocation des sous unités p65 et c-Rel dans le noyau où elles peuvent se lier à l'ADN (Carter *et al.*, 1996). Suite à cette découverte, l'activation de NF κ B par $p75^{\text{NTR}}$ a été démontrée dans de nombreux types cellulaires et est associée à la survie cellulaire (Descamps *et al.*, 2001b; Foehr *et al.*, 2000; Gentry *et al.*, 2000; Hamanoue *et al.*, 1999). $p75^{\text{NTR}}$ peut également induire la survie en activant directement la voie PI3K/Akt généralement associée aux récepteurs Trk. En effet, une étude a montré une phosphorylation accrue d'Akt et de la sous-unité p85 de la PI3K suite à l'expression de $p75^{\text{NTR}}$ (Roux *et al.*, 2001). Bien que le lien avec NF κ B ne soit pas fait dans ces travaux, une des cibles connues d'Akt est la protéine IKK1 (*I κ B Kinase 1*). Une fois activée, cette kinase phosphoryle I κ B (*Inhibitor of kappa B*) libérant NF κ B et permettant sa translocation nucléaire, mécanisme fréquemment retrouvé dans l'induction de la survie cellulaire par $p75^{\text{NTR}}$. En amont, divers adaptateurs recrutés par le récepteur sont également capables d'activer la voie de survie NF κ B :

- Les **TRAFs** (*TNF Receptor-Associated Factor*) sont des protéines qui s'associent à un grand nombre de récepteurs appartenant à la superfamille des TNFR et qui sont connues pour activer les voies JNK et NF κ B, faisant de ces protéines de bonnes candidates pour une interaction avec $p75^{\text{NTR}}$. Ye et ses collaborateurs ont donc testé cette hypothèse et ont montré que toutes les TRAF (1 à 6) étaient co-immunoprécipitées avec $p75^{\text{NTR}}$. Cependant, seuls TRAF2, TRAF4 et TRAF6 semble pouvoir moduler la voie NF κ B. **TRAF2** se lie sur le domaine de mort de $p75^{\text{NTR}}$ et active légèrement NF κ B ce qui est curieusement associé à une induction de la mort cellulaire. **TRAF4** et **TRAF6** semblent, eux, se lier à la partie juxtamembranaire de $p75^{\text{NTR}}$ et entrent en compétition pour l'activation de la voie NF κ B, TRAF4 l'inhibant et TRAF6 l'activant fortement (Khursigara *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 1999). Seul le mécanisme d'action de TRAF6 a été plus précisément décrit. En effet, pour activer la survie *via* la voie NF κ B, TRAF6 ubiquitinye $p75^{\text{NTR}}$ et recrute le complexe γ -secrétase, générant le fragment $p75^{\text{NTR}}$ -ICD capable d'activer NF κ B (Powell *et al.*, 2009). Par ailleurs, TRAF6 favorise son auto-ubiquitination en recrutant la protéine d'échafaudage **p62** (*PKC-interacting protein p62*) qui elle-même est associée à la **PKC ι** (*Protein Kinase C iota*). Le complexe $p75^{\text{NTR}}$ /TRAF6/p62/PKC ι interagit également avec les adaptateurs **MyD88** (*Myeloid Differentiation factor 88*) et **IRAK** (*IL1 Receptor-Associated Kinase*) (Mamidipudi *et al.*, 2002; Mamidipudi *et al.*, 2004). La formation de ce complexe multiprotéique, où chacun des membres semblent indispensables, aboutit à la phosphorylation d'IKK, qui à son tour

phosphoryle I κ B, libérant NF κ B et induisant la survie cellulaire (Wooten *et al.*, 2005). Notons que **MUL** (*Mulibrey Nanism*), une protéine contenant un domaine de liaison aux TRAFs, interagit également avec p75^{NTR} et inhibe l'activation de NF κ B induite par TRAF2 et TRAF6 (Zapata *et al.*, 2001).

- **RIP2** (*Receptor Interacting Protein 2*) est une sérine/thréonine kinase qui possède un domaine CARD (*Caspase Recruitment Domain*) lui permettant de se fixer au domaine de mort de p75^{NTR}. Dans les cellules de Schwann, cette interaction active la voie NF κ B et inhibe l'apoptose normalement induite par le NGF (Khursigara *et al.*, 2001). Dans ces cellules, TRAF6 active également NF κ B, néanmoins cette activation n'est pas inhibée par l'utilisation de dominants négatifs de RIP2 alors que dans les cellules HEK293, RIP2 interagit avec TRAF6 (Mccarthy *et al.*, 1998). Enfin, comme expliqué précédemment, Bex1 (ou NADE4) peut entrer en compétition avec RIP2 pour se fixer à p75^{NTR} et inhiber ainsi son effet de survie (Vilar *et al.*, 2006).
- **FAP1** (*Fas-Associated Protein 1*) est une protéine tyrosine phosphatase (PTPase) contenant 6 domaines PDZ connue pour interagir avec le récepteur Fas et en inhiber sa signalisation pro-apoptotique (Sato *et al.*, 1995). FAP-1 s'associe également avec p75^{NTR} grâce au motif SPV situé en C-terminale du récepteur. Cette association permet d'augmenter légèrement l'activation de NF κ B par p75^{NTR} dans les cellules HEK293. De plus, la transfection de ces cellules avec un mutant de p75^{NTR} délété du tripeptide SPV, incapable donc de lier FAP-1, les sensibilise à l'apoptose induite ici par le Tamoxifen. Ainsi, comme elle le fait avec le récepteur de Fas, la protéine FAP-1 joue un rôle anti-apoptotique en inhibant l'apoptose induite par p75^{NTR} (Irie *et al.*, 1999).
- **TRADD** (*TNF Receptor-Associated Death Domain protein*) est un adaptateur connu pour interagir avec les récepteurs de la famille du TNF *via* son domaine de mort. Cependant, de part la différence structurelle du domaine de mort de p75^{NTR} avec ceux des autres membres de la famille, il est généralement considéré que TRADD ne peut pas interagir avec p75^{NTR} (Wang *et al.*, 2001). Toutefois, notre laboratoire a montré que, dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, TRADD était recruté par p75^{NTR} suite à un traitement avec les neurotrophines. Cette interaction requiert le domaine de mort de TRADD et permet l'activation de la voie NF κ B ainsi que la survie cellulaire (El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003).

3. Les autres voies activées par p75^{NTR}

❖ La synthèse des céramides

Les céramides sont des éléments structuraux des membranes mais peuvent aussi agir en tant que second messager pour induire des effets trophiques ou apoptotiques. C'est à ce titre qu'ils interviennent dans la signalisation de p75^{NTR}. En effet, le récepteur une fois activé par le NGF est capable d'activer les sphingomyélinases (SMases) hydrolysant les sphingomyélines et conduisant à la production de céramides (Dobrowsky *et al.*, 1994; Dobrowsky *et al.*, 1995). Cette hydrolyse a lieu dans les caveolae riches en sphingolipides grâce à une interaction directe entre p75^{NTR} et les cavéolines (Bilderback *et al.*, 1997). La synthèse de ces céramides peut conduire à différents effets biologiques. Par exemple, dans les oligodendrocytes matures, cette synthèse conduit à l'activation de la voie JNK et à l'apoptose (Casaccia-Bonnel *et al.*, 1996). De la même manière, dans les cellules de neuroblastomes, l'activation des SMases par p75^{NTR} conduit à la mort cellulaire ; cette action peut être reversée par TrkA qui, par l'intermédiaire de la PI3K, active la PKC et inhibe ainsi les SMases (Plo *et al.*, 2004). A l'inverse, la synthèse des céramides peut également conduire à des effets trophiques comme la croissance neuronale (Brann *et al.*, 1999) ou la survie cellulaire (Defreitas *et al.*, 2001). Ces effets différentiels peuvent être expliqués par la concentration intracellulaire en céramide. Dans les cellules PC12, une concentration faible en céramides peut activer la PKC et augmenter la survie, alors qu'à de plus fortes concentrations (>2,5 µM), la PKC est inhibée et les cellules entrent en apoptose (Wang *et al.*, 1999). Une autre étude, dans les cellules de Schwann différenciées, a montré que l'axe NGF/p75^{NTR} pouvait induire à la fois la différenciation ou l'apoptose en fonction du niveau d'expression des céramides (Hirata *et al.*, 2001). « L'âge » des cellules est également un facteur à prendre en compte puisque Brann et ses collaborateurs ont montré que le NGF induisait la croissance axonale dans des neurones de l'hippocampe fraîchement adhérents alors qu'à des passages plus élevés, le NGF provoque l'apoptose *via* la voie JNK. Ces observations sont corrélées à une augmentation de l'expression p75^{NTR} et de la production de céramides dans le temps (Brann *et al.*, 2002). Ainsi, la diversité des rôles attribués à p75^{NTR} selon le contexte cellulaire et/ou le stade de développement peut en partie être expliquée par l'utilisation des céramides en tant que second messager et à l'influence décisive qu'ils semblent avoir sur le destin cellulaire (Blochl et Blochl, 2007).

❖ L'élongation des neurites

La neuritogénèse est un processus essentiel au développement du système nerveux. Cependant, une fois celui-ci terminé, la neuritogénèse est inhibée dans le système nerveux central rendant difficile la régénération des neurones en cas de blessures telles que des lésions de la moelle épinière ou des ischémies. De nombreux chercheurs se sont attelés à comprendre les mécanismes responsables de

cette inhibition dans laquelle $p75^{\text{NTR}}$ joue un rôle non négligeable. En effet, il a été montré que des cellules transfectées avec le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ voyaient leurs croissances axonales inhibées alors qu'un traitement avec les neurotrophines produisait l'effet inverse. Cette action inhibitrice de $p75^{\text{NTR}}$ passe par l'activation de la GTPase RhoA (Yamashita *et al.*, 1999) qui, une fois activée, induit la contraction du cytosquelette rendant impossible l'élongation des neurites. La découverte des corécepteurs NogoR et LINGO-1 (§II.D.3) a permis d'éclaircir le mécanisme d'action de $p75^{\text{NTR}}$. Les ligands de ces corécepteurs appartiennent à la famille des MBGI (*CNS-derived Myelin-Based Growth Inhibitor*) connus pour inhiber la croissance neuronale *via* RhoA. Lors de leurs fixations sur leurs récepteurs, ceux-ci interagissent avec $p75^{\text{NTR}}$ qui va alors recruter la protéine Rho-GDI (*Rho-GDP Dissociation Inhibitor*). Rho-GDI a normalement pour fonction de séquestrer RhoA-GDP dans le cytoplasme. L'interaction de Rho-GDI avec $p75^{\text{NTR}}$ va libérer RhoA qui va pouvoir être activé par les GEF (*Guanine Exchange Factor*) en transformant son GDP en GTP (Kaplan et Miller, 2003; Yamashita et Tohyama, 2003). Une autre étude est venue compléter ce mécanisme et fait intervenir la GTPase Ras un antagoniste de Rho. En effet, la stimulation de $p75^{\text{NTR}}$ par le NGF entraîne sa phosphorylation sur 2 résidus tyrosines situés dans le domaine de mort du récepteur ce qui aboutit à l'activation de Ras et à l'élongation des neurites (Blochl *et al.*, 2004). Ainsi, le processus de neuritogénèse est finement régulé par $p75^{\text{NTR}}$: sa stimulation par les MBGI permet l'activation de RhoA et probablement l'inactivation de Ras ce qui bloque le processus alors que sa stimulation par le NGF va favoriser une activation de Ras et une inactivation de RhoA pour promouvoir l'élongation des neurites (Blochl et Blochl, 2007).

❖ L'arrêt du cycle cellulaire

Le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ joue également un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire et à ce titre, il est considéré comme un suppresseur de tumeurs dans certains cancers (voir §E.1). Comme pour l'activation de la survie ou de l'apoptose, $p75^{\text{NTR}}$ passe par le recrutement d'adaptateurs protéiques pour moduler la progression des cellules dans le cycle cellulaire. La **Necdin** et **MAGE-G1**, deux partenaires de $p75^{\text{NTR}}$ déjà cités précédemment, inhibe l'arrêt du cycle en libérant le facteur de transcription E2F1 ce qui aboutit à l'apoptose des cellules de neuroblastomes (Kuwako *et al.*, 2004). Cependant, *via* deux autres adaptateurs, $p75^{\text{NTR}}$ peut également induire l'arrêt du cycle :

- **Sc-1** (*Schwann cell factor-1*) est une protéine à doigt de zinc contenant un domaine PR (*positive regulatory*) commun à plusieurs facteurs de transcription agissant comme répresseurs transcriptionnels. Des cotransfections suivies d'immunoprecipitations ont permis de montrer une interaction de Sc-1 avec le domaine juxtamembranaire de $p75^{\text{NTR}}$. Suite à la fixation du NGF sur $p75^{\text{NTR}}$, Sc-1 se voit transloquer dans le noyau où il induit l'arrêt du cycle cellulaire

puisque cette translocation est corrélée à une diminution de l'incorporation de BrdU (Chittka et Chao, 1999). Plus récemment, la même équipe a montré que Sc-1 forme un complexe protéique avec les histones désacétylases (HDAC1-3) pour réprimer la transcription des cyclines E et B en réponse au NGF (Chittka *et al.*, 2004).

- **Sall2** (*Sal like 2*) est un facteur de transcription récemment décrit pour interagir avec le domaine de mort de p75^{NTR}. Comme pour Sc-1, un traitement au NGF induit la translocation de Sall2 dans le noyau. S'en suit alors un arrêt du cycle cellulaire et la croissance des neurites dans les cellules PC12 et les neurones de l'hippocampe (Pincheira *et al.*, 2009). Ces effets passent par l'induction de la transcription de p21^{waf1/cip1}, un inhibiteur des protéines cdk (*Cyclin-dependent kinase*). La régulation transcriptionnelle de p21^{waf1/cip1} par Sall2 a par ailleurs été montrée indépendante de p53 (Li *et al.*, 2004). Si le lien entre p21^{waf1/cip1} et le cycle cellulaire est évident, celui avec la neuritogénèse l'est moins. Cependant, un article a montré que, lorsqu'il est cytoplasmique, p21^{waf1/cip1} favorise l'élongation des neurones en inhibant la Rho-kinase, une protéine en aval de RhoA, connue pour relayer son inhibition de la neuritogénèse (Tanaka *et al.*, 2002). Ainsi, l'interaction p75^{NTR}/Sall2 pourrait induire la croissance des neurites en inhibant la voie RhoA par l'intermédiaire de p21^{waf1/cip1}.

D. p75^{NTR} et ses corécepteurs

De l'apoptose à la survie en passant par l'inhibition de la croissance des neurites ou l'arrêt du cycle cellulaire, le récepteur p75^{NTR} est impliqué dans de nombreux effets biologiques. Outre le contexte cellulaire et le recrutement de divers adaptateurs cytoplasmiques, ces multiples fonctions s'expliquent par la capacité de p75^{NTR} à coopérer avec d'autres récepteurs pour former des complexes multimériques. Ainsi, la famille des Trk (*Tropomyosin-related kinase*), la sortiline et les récepteurs Nogo et LINGO-1 interagissent avec p75^{NTR}. La formation d'un complexe p75^{NTR}/Trk permet d'améliorer l'affinité et la sélectivité de chaque neurotrophine pour son récepteur Trk ($K_d=10^{-11}$ M) pour favoriser la survie cellulaire. En revanche, le complexe p75^{NTR}/sortiline va induire la mort cellulaire suite à la liaison des proneurotrophines. Finalement, p75^{NTR} peut former un complexe tripartite avec les récepteurs Nogo et LINGO-1 et fixer les ligands de la famille des MBGI (*CNS-derived Myelin-Based Growth Inhibitor*) : Nogo, MAG et OMgP pour inhiber la croissance des neurites (Figure 13).

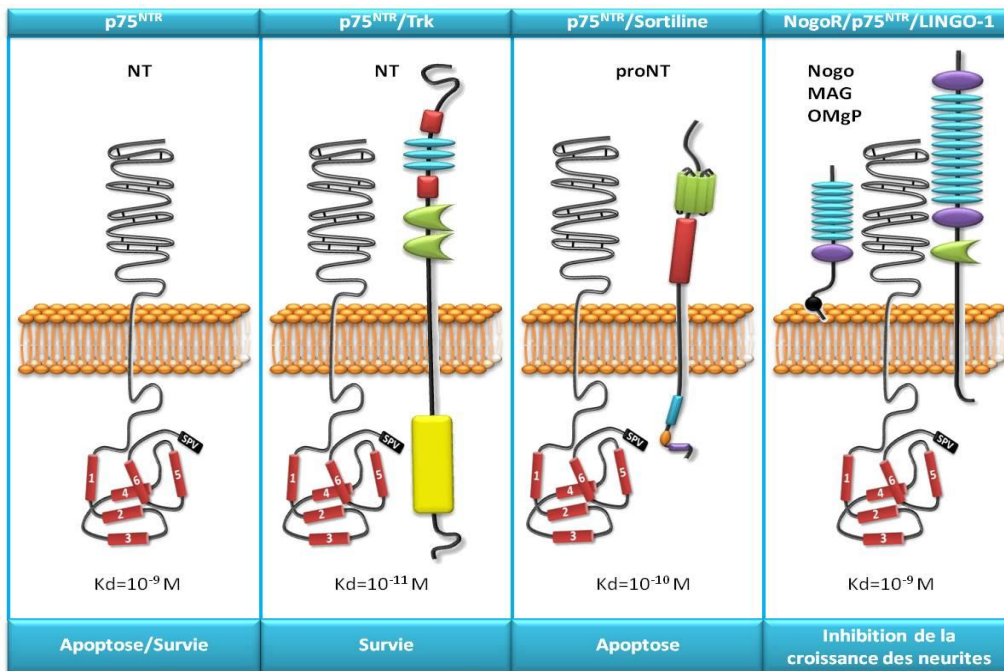


Figure 13 : Représentation schématique des corécepteurs de $p75^{NTR}$.

Complexé avec les récepteurs de la famille des Trk, $p75^{NTR}$ permet d'augmenter la spécificité de chaque neurotrophine pour son récepteur Trk correspondant. L'association avec la sortiline permet la fixation des proneurotrophines, en particulier le proNGF et le proBDNF. Enfin, $p75^{NTR}$ interagit avec le récepteur Nogo et LINGO-1 pour répondre aux ligands Nogo, MAG et OMgP. Ces interactions permettent également de mettre en commun les adaptateurs cytoplasmiques nécessaires à la signalisation. **NT** : neurotrophines ; **proNT** : proneurotrophines ; **MAG** : Myelin-Associated Glycoprotein ; **OMgP** : Oligodendrocyte Myelin glycoProtein. Adapté de (Bandtlow et Dechant, 2004; Barker, 2004; Lu et al., 2005)

1. Les récepteurs Tropomyosin-related kinases (Trk)

a) La découverte

Dans les années 80, la 1^{ère} protéine Trk (*Tropomyosin-related kinase*) doit son nom à la découverte d'un oncogène impliqué dans le cancer du colon, celui-ci contient les 7 premiers des 8 exons de la tropomyosine fusionnés aux domaines transmembranaire et intracellulaire d'une kinase inconnue à l'époque (Martin-Zanca et al., 1986). Peu après, une 2^{ème} kinase hautement similaire à TrkA fut purifiée et nommée TrkB (Klein et al., 1989). Enfin, TrkC fut identifié en 1991, en même temps que fut attribué à chaque récepteur son ligand (Figure 14) (Klein et al., 1991a; Klein et al., 1991b; Lamballe et al., 1991).

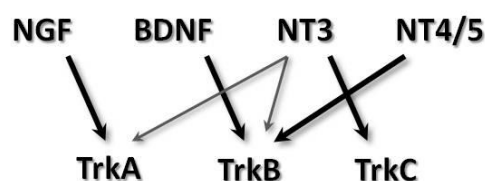


Figure 14 : Liaison des neurotrophines aux récepteurs Trk.

TrkA est le récepteur du NGF ; TrkB du BDNF et de la NT4/5 ; TrkC de la NT3 (flèches noires). Notons que la NT3 peut se fixer sur TrkA et TrkB (flèches grises) mais avec une affinité plus faible.

b) Des gènes aux protéines

Le clonage des gènes humains de TrkA (*NTRK1*) (Martin-Zanca *et al.*, 1989), TrkB (*NTRK2*) (Nakagawara *et al.*, 1995) et TrkC (*NTRK3*) (Mcgregor *et al.*, 1994) a démontré une forte homologie de séquence. Les domaines intracellulaires kinasiques de TrkA et TrkB sont notamment conservés à 88% et leurs domaines extracellulaires de liaison au ligand à 57%. Les caractéristiques de ces gènes sont reportées dans la table 4.

Nom du gène	Localisation du gène	Taille de l'ARNm (pb)	N° NCBI	Taille en acides aminés	N° Uniprot
<i>NTRK1</i>	1q21-q22	2663	NM_002529	796	P04629
<i>NTRK2</i>	9q22.1	5608	NM_006180	822	Q16620
<i>NTRK3</i>	15q25	2818	NM_002530	839	Q16288

Table 4 : Caractéristiques des récepteurs Trk humains.

Récepteurs Trk humains et leurs localisations chromosomiques. Taille du transcrit majoritaire avec son numéro d'accèsion NCBI. Taille en acides aminés de la protéine avec son numéro d'accèsion Uniprot.

Les récepteurs Trk ont tous une structure commune, ce sont des protéines transmembranaires de type I, glycosylées, d'environ 800 acides aminés. Leurs domaines extracellulaires contiennent environ 400 acides aminés et sont constitués de trois régions riches en leucine flanquées de deux régions riches en cystéines. La partie juxtamembranaire est, quant à elle, constituée de deux domaines de type immunoglobuline C2 (Ig-C2) intervenant dans la liaison et la spécificité des neurotrophines comme l'ont montré des expériences de délétions et de constructions de chimériques (Perez *et al.*, 1995; Urfer *et al.*, 1995). En plus de leur rôle dans la liaison du ligand, ces domaines Ig-C2 stabilisent les formes monomériques des récepteurs Trk, empêchant ainsi leurs dimérisations spontanées et leurs activations en l'absence des neurotrophines (Arevalo *et al.*, 2000). La partie extracellulaire comporte également de nombreuses glycosylations qui permettent d'adresser les récepteurs Trk à la membrane et de prévenir leur activation en absence de ligands (Watson *et al.*, 1999).

Le domaine intracellulaire, très conservé entre les différents Trk, présente de nombreuses tyrosines phosphorylables. Dans TrkA (ainsi que dans les autres Trk à des positions légèrement différentes), on retrouve 3 tyrosines Y670/674/675 au sein du domaine tyrosine kinase responsables de la trans-autophosphorylation du récepteur. Ce domaine est borné en N-terminale, par la tyrosine phosphorylable Y490, site de liaison aux protéines Shc (*Src homology-2 containing protein*) et FRS-2 (*FGF Receptor Substrate 2*), et en C-terminale par la tyrosine Y785 qui recrute la PLC γ (*PhosphoLipase C γ*) (Figure 15).

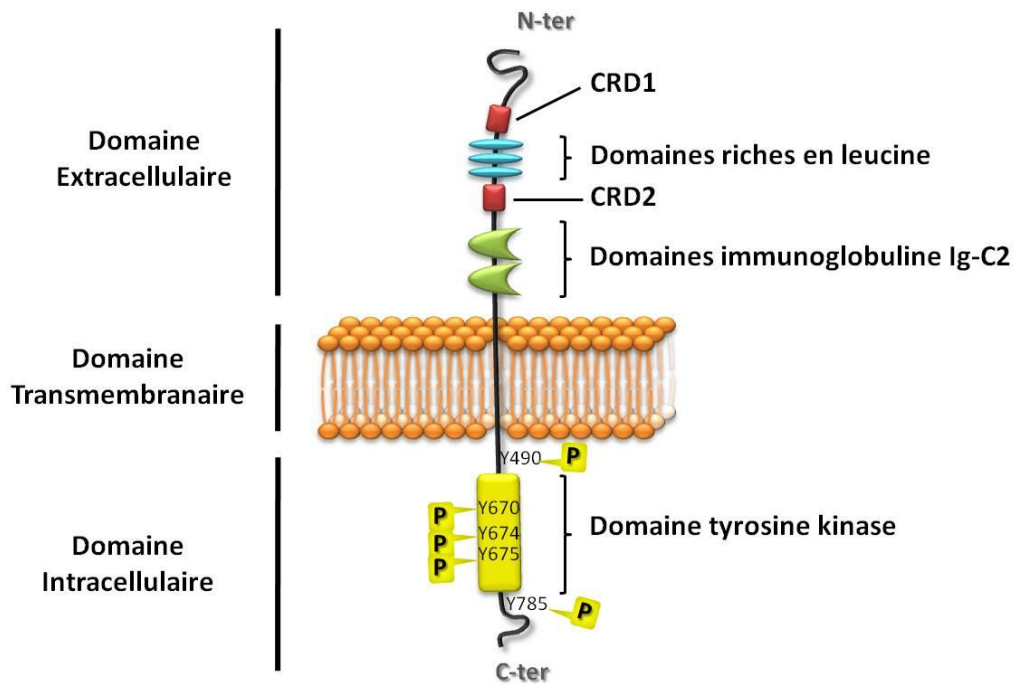


Figure 15 : Représentation schématique des récepteurs Trk.

Chaque Trk se compose d'un domaine extracellulaire constitué de régions riches en leucine encadrés par 2 régions riches en cystéine (CRD), suivi de 2 domaines de type immunoglobuline Ig-C2. Le domaine intracellulaire est, lui, composé d'un large domaine tyrosine kinase responsable de la trans-autophosphorylation du récepteur et donc de son activation. D'autres phosphorylations en dehors de ce domaine sont possibles et sont impliquées dans le recrutement de partenaires protéiques tels que Shc, FRS-2 ou la PLC γ . Les tyrosines mentionnées ici correspondent à des résidus du récepteur TrkA.

c) Les isoformes des Trk

❖ Isoformes de TrkA

Il existe 3 isoformes de TrkA nommées TrkA-I, -II et -III. Les isoformes I et II ne diffèrent que de 18 pb suite à l'épissage alternatif de l'exon 9. En effet, TrkA-II, qui contient l'exon 9, présente un insert de 6 acides aminés dans son domaine extracellulaire mais sa présence n'affecte ni l'affinité du récepteur pour le NGF, ni la transduction du signal (Barker *et al.*, 1993). En revanche, elle participerait à la sélectivité de TrkA pour la NT3 puisque la NT3 ne se lie pas sur TrkA-I (Clary et Reichardt, 1994). De plus, ces 2 isoformes ont une expression différentielle : TrkA-I est préférentiellement exprimée dans les tissus non-neuronaux alors que TrkA-II est retrouvée dans les tissus neuronaux et en faible quantité dans le rein et le poumon (Barker *et al.*, 1993). La dernière isoforme, TrkA-III, a été identifiée plus récemment dans les neuroblastomes et le thymus et résulte de l'épissage alternatif des exons 6, 7 et 9 (Tacconelli *et al.*, 2004; Tacconelli *et al.*, 2007). Cette isoforme dépourvue du 1^{er} domaine Ig-C2 et d'une partie normalement N-glycosylée, est capable d'induire une signalisation indépendamment de la fixation du NGF dans les cellules de neuroblastomes pour promouvoir leurs potentiels tumorigènes (Figure 16).

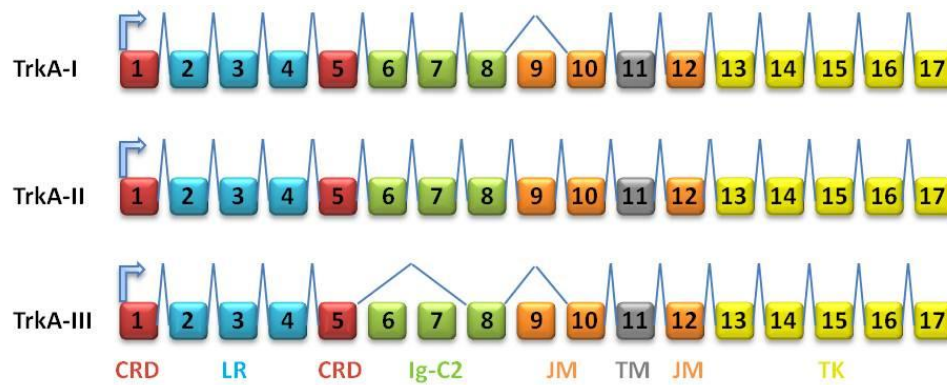


Figure 16 : Les isoformes de TrkA.

Les carrés représentent les 17 exons du gène de TrkA. TrkA-II est l'isoforme la plus longue, TrkA-I est épissée de l'exon 9 et TrkA-III est dépourvue des exons 6, 7 et 9. Les différentes couleurs représentent schématiquement les parties de la protéine codées par les exons. Rouge : les CRD (Cystein Rich Domain) ; Bleu : LR (Leucine Rich motif) ; Vert : domaines immunoglobuline-like ; Orange : partie juxtamembranaire (JM) ; Gris : partie transmembranaire (TM) ; Jaune : domaine tyrosine kinase (TK).

❖ Isoformes de TrkB

La littérature décrit plus de 100 isoformes possibles d'ARN de TrkB. Seules 10 protéines sont codées par ces ARNs mais la plupart sont très faiblement exprimées suggérant un rôle très spécialisé à une sous-population de cellules ou lors de certaines étapes du développement. Trois isoformes sont majoritaires et sont décrites dans la Figure 17 (Stoilov *et al.*, 2002). TrkB-FL (*Full Length*) est épissé des exons 16 et 19 mais conserve son domaine tyrosine kinase intact gardant ainsi son activité catalytique et sa capacité à induire différents effets biologiques tels que la survie, l'angiogénèse ou la différenciation. Avec son codon STOP situé dans l'exon 16, TrkB-T1 est l'isoforme la plus courte constitué seulement de 11 acides aminés dans sa partie intracellulaire. Son rôle exact n'est pas défini mais TrkB-T1 pourrait agir comme un dominant négatif de TrkB-FL en séquestrant le BDNF, en formant des hétérodimères inactifs ou en régulant son expression à la surface de la cellule (Brodeur *et al.*, 2009; Haapasalo *et al.*, 2002). Cependant, certaines études montrent que cette isoforme pourrait avoir sa propre signalisation malgré la courte taille de son fragment intracellulaire. Ainsi, TrkB-T1 est responsable du relargage du stock de calcium intracellulaire dans les astrocytes (Rose *et al.*, 2003). Dans les mêmes cellules, il peut également interagir directement avec la protéine RhoGDI1 (*Rho GDP Dissociation Inhibitor 1*) pour réguler la morphologie cellulaire (Ohira *et al.*, 2005). Dans le cancer du pancréas, TrkB-T1 induit la formation de métastases hépatiques en séquestrant RhoGDI1 ce qui aboutit à l'activation de RhoA (Li *et al.*, 2009b). Enfin, notre laboratoire a montré que cette isoforme jouait un rôle dans la survie induite par le BDNF et la NT4/5 dans les cellules cancéreuses mammaires (Vanhecke *et al.*, 2010, en annexe).

La dernière isoforme TrkB-Shc et épissée de l'exon 16 et se termine dans l'exon 19 juste après le site d'interaction avec la protéine Shc. Contrairement aux autres isoformes, celle-ci est exprimé uniquement dans le cerveau. Elle est capable d'interagir avec TrkB-FL mais celui-ci ne peut la phosphorylée suggérant un rôle de dominant négatif (Stoilov *et al.*, 2002).

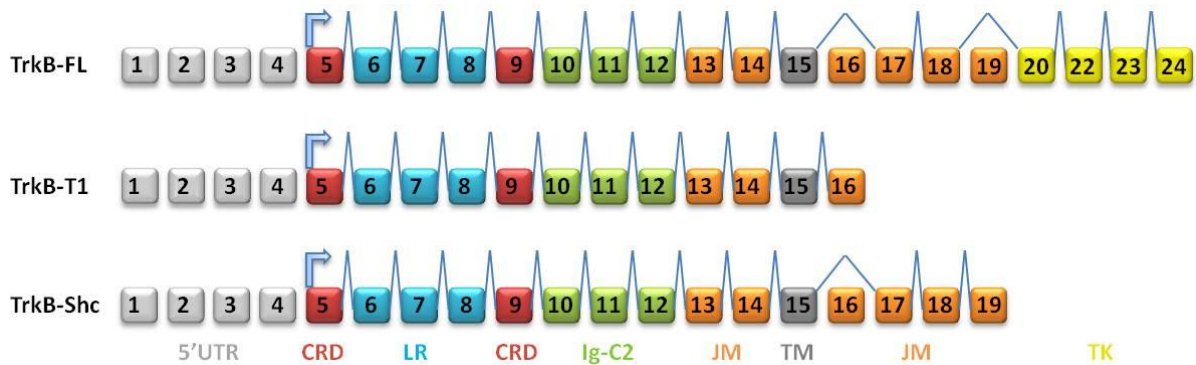


Figure 17 : Les isoformes majoritaires de TrkB.

Les carrés représentent les 24 exons du gène de TrkB. TrkB-FL (full length) est l'isoforme la plus longue, elle est épissée des exons 16 et 19 et se termine dans l'exon 24. TrkB-T1 est l'isoforme la plus courte avec son codon STOP situé dans l'exon 16. Enfin, TrkB-Shc est épissée de l'exon 16 et se termine dans l'exon 19 juste après le site d'interaction avec la protéine Shc. Les différentes couleurs représentent schématiquement les parties de la protéine codées par les exons. Gris clair : région 5'UTR (UnTranslated Region) ; Rouge : les CRD (Cystein Rich Domain) ; Bleu : LR (Leucine Rich motif) ; Vert : domaines immunoglobuline-like ; Orange : partie juxtamembranaire (JM) ; Gris foncé : partie transmembranaire (TM) ; Jaune : domaine tyrosine kinase (TK).

Notons que très récemment, d'autres isoformes de TrkB ont été identifiées. En effet, la découverte d'un nouveau site START de transcription a permis de mettre en évidence des isoformes tronquées dans leur partie extracellulaire. Leur transcription commencerait dans l'exon 9, ainsi, chaque isoforme décrite précédemment a son équivalent dépourvu de la partie N-terminale. Elles sont nommées TrkB-N-FL, TrkB-N-T1, TrkB-N-Shc et sont exprimées dans le système nerveux central, en particulier dans le cervelet. Ces nouvelles isoformes seraient principalement cytoplasmique puisqu'aucun peptide signal n'a pu être identifié (Luberg *et al.*, 2010).

❖ Isoformes de TrkC

Le transcrit de TrkC humain subit divers épissages alternatifs aboutissant à 4 isoformes (Figure 18). En comparaison à l'isoforme majoritaire (TrkC-C), TrkC-A présente une insertion de 14 acides aminés située dans le domaine tyrosine kinase inhibant le recrutement des protéines Shc et PLCγ (Guiton *et al.*, 1995; McGregor *et al.*, 1994). TrkC-B est lui dépourvu d'activité catalytique, son codon STOP étant situé juste en amont du domaine tyrosine kinase (Shelton *et al.*, 1995). Des souris surexprimant cette

isoforme tronquée présentent une perte de neurones sensoriels et des défauts cardiaques similaires à ceux observés chez des souris invalidées pour la NT3, suggérant un effet dominant négatif de TrkC-B (Palko *et al.*, 1999). Cet effet inhibiteur est d'ailleurs retrouvé dans les neuroblastomes où le récepteur TrkC « normal » est exprimé dans les cellules cancéreuses encore différenciées alors que TrkC-B est corrélé avec des cancers plus agressifs (Laneve *et al.*, 2007). Cependant, une autre étude a montré qu'en réponse à la NT3, cette isoforme tronquée était capable d'induire un réarrangement de l'actine *via* la translocation membranaire de la protéine Arf6 (*ADP-ribosylation factor 6*) et l'activation de la GTPase Rac1 (Esteban *et al.*, 2006). Enfin, l'isoforme TrkC-D présente le même insert de 14 acides aminés que TrkC-A mais perd 9 acides aminés dans le domaine extracellulaire juxtamembranaire.

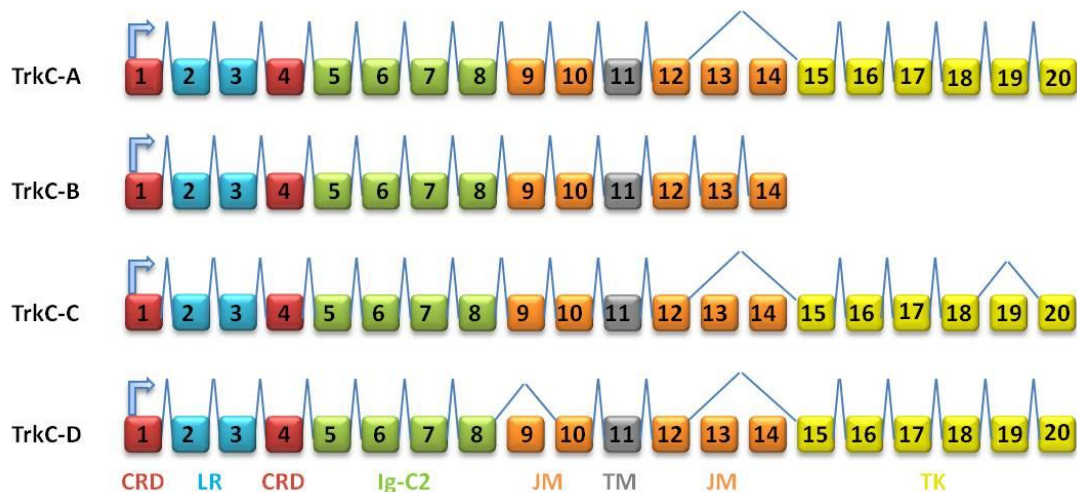


Figure 18 : Les isoformes de TrkC.

Les carrés représentent les 20 exons du gène de TrkC. L'isoforme C est la majoritaire, les isoformes A et D présentent un insert de 14 acides aminés codés par l'exon 19 dans leurs domaines kinases empêchant le recrutement de certains partenaires protéiques. TrkC-D est également épissé de l'exon 9 le rendant moins affiné pour la NT3. Enfin, TrkC-B est la forme la plus courte, tronquée de tout le domaine tyrosine kinase. Les différentes couleurs représentent schématiquement les parties de la protéine codées par les exons. Rouge : les CRD (Cystein Rich Domain) ; Bleu : LR (Leucine Rich motif) ; Vert : domaines immunoglobuline-like ; Orange : partie juxtamembranaire (JM) ; Gris : partie transmembranaire (TM) ; Jaune : domaine tyrosine kinase (TK).

d) $p75^{NTR}$ et les récepteurs Trk, de vieux amis

De part leurs ligands communs, il est difficile de dissocier $p75^{NTR}$ des récepteurs Trk. En effet, même si les Trk ont longtemps été référencés comme les récepteurs de haute affinité des neurotrophines, on sait aujourd'hui que leur affinité pour les neurotrophines est similaire à celle de $p75^{NTR}$ ($K_d=10^{-9}$ M) lorsqu'ils sont exprimés séparément. En revanche, lorsqu'ils sont co-exprimés, l'affinité pour les neurotrophines est beaucoup plus forte avec une constante de dissociation de l'ordre de 10^{-11} M.

(Hempstead *et al.*, 1991). La co-expression de p75^{NTR} avec TrkA par exemple, permet d'augmenter le taux d'association du NGF de 25 fois (Mahadeo *et al.*, 1994). Plusieurs études ont montré qu'inhiber la liaison du NGF sur p75^{NTR} permettait d'inhiber l'activation de TrkA (Barker et Shooter, 1994; Lachance *et al.*, 1997). De plus, une forme mutante du NGF se fixant uniquement sur TrkA et non p75^{NTR} est moins efficace que le NGF non muté pour activer TrkA dans des cellules exprimant les 2 récepteurs (Ryden *et al.*, 1997). C'est pourquoi, certains considèrent aujourd'hui que la perte neuronale observée chez les souris KO pour p75^{NTR} n'est peut-être que le reflet d'une activation réduite des récepteurs Trk.

Outre la plus forte activation de TrkA en présence de p75^{NTR}, celui-ci permet également d'améliorer la spécificité. En effet, un anticorps neutralisant anti-p75^{NTR} augmente l'activation de TrkA en réponse à la NT3, suggérant que p75^{NTR} diminue l'affinité de TrkA pour cette neurotrophine (Clary et Reichardt, 1994). De la même manière, TrkB qui peut fixer le BDNF, la NT4/5 et la NT-3 en absence de p75^{NTR}, voit son affinité pour le BDNF augmentée en présence de p75^{NTR} (Bibel *et al.*, 1999). L'ensemble de ces données suggèrent une étroite collaboration entre les récepteurs Trk et p75^{NTR} ce qui a amené l'idée d'une éventuelle interaction physique. Certains ont montré par co-immunoprécipitation une interaction de p75^{NTR} avec TrkA, TrkB et TrkC (Bibel *et al.*, 1999; Gargano *et al.*, 1997; Lad *et al.*, 2003). De plus, les domaines intracellulaires et transmembranaires de chaque récepteur semblent nécessaires à ces interactions et, en entraînant un changement de conformation, permettraient la formation d'un site de haute affinité (Esposito *et al.*, 2001). D'autres proposent un modèle où p75^{NTR} ne ferait que capter et transmettre le dimère de NGF à TrkA (Barker, 2007; Wehrman *et al.*, 2007). En effet, même si leurs études structurales théoriques montrent la possibilité d'un complexe tripartite p75^{NTR}/NGF/TrkA (1:2:1), la preuve d'une interaction directe entre les 2 récepteurs n'a pas pu être mise en évidence. Aussi, ils avancent davantage l'existence d'une communication et d'une convergence des voies de signalisation.

Plusieurs protéines ont, en effet, été décrites comme pouvant interagir à la fois avec p75^{NTR} et avec TrkA. Parmi elles, la **cavéoline** est une protéine clé dans la formation des caveolae, permettant la concentration des protéines de signalisation au niveau de ces microdomaines invaginés servant de plateforme de signalisation. Ainsi, p75^{NTR} est localisé au niveau des caveolae et interagit directement avec les cavéolines par l'intermédiaire de son domaine intracellulaire. Cette interaction permet l'hydrolyse des sphingolipides et la production de céramides (Bilderback *et al.*, 1997). D'autre part, TrkA peut inhiber cette hydrolyse en activant la PI3K dont la sous-unité p85 interagirait directement avec les sphingomyélinases pour les inhiber (Bilderback *et al.*, 2001). Les cavéolines, capables d'interagir également avec TrkA, permettraient de réguler ces 2 signalisations contraires puisque lorsqu'elles sont surexprimées, les cavéolines inhibent l'activation de TrkA, favorisant ainsi la synthèse des céramides par p75^{NTR} (Bilderback *et al.*, 1999).

ARMS (*Ankyrin repeat-Rich Membrane Spanning*) est une protéine contenant 4 domaines transmembranaires récemment identifiée comme interagissant avec les récepteurs Trk et p75^{NTR} (Chang *et al.*, 2004; Kong *et al.*, 2001). Un traitement par le NGF ou le BDNF induit la phosphorylation de ARMS par les Trk, ce qui permet le recrutement de Crk et l'activation prolongée de la voie des MAPK. L'activation de cette voie aboutit à la différenciation neuronale des cellules PC12 (Arevalo *et al.*, 2006) ou à la translocation nucléaire de NFκB pour induire la survie des neurones corticaux (Sniderhan *et al.*, 2008). Bien que la protéine ARMS soit capable d'interagir avec p75^{NTR}, le rôle de celui-ci n'a pas été étudié dans l'initiation de cette signalisation.

Le récepteur p75^{NTR} peut également fixer la protéine **Shc**, un adaptateur bien connu des Trk. Cette association va stimuler la phosphorylation de Shc favorisant ainsi la signalisation des récepteurs Trk (Epa *et al.*, 2004). La protéine **FAIM** (*Fas Apoptosis Inhibitor Molecule*) interagissant à la fois avec TrkA et p75^{NTR}, intervient, elle, dans la croissance des neurites *via* la voie NFκB et l'activation de Erk (Sole *et al.*, 2004). Enfin, la formation du complexe **p62-TRAF6**, permettrait la connexion des deux récepteurs pour aboutir à l'activation de la voie NFκB, TRAF6 assurant la liaison à p75^{NTR} et p62 à TrkA (Wooten *et al.*, 2001).

2. La sortiline

Comme nous l'avons vu, p75^{NTR} est le récepteur commun à toutes les neurotrophines mais aussi aux proneurotrophines qui ont un rôle pro-apoptotique dans les neurones. Cependant, toutes les cellules exprimant p75^{NTR} ne répondent pas aux proneurotrophines suggérant l'existence d'une protéine additionnelle requise pour déclencher la mort cellulaire. La sortiline a alors été identifiée comme un corécepteur de p75^{NTR} nécessaire à l'induction de l'apoptose par le proNGF (Nykjaer *et al.*, 2004) et par le proBDNF (Teng *et al.*, 2005).

a) Du gène à la protéine

Le gène de la sortiline (*SORT1*) est situé sur le chromosome 1, segment p13.1-p21.3. Il contient 20 exons qui s'étendent sur 50 kb. Des Northern blots réalisés chez l'homme, indiquent que son transcrit est présent dans de nombreux tissus tel que le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, les testicules, la thyroïde, le sein ou encore la moelle épinière (Mazella, 2001; Petersen *et al.*, 1997).

Nom du gène	Localisation du gène	Taille de l'ARNm (pb)	N° NCBI	Taille en acides aminés	N° Uniprot
<i>SORT1</i>	1p13.1-p21.3	7018	NM_002959	831	Q99523

Table 5 : Caractéristiques de la sortiline.

Gène de la sortiline humaine et sa localisation chromosomique. Taille du transcrit avec son numéro d'accèsion NCBI. Taille en acides aminés de la protéine avec son numéro d'accèsion Uniprot.

La sortiline fait partie de la famille des récepteurs à domaine VPS10 (*Vacuolar Protein Sorting 10*) qui doit son nom à une protéine de levure impliquée dans le trafic intracellulaire entre le réseau trans-golgien et les vacuoles. Tout comme son homologue chez la levure, la sortiline joue un rôle important dans l'internalisation de ces nombreux ligands et leur transport entre le golgi, les endosomes et les lysosomes (Hermeijer, 2009). Une fois libérée de son peptide signal (33 aa), la sortiline est une protéine N-glycosylée, de type I et de 798 acides aminés présentant un seul domaine transmembranaire (23 aa), une courte partie cytosolique (53 aa) et une longue portion N-terminale (722 aa) (Figure 19) (Munck Petersen *et al.*, 1999).

Selon que la sortiline est membranaire ou vésiculaire, la partie N-terminale est soit extracellulaire, soit lumenale. Elle est composée d'un propeptide court et du domaine VPS10 qui consiste en un module d'environ 700 acides aminés. Le propeptide est clivé dans les compartiments tardifs du golgi par la furine, permettant au récepteur une fois clivé de fixer ces ligands. Le domaine VPS10 est quant à lui caractérisé par un module 10CC contenant 10 cystéines conservées et un domaine β propeller composé de 10 hélices β . Une 1^{ère} étude à partir de protéines chimériques a montré que le module 10CC est primordial à l'interaction de la sortiline avec ces ligands (Westergaard *et al.*, 2004). Cependant, une modélisation informatique du récepteur propose que ces interactions passent plutôt par le domaine β propeller (Paiardini et Caputo, 2008). Cette dernière hypothèse a été confortée par la résolution de la structure du domaine N-terminale de la sortiline complexée à la neurotensine, un de ces ligands (Quistgaard *et al.*, 2009). Les auteurs ont ainsi montré que la neurotensine se fixait à la sortiline en rentrant à l'intérieur du domaine β propeller. Notons toute fois que, même si tous les ligands entrent en compétition pour lier la sortiline, leurs sites d'interaction au sein de ce domaine sont différents. Aussi, leur capacité à entrer en compétition les uns avec les autres serait due à la place restreinte à l'intérieure du β propeller plutôt qu'à un même site de fixation (Quistgaard *et al.*, 2009).

Avec seulement 53 acides aminés, la partie cytosolique de la sortiline est très courte. Elle présente des motifs similaires à ceux retrouvés dans la queue cytoplasmique du récepteur M6P (*Mannose 6-Phosphate*), lui aussi impliqué dans le trafic intracellulaire et les processus d'internalisation. Il s'agit de 3 motifs caractéristiques : la séquence ⁷⁹²YSVL⁷⁹⁵ impliquée dans l'endocytose du récepteur et la séquence ⁸²²HDDSDDLL⁸³⁰ composée d'un cluster acide potentiellement phosphorylable par la CKII (*Casein Kinase II*) et d'une dileucine, impliquée à la fois dans l'internalisation du récepteur et dans le trafic intracellulaire de protéines cytoplasmiques (Nielsen *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 1997).

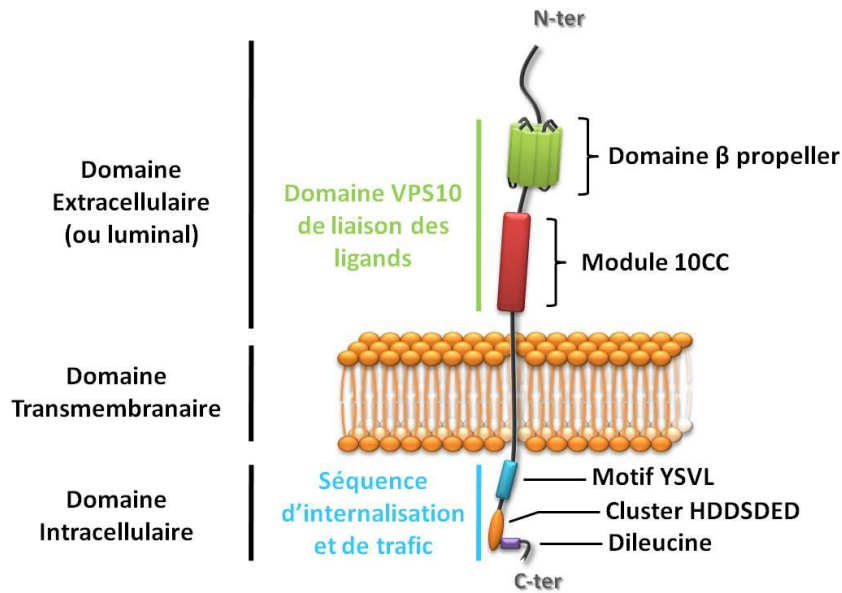


Figure 19 : Représentation schématique de la sortiline.

La sortiline est une glycoprotéine de type I dont le domaine VPS10 constitue la quasi-totalité de sa partie N-terminale. Il est indispensable à la liaison des ligands notamment grâce à son domaine β propeller constitué de 10 hélices β et au module 10CC composé de 10 cystéines conservées. La partie cytoplasmique très courte comprend 3 motifs nécessaires à l'internalisation de la sortiline et au trafic de protéines intracellulaires.

b) $p75^{NTR}$ et la sortiline, complices de crime

En l'absence des récepteurs Trk, de nombreuses études décrivent une action pro-apoptotique des neurotrophines *via* leur récepteur $p75^{NTR}$. Cependant, des controverses persistent car de fortes concentrations (non physiologiques) en neurotrophines sont généralement requises pour induire une apoptose relativement modeste. Ces considérations ont amenés l'hypothèse que d'autres ligands de $p75^{NTR}$ pourraient induire cette apoptose. La découverte d'une action propre aux proneurotrophines a apporté quelques éléments de réponses. En effet, le proNGF stimule la mort cellulaire des neurones sympathiques et des oligodendrocytes *via* $p75^{NTR}$ sans activer TrkA (Lee *et al.*, 2001). L'idée première fut que l'activation de $p75^{NTR}$ (et non de TrkA) par le proNGF soit due à une différence d'affinité pour les 2 récepteurs. En réalité, le proNGF lie $p75^{NTR}$ et TrkA avec la même faible affinité ($K_d \approx 15-20 \text{ nM}$) comparé au NGF ($K_d \approx 1-2 \text{ nM}$), suggérant que seule la liaison du proNGF sur $p75^{NTR}$ ne pouvait suffire. L'identification de la sortiline comme récepteur des proneurotrophines avec un K_d d'environ 5 nM a permis de résoudre cette énigme (Nykjaer *et al.*, 2004). En effet, le proNGF se fixe simultanément sur la sortiline par son prodomaine et sur $p75^{NTR}$ *via* la partie mature pour former un complexe ternaire dont chacun des membres est indispensable à l'induction de l'apoptose. De même, le proBDNF induit la mort cellulaire des neurones sympathiques en formant ce même complexe ternaire puisque les neurones déficients en $p75^{NTR}$ sont résistants à l'apoptose induite par

le proBDNF et que l'utilisation d'antagonistes de la sortiline bloque également cette apoptose (Teng *et al.*, 2005). Les mêmes résultats ont été observés pour la proNT3, l'apoptose induite par cette proneurotrophine est associée à une activation de la voie JNK et peut être contrecarrée par un co-traitement avec le NGF (Yano *et al.*, 2009). Concernant la proNT4/5, aucune donnée n'est à ce jour disponible quant à une éventuelle induction de l'apoptose ; notons toutefois que son prodomaine, qui présente une faible homologie de séquence avec les autres prodomaines de la famille, ne semble pas interagir avec la sortiline (Chen *et al.*, 2005). Hormis l'activation de la voie JNK reportée pour la proNT3, la signalisation induite par ces complexes ternaires n'est pas connue. Plusieurs hypothèses sont avancées : la partie cytoplasmique de la sortiline pourrait recruter des adaptateurs spécifiques pour induire sa propre signalisation ou faciliter celle de p75^{NTR}, la translocation de NRIF a d'ailleurs été montrée après un traitement au proNGF (Nykjaer *et al.*, 2005) ; parce que la sortiline semble subir les mêmes clivages que p75^{NTR} par TACE/ADAM17 et le complexe γ -sécrétase, on peut supposer que le domaine intracellulaire de la sortiline peut être transloquer dans le noyau et induire une signalisation (Hermey *et al.*, 2006; Nyborg *et al.*, 2006) ; enfin, la sortiline induit l'internalisation du proNGF, on peut donc imaginer une signalisation de ce complexe ternaire à partir des endosomes comme cela a déjà été décrit pour p75^{NTR} qui interagit avec NRAGE et la Necdin au niveau des endosomes précoces (Bronfman *et al.*, 2003).

3. Les récepteurs Nogo et LINGO-1

a) Des gènes aux protéines

Les gènes des récepteurs Nogo et LINGO-1 se situent sur les chromosomes 22 et 15 respectivement (Table 6). Ces récepteurs sont principalement exprimés dans le cerveau et sont impliqués dans l'inhibition de la régénération neuronale.

Nom du gène	Localisation du gène	Taille de l'ARNm (pb)	N° NCBI	Taille en acides aminés	N° Uniprot
RTN4R	22q11.21	1924	NM_023004	473	Q9BZR6
LINGO-1	15q24.3	2932	NM_032808	620	Q96FE5

Table 6 : Caractéristiques des récepteurs Nogo et LINGO-1.

Gènes des récepteurs Nogo et LINGO-1 et leurs localisations chromosomiques. Taille des transcrits avec leurs numéros d'accèsion NCBI. Taille en acides aminés des protéines avec leurs numéros d'accèsion Uniprot.

Le récepteur Nogo (NgR) est une protéine de 473 acides aminés, ancrée à la membrane par GPI (*Glycosyl Phosphatidyl Inositol*). Il contient 8 répétitions riches en leucines (LRR) flanquées en N- et C-terminal par 2 régions riches en cystéines (nommées LRRNT et LRRCT, respectivement). Cette partie d'environ 310 résidus est impliquée dans la liaison des ligands. Entre le LRRCT et le site d'ancrage GPI se situe une région d'environ 135 résidus riche en serine, thréonine, proline et glycine permettant son interaction avec des corécepteurs (He *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2005) (Figure 20).

LINGO-1 (*LRR and Ig domain-containing, Nogo receptor-interacting protein*) est une protéine transmembranaire de type I contenant 12 répétitions riches en leucine (LRR) qui, tout comme NgR, sont coiffées de part et d'autre de régions riches en cystéines. La partie juxtamembranaire extracellulaire comprend un domaine de type immunoglobuline Ig1 et la partie cytoplasmique très courte contient un site de phosphorylation typique du récepteur à l'EGF (Tyr591) (Mi *et al.*, 2004; Mosyak *et al.*, 2006) (Figure 20).

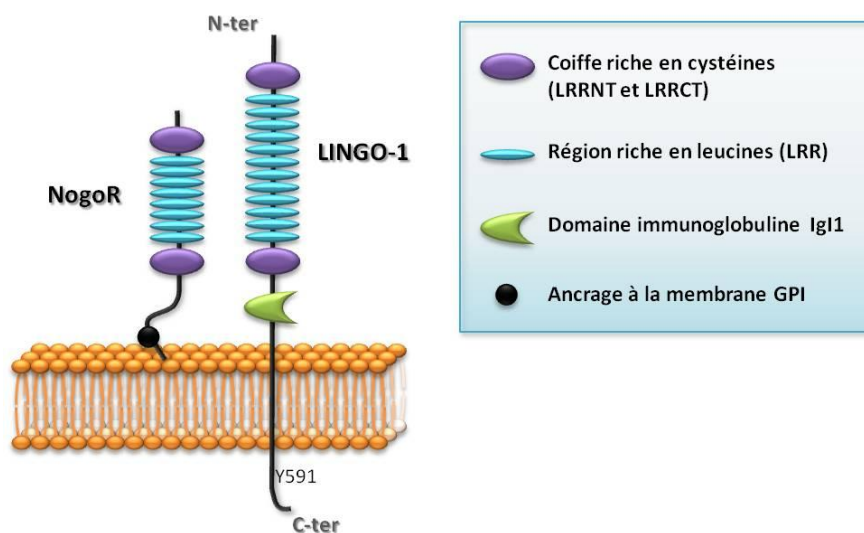


Figure 20 : Représentation schématique des récepteurs Nogo et LINGO-1.

Les 2 récepteurs contiennent plusieurs régions riches en leucine (8 LRR pour NgR et 12 LRR pour LINGO-1) coiffées de chaque côté de régions riches en cystéine nommées LRRNT et LRRCT. Le récepteur Nogo est ancré à la membrane par un glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) alors que LINGO-1 possède un domaine immunoglobuline Ig1-like suivi d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique contenant une tyrosine phosphorylable.

b) $p75^{NTR} + \text{Nogo} + \text{LINGO} = \text{zéro élongation} !$

Comme nous l'avons vu précédemment (§ II.C.3), le récepteur $p75^{NTR}$ est impliqué dans l'inhibition de l'élongation des neurites en recrutant la protéine Rho-GDI, autorisant ainsi la libération de RhoA et son activation (Yamashita et Tohyama, 2003). Cette capacité de $p75^{NTR}$ a attiré l'attention dès lors qu'il est devenu évident que des protéines associées à la myéline telles que Nogo-66, MAG (*Myelin-*

Associated Glycoprotein) ou OMgP (*Oligodendrocyte Myelin glycoProtein*) inhibaient la croissance axonale, elles aussi par un mécanisme Rho-dépendant (Niederost *et al.*, 2002). Or, ces trois protéines lient le même récepteur NogoR pourtant dépourvu de domaine cytoplasmique. Ces observations ont donc amenées l'idée d'une éventuelle interaction entre p75^{NTR} et NogoR, idée confirmée en 2002 par 2 équipes (Wang *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002). En effet, il a été montré une interaction directe entre NogoR et p75^{NTR} qui conduit à l'activation de RhoA. L'inhibition de cette interaction par l'utilisation de dominant négatif de NogoR ou du mutant de p75^{NTR} délété du domaine cytoplasmique restaure l'élongation des neurites. De la même manière, des neurones issus de souris KO pour p75^{NTR} restent insensibles aux ligands Nogo-66, MAG et OMgP. Cependant, la transfection dans des cellules non neuronales de ces 2 récepteurs ne permet pas d'activer RhoA suggérant la nécessité d'un autre composant spécifique au système nerveux central pour former un complexe fonctionnel. L'équipe de Mi en 2004, a identifié LINGO-1 comme étant ce chaînon manquant. En effet, LINGO-1 interagit à la fois avec NogoR et p75^{NTR} et la transfection de ces 3 récepteurs dans des cellules non neuronales est requise pour activer RhoA. De façon intéressante, des cellules neuronales transfectées avec un LINGO-1 délété de sa partie cytoplasmique ne répondent plus aux ligands Nogo-66, MAG et OMgP suggérant un rôle de dominant négatif de ce LINGO-1 tronqué en formant un complexe ternaire non fonctionnel (Mi *et al.*, 2004). Aussi, la transduction du signal de ce complexe passerait par la partie cytoplasmique de p75^{NTR} mais également par celle de LINGO-1 aussi courte soit elle.

E. Le récepteur p75^{NTR} dans les cancers

Comme nous venons de le voir, le récepteur p75^{NTR} est impliqué dans le développement et le maintien du système nerveux central. La plupart des études visant à éclaircir ses effets biologiques et sa signalisation ont d'ailleurs été réalisées dans des cellules neuronales. Cependant, un nombre croissant de travaux montre que p75^{NTR} est exprimé dans des cellules non neuronales et peut avoir un effet anti- ou pro-tumoral selon le type de cancer auquel il est associé.

1. Effet anti-tumoral

❖ Cancer gastrique

Dans les cancers gastriques, p75^{NTR} est identifié comme un potentiel suppresseur de tumeur. En effet, son expression diminue dans les cellules cancéreuses comparées aux cellules normales et est quasi inexistante dans les cancers métastatiques. De plus, sa surexpression inhibe la migration et l'invasion *in vitro* tout comme la formation de métastases *in vivo*. Ces effets passeraient par une diminution de la voie NFκB et des enzymes uPA (*urokinase-type Plasminogen Activator*) et MMP-9

(*Matrix MetalloProteinase-9*) ainsi que par une augmentation de l'inhibiteur de MMP, TIMP-1 (*Tissue Inhibitor of Matrix MetalloProteinase-1*) (Jin *et al.*, 2007a). Le récepteur p75^{NTR} inhibe également la prolifération des cellules cancéreuses gastriques en induisant un arrêt du cycle cellulaire *via* l'augmentation de p27^{Kip1} et la diminution des cyclines A, D1 et E, de la Cdk2, de phospho-Rb et de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Jin *et al.*, 2007b).

❖ *Cancer hépatique*

Similairement à ce qui est observé pour les cancers gastriques, p75^{NTR} est moins exprimé dans les hépatocarcinomes que dans les cellules normales et de la même manière, il inhibe la croissance *in vitro* et *in vivo* en régulant les mêmes protéines impliquées dans le cycle cellulaire (Yuanlong *et al.*, 2008). Ce récepteur est également retrouvé exprimé dans les cellules étoilées du foie qui une fois activées favorisent la progression tumorale (Amann *et al.*, 2009; Tokusashi *et al.*, 2005). Or, le NGF par l'intermédiaire de p75^{NTR} induit l'apoptose de ces cellules étoilées (Trim *et al.*, 2000). Ainsi, le récepteur p75^{NTR} est un suppresseur de tumeur dans ces cancers en agissant directement sur les cellules tumorales mais aussi de manière indirecte sur les cellules environnantes.

❖ *Cancer de la vessie*

Encore une fois, p75^{NTR} inhibe la prolifération des cellules cancéreuses de la vessie en induisant une accumulation des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Cette accumulation est associée à une augmentation de p16^{INK4a} et une diminution des cyclines D1 et E, cdk2, phospho-Rb, E2F1 et PCNA (Khwaja et Djakiew, 2003). Notons qu'un traitement au NGF permet de contrecarrer les effets de p75^{NTR} et restaurer ainsi la prolifération. Dans ce cancer, p75^{NTR} induit également l'apoptose en régulant les protéines impliquées dans la voie mitochondriale de l'apoptose telles que Bad, Bax, Bik, Bcl-2, Bcl-XL, IAP1, les caspases 9 et 7 et le relargage du cytochrome C (Tabassum *et al.*, 2003).

❖ *Cancer de la prostate*

Dans ces tumeurs, les deux récepteurs du NGF sont exprimés et jouent un rôle opposé : p75^{NTR} est considéré comme un suppresseur de tumeur alors que TrkA a un effet pro-tumoral. Aussi, l'action du NGF va dépendre de la balance TrkA/p75^{NTR}.

Au cours de la progression tumorale, l'expression de TrkA augmente alors que celle de p75^{NTR} diminue (Papatsoris *et al.*, 2007). De cette balance en faveur de TrkA résulte une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses prostatiques (Festuccia *et al.*, 2007; Sortino *et al.*, 2000). D'ailleurs, l'injection d'anticorps neutralisant anti-NGF ou d'un inhibiteur pan-Trk permet d'inhiber la croissance et l'apparition de métastases dans un modèle de xénogreffe en souris nude (Miknyoczki *et al.*, 2002; Weeraratna *et al.*, 2001).

La perte d'expression de p75^{NTR} est, elle, associée à un effet anti-apoptotique mais également à une stimulation de la prolifération et de l'invasion. En effet, la réexpression de p75^{NTR} dans des cellules cancéreuses prostatiques induit une accumulation des cellules en phase G0/G1 en régulant les protéines du cycle cellulaire (Cycline A/E, cdk2/6, pRb, E2F1, PCNA, p16^{INK4a}) et provoque la mort cellulaire en modulant les protéines de la voie mitochondriale (Bax, Bak, Bad, SMAC, Caspase9/7, Bcl-XL, XIAP, PARP) (Khwaja *et al.*, 2006). Notons que ces effets sont inhibés par un traitement au NGF ce qui démontre un effet propre au récepteur p75^{NTR}, NGF-indépendant. La réexpression de p75^{NTR} diminue également l'expression de certains de ces adaptateurs comme RIP ou TRAF2, et l'activation de voies de signalisation telles que la voie NFκB et de manière plus surprenante la voie JNK. Ces diminutions aboutissent à l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques (Allen *et al.*, 2005). Enfin, p75^{NTR} agit également sur la migration cellulaire en diminuant l'expression et l'activité des enzymes uPA, MMP-2 et MMP-9 et en augmentant l'expression de TIMP-1 (Nalbandian et Djakiew, 2006). L'ensemble de ces données fait de p75^{NTR} un bon candidat pour la thérapie génique. Des premiers essais d'injection intra-tumorale de liposomes contenant l'ADNc de p75^{NTR} ont d'ailleurs donné des résultats prometteurs dans un modèle de xénogreffes chez la souris (Allen *et al.*, 2004).

❖ *Cancer du pancréas*

Dans le cancer du pancréas, l'expression des ARNs de TrkA et p75^{NTR} est inversement corrélée. En effet, les patients ayant une forte expression de TrkA présentent plus d'invasions périneurales et survivent moins longtemps faisant de TrkA un marqueur d'agressivité. En revanche, les patients exprimant plutôt p75^{NTR} ont un pronostic favorable avec une survie globale plus longue (Dang *et al.*, 2006). Des travaux comparatifs de différentes lignées de cellules cancéreuses pancréatiques en fonction de l'expression de chaque récepteur ont abouti aux mêmes conclusions avec TrkA favorisant la croissance tumorale et p75^{NTR} l'inhibant. Il est intéressant de constater qu'à expression égale, le NGF induit la croissance tumorale *via* la voie des MAPK suggérant une activation préférentielle de TrkA (Zhu *et al.*, 2001).

2. Effet pro-tumoral

❖ *Mélanome*

Le mélanome est un cancer de la peau agressif qui prend son origine dans l'épiderme et les mélanocytes pour généralement métastaser dans le cerveau. Toutes les neurotrophines ainsi que leurs récepteurs sont exprimés dans les cellules de mélanome alors que leurs expressions sont faibles dans les mélanocytes. L'utilisation de K252a (inhibiteur de protéines kinase) ou de dominants négatifs des récepteurs Trk inhibe la prolifération et la migration alors que p75^{NTR} est impliqué

uniquement dans la migration des cellules de mélanome (Truzzi *et al.*, 2008). Pour induire cette migration, le NGF provoque l'interaction de p75^{NTR} avec la fascine, une protéine impliquée dans le réarrangement du cytosquelette d'actine (Shonukan *et al.*, 2003) et stimule la production et l'activité des héparanases, enzymes dégradant la matrice extracellulaire (Marchetti *et al.*, 1996; Walch *et al.*, 1999). Le proNGF *via* p75^{NTR} stimule lui aussi la migration et l'invasion des cellules de mélanomes avec une efficacité 10 fois supérieure au NGF, probablement grâce à la coopération entre p75^{NTR} et la sortiline qui s'avère être également exprimée dans les mélanomes. De plus, l'expression de p75^{NTR} est associée à l'invasion périneurale dans les mélanomes malins (Chan et Tahan, 2010) et à une survie accrue des métastases du cerveau (Marchetti *et al.*, 2004).

❖ *Cancer des cellules squameuses*

Les cellules squameuses sont des cellules plates et fines qui tapissent entre autres l'œsophage, l'intérieur de la cavité buccale et la gorge ainsi que la peau. Dans ces cancers dits « à cellules squameuses », le récepteur p75^{NTR} a un effet pro-tumoral. Il est par exemple associé à un mauvais pronostic dans les cancers de la cavité orale (Soland *et al.*, 2008) et corrélé à l'invasion périneurale dans les cancers cutanés (Lewis Kelso *et al.*, 2006). Il est retrouvé aussi dans environ 50% des cancers de l'œsophage (n=187) et son invalidation par siRNA inhibe la croissance et induit la mort cellulaire (Okumura *et al.*, 2006). De plus, les cellules cancéreuses de l'œsophage exprimant p75^{NTR} sont capables de s'auto-renouveler, de former des sphères dans des conditions de cultures non adhérentes et sont résistantes aux drogues, trois caractéristiques des cellules souches cancéreuses (Huang *et al.*, 2009).

❖ *Cancer du sein*

Comme nous l'avons vu précédemment (§ I.B.6), le NGF a une influence sur le cancer du sein. En effet, les cellules mammaires normales ou cancéreuses expriment les récepteurs TrkA et p75^{NTR} mais seules les cellules cancéreuses répondent au NGF (Descamps *et al.*, 1998; Descamps *et al.*, 2001a). L'injection d'anticorps bloquant le NGF ou de siRNA anti-NGF dans des souris xénotreffées avec des cellules tumorales de sein permet d'ailleurs d'inhiber la croissance et d'augmenter l'apoptose au sein des tumeurs (Adriaenssens *et al.*, 2008). *In vivo*, l'expression de la forme active de TrkA (phospho-TrkA) est retrouvée dans la plupart des effusions pleurales et récurrences locorégionales (environ 90%) et dans 41% des tumeurs primaires suggérant un rôle dans la progression tumorale (Davidson *et al.*, 2004). Outre les cellules cancéreuses, le récepteur p75^{NTR} est, lui, retrouvé dans les cellules myoépithéliales et à ce titre fait office de facteur de bon pronostic (Popnikolov *et al.*, 2005; Reis-Filho *et al.*, 2006). *In vitro*, notre laboratoire a montré une sécrétion de NGF par les cellules cancéreuses mammaires qui, par une boucle autocrine, stimulent leur propre prolifération, invasion et survie

(Dolle *et al.*, 2003; Dolle *et al.*, 2005b). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, d'anticorps neutralisants et de modèles de surexpression a permis de discriminer le rôle de chaque récepteur. Ainsi, TrkA, *via* l'activation des voies MAPK, PI3K/Akt et p38MAPK stimule la prolifération et la migration/invasion des cellules cancéreuses mammaires *in vitro*, et *in vivo*, il favorise l'angiogénèse et la formation de métastases (Lagadec *et al.*, 2009). Le récepteur p75^{NTR} quant à lui recrute l'adaptateur TRADD pour stimuler la voie NFκB et la survie cellulaire (Descamps *et al.*, 2001b; El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003). Un inhibiteur spécifique de p75^{NTR} (Pep5) permet d'ailleurs de provoquer l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires (Naderi et Hughes-Davies, 2009). D'autres travaux ont montré que le NGF coopère avec ErbB2 pour activer la croissance du cancer du sein et que le Tamoxifen, drogue anti-oestrogénique, inhibe l'effet mitogène de l'axe NGF/TrkA (Chiarenza *et al.*, 2001; Tagliabue *et al.*, 2000). Enfin, plus récemment, notre laboratoire a montré que le BDNF et la neurotrophine 4/5 stimulait également la survie *via* p75^{NTR} et l'isoforme tronquée de TrkB, TrkB-T1 (Vanhecke *et al.*, 2010, en annexe).

OBJECTIFS DE LA THESE

CONTEXTE DE LA THESE

Comme nous venons de le voir, les neurotrophines exercent de nombreux effets sur les cellules non neuronales et particulièrement dans les cancers où, *via* leurs récepteurs, elles favorisent ou empêchent la progression tumorale. Notre laboratoire a largement contribué à décrypter le mode d'action de ces facteurs de croissance dans le cancer du sein (Figure 21). Aussi, le NGF, *via* son récepteur tyrosine kinase TrkA, favorise la croissance mais aussi la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires (Lagadec *et al.*, 2009) alors qu'en se fixant sur le récepteur p75^{NTR}, il induit la survie cellulaire (Descamps *et al.*, 2001b; El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003). Le NGF peut également agir de façon paracrine sur les cellules endothéliales en favorisant l'angiogénèse (Romon *et al.*, 2010). Plus récemment, il a été montré que son précurseur, le proNGF, induisait également la migration et l'invasion mais grâce à sa fixation sur la sortiline (Demont *et al.*, 2010, en préparation). Enfin, le BDNF et la NT4/5 permettent aux cellules cancéreuses mammaires de mieux résister à l'apoptose encore une fois par l'intermédiaire de p75^{NTR} et aussi par la forme tronquée de TrkB, TrkB-T1 (Vanhecke *et al.*, 2010, en annexe).

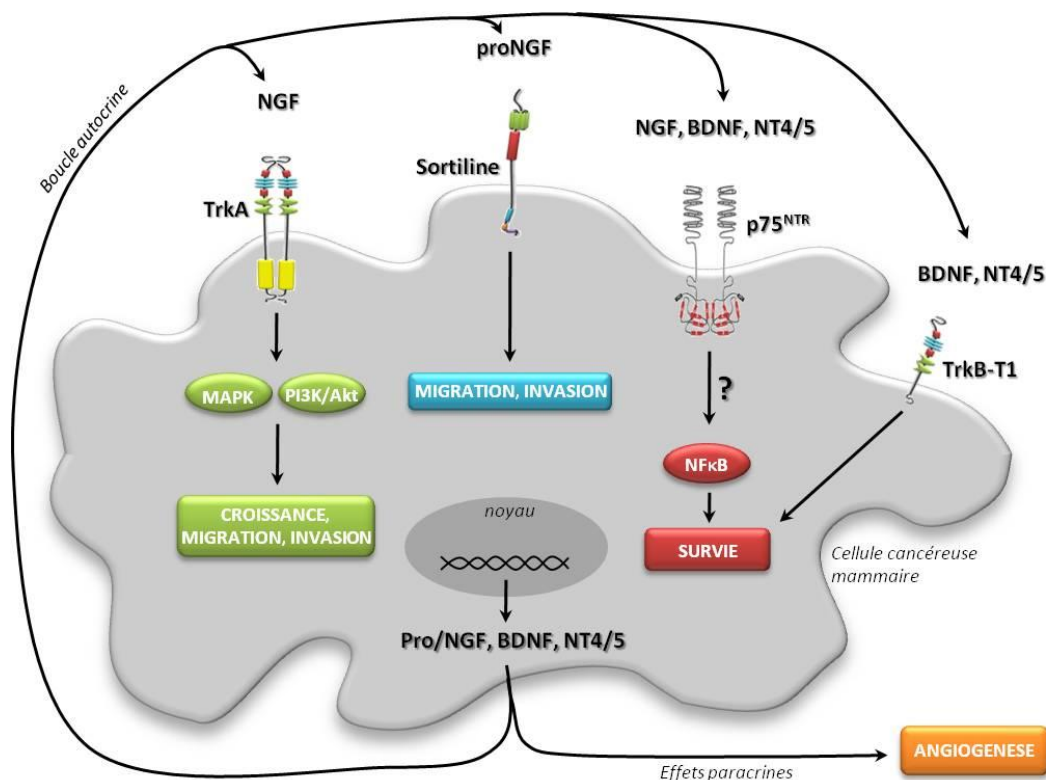


Figure 21 : Action des neurotrophines dans le cancer du sein.

Les cellules cancéreuses mammaires expriment les récepteurs TrkA, TrkB-T1, p75^{NTR} et la sortiline. Elles produisent et sécrètent le NGF, le BDNF et la NT4/5 qui, *via* une boucle autocrine, se fixent sur leurs récepteurs respectifs pour induire la croissance, la migration, l'invasion ou la survie de ces cellules. Par une action paracrine, le NGF agit également sur les cellules endothéliales pour favoriser l'angiogénèse.

Il est donc clair que les neurotrophines ont une action pro-tumorale sur le cancer du sein. D'ailleurs l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-NGF, anti-BDNF ou anti-NT4/5 inhibe la croissance tumorale dans des modèles de souris xénogreffées (Adriaenssens *et al.*, 2008)(Vanhecke *et al.*, 2010, en annexe). Il est intéressant de noter que, dans ces tumeurs traitées, une augmentation de l'apoptose a été observée. Or, *in vitro*, ces neurotrophines induisent leurs effets anti-apoptotiques grâce à un seul et même récepteur : p75^{NTR}.

OBJECTIFS DE LA THESE

Aujourd'hui, les phénomènes de résistance aux drogues anticancéreuses sont une nouvelle barrière au succès des thérapies actuelles et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques reste donc primordiale. Dans le cancer du sein, les neurotrophines contribuent à cette résistance *via* p75^{NTR}, celui-ci fait donc figure de bon candidat pour espérer voir émerger une nouvelle stratégie thérapeutique. Cependant, cela nécessite une connaissance approfondie des mécanismes associés à ce récepteur. C'est pourquoi j'ai consacré mon travail de thèse à déterminer le rôle précis de p75^{NTR} dans le cancer du sein. Pour ce faire, j'ai étudié, grâce à un modèle de surexpression inductible, ces effets biologiques *in vitro* et *in vivo* ainsi que leurs signalisations associées. Ces résultats font l'objet d'une publication dans le journal international *Cellular Signaling* intitulée :

« Overexpression of p75^{NTR} increases survival of breast cancer cells through p21^{waf1} »

J'ai également étudié la protéolyse de p75^{NTR} dans les cellules cancéreuses mammaires et mis en évidence son implication dans l'effet anti-apoptotique de ce récepteur. Ces résultats sont présentés dans la partie « **Travaux supplémentaires** ».

Enfin, j'ai collaboré aux travaux du Dr. Elsa Vanhecke sur le rôle du BDNF et de la NT4/5 dans les cellules cancéreuses mammaires en montrant l'implication de la forme tronquée de TrkB, TrkB-T1, dans la survie induite par ces neurotrophines. Ces résultats présentés en annexe sont actuellement soumis dans le journal *Clinical Cancer Research* et intitulés :

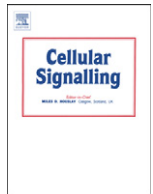
« Brain-derived neurotrophic factor and Neurotrophin-4/5 stimulate breast cancer cell survival through an autocrine loop mediated by p75^{NTR} and TrkB-T1 »

RESULTATS

Article 1

**OVEREXPRESSION OF p75^{NTR} INCREASES SURVIVAL OF BREAST CANCER CELLS
THROUGH p21^{WAF1}**

L'objectif de ces travaux était d'approfondir les mécanismes d'action mis en jeu par le récepteur p75^{NTR} dans le cancer du sein. Nous nous sommes, pour cela, appuyés sur la lignée de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Ces cellules, utilisées dans de nombreuses études, sont de sous-type « basal-like » et présentent donc un intérêt certain pour les études de résistance aux drogues puisque les tumeurs de ce type ne répondent pas aux traitements actuels. Cependant, les MDA-MB-231 n'expriment que faiblement p75^{NTR} (environ 50 fois moins) en comparaison aux biopsies tumorales (Descamps *et al.*, 2001a). Pour cette étude, nous avons donc établi une lignée de cellules inductibles permettant une surexpression dosée de ce récepteur. Ce modèle de choix a permis de préciser le rôle de p75^{NTR} dans le cancer du sein et les résultats obtenus sont présentés dans l'article qui suit publié dans « *Cellular Signaling* ».



Overexpression of p75^{NTR} increases survival of breast cancer cells through p21^{waf1}

Stéphanie Verbeke^{a,b,d,1}, Samuel Meignan^{a,b,d,1}, Chann Lagadec^{a,b,d}, Emmanuelle Germain^{a,b,d}, Hubert Hondermarck^{a,b,d}, Eric Adriaenssens^{b,c,d}, Xuefen Le Bourhis^{a,b,d,*}

^a INSERM U908, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

^b USTL, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

^c CNRS UMR 8161, Institut Pasteur de Lille, F-59800 Lille, France

^d Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2010

Received in revised form 8 July 2010

Accepted 19 July 2010

Available online 24 July 2010

Keywords:

p75^{NTR}
p21^{waf1}
Survival
Cell cycle
Breast cancer

ABSTRACT

The p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) plays a critical role in various neuronal and non-neuronal cell types by regulating cell survival, differentiation and proliferation. To evaluate the influence of p75^{NTR} in breast cancer development, we have established and characterized breast cancer cells which stably overexpress p75^{NTR}. We showed that p75^{NTR} overexpression *per se* promoted cell survival to apoptogens with a concomitant slowdown of cell growth. The pro-survival effect is associated with an increased expression of the inhibitor of apoptosis protein-1 (c-IAP1), a decrease of TRAIL-induced cleavage of PARP, procaspase 9 and procaspase 3, and a decrease of cytochrome C release from the mitochondria. The anti-proliferative effect is due to a cell accumulation in G0/G1, associated with a decrease of Rb phosphorylation and an increase of p21^{waf1}. Interestingly, inhibition of p21^{waf1} with siRNA not only restores proliferation but also abolishes the pro-survival effect of p75^{NTR}, indicating the key role of p21^{waf1} in the biological functions of p75^{NTR}. Finally, using a SCID mice xenograft model, we showed that p75^{NTR} overexpression favors tumor growth and strongly increases tumor resistance to anti-tumoral treatment.

Together, our findings suggest that p75^{NTR} overexpression in breast tumor cells could favor tumor survival and contribute to tumor resistance to drugs. This provides a rationale to consider p75^{NTR} as a potential target for the future design of innovative therapeutic strategies.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) was the first identified receptor for nerve growth factor (NGF); and it also binds all the other neurotrophins including brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3), and NT-4/5 as well as precursors [1–3]. Significantly, p75^{NTR} is a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily [4], which exerts diverse functions such as the stimulation of cell survival and differentiation during neuronal development [5]. p75^{NTR} is expressed not only in nervous tissues, but also in non-neuronal normal and cancerous tissues. Particularly, p75^{NTR} has been reported to be overexpressed in some cancers such as thyroid carcinoma [6] and melanoma [7], while it is downregulated in cancers of other tissues including bladder [8], prostate [9], stomach [10] and

liver [11]. p75^{NTR} may have opposite functions according to tumor types. Hence, it has been described to exert a tumor-promoting function in melanoma by favoring survival and metastasis of cancer cells [12,13], while it has been proposed as a potential tumor suppressor in other carcinomas such as prostate [9], bladder [14], stomach [10] and liver [11] cancers. In these studies, the tumor suppressor function of p75^{NTR} is associated with retardation of cell cycle progression by inducing accumulation of cancer cells in the G1 phase with a concomitant reduction of cells in the S phase of the cell cycle. We have previously shown that both p75^{NTR} and NGF are expressed in the majority of human breast tumors [15,16], but we have not observed any direct association between expression of p75^{NTR}/NGF and disease free or overall survival in breast cancer patients. However, the ratio between p75^{NTR} and NGF was reported to be of prognostic significance in breast cancers [17]. In addition, p75^{NTR} was shown to be preferentially expressed in basal-like breast carcinomas with good prognosis [18]. On the other hand, we and others have shown that p75^{NTR} is involved in NGF-stimulated cell survival in established breast cancer cell lines [19–21]. Nevertheless, the commonly used breast cancer cell lines express relatively low levels of p75^{NTR} compared to tumor biopsies [16]. To elucidate further the role of p75^{NTR} in breast cancer development and its mechanism of action, we established breast cancer cells overexpressing p75^{NTR}. We

Abbreviations: MTS, tetrazolium salt of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; FBS, fetal bovine serum; TRAIL, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand; FITC, Fluorescein Iso Thio Cyanate; PARP, Poly (ADP-Ribose) Polymerase; PA, Ponasterone A; c-IAP1, cellular-Inhibitor of Apoptosis 1; XIAP, X-linked Inhibitor of Apoptosis; COX IV, Cytochrome C Oxidase IV.

* Corresponding author. INSERM U908, Bâtiment SN3, University of Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France. Tel.: +33 3 20 43 45 81; fax: +33 3 20 43 40 38.

E-mail address: xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr (X. Le Bourhis).

¹ These authors contributed equally to this work.

showed that p75^{NTR} overexpression increased cell survival by inhibiting intrinsic apoptotic pathway and decreased cell proliferation by accumulating cells in the G0/G1 phase. Interestingly, the p75^{NTR}-induced biological effects involved p21^{waf1}. Moreover, p75^{NTR} overexpression increased both basal tumor growth and tumor resistance to TRAIL in a SCID mice xenograft model.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids

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

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

The MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were routinely maintained in monolayer cultures in EMEM medium (Cambrex) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Perbio), 1% non-essential amino acids, 40 units/ml penicillin–streptomycin, 40 µg/ml gentamycin, and 10 µg/ml insulin for MCF-7 cells. To establish the p75^{NTR} overexpressing model, MDA-MB-231 cells were first transfected with pVgRXR using Fugene (Roche) according to the manufacturer's instructions. Stably transfected clones were selected with 300 µg/ml Zeocin (Sigma-Aldrich®). The selected clones were tested for inducibility by transient transfection with pIND-βGal; the clone presenting the highest β-galactosidase activity after treatment with ponasterone A (PA; Sigma-Aldrich®) was chosen for the secondary stable transfection with pIND-p75^{NTR}. Secondary clones were established in the same manner as the primary clones except the cells transfected with pIND-p75^{NTR} were cultured in the presence of 300 µg/ml Zeocin and 1 mg/ml G418. Levels of p75^{NTR} mRNA in the selected secondary clones were then analyzed by real time PCR after PA induction. The clone presenting the highest level of p75^{NTR} mRNA was chosen for further study.

2.3. Real time RT-PCR

Total RNA from cells was isolated with tri-reagent (Euromedex) and treated with DNase. Reverse transcription was performed with 1 µg of RNAs, 0.5 µg of random hexamers, 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen™) for 10 min at 25 °C, 50 min at 37 °C and 15 min at 70 °C in a final volume of 20 µl. Real time PCR amplifications were performed using a Quantitect SYBR®Green PCR kit (Qiagen) with 2 µl of 1:20 cDNA and 500 nM of primers. The primers used were as follows: for p75^{NTR} transcript 5'-ACGGCTACTACCAGGATGAG-3' and 5'-TGGCCTCGTCGGAATACGTG-3'; for p21^{waf1} 5'-CACTCCAAACGCCGGCTGATCC-3' and 5'-TGTA-GAGCGGCGCTTGAAGCCCTC-3' and for RPLP0 (human acidic ribosomal phosphoprotein P0), which was used as a reference gene: 5'-GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT-3' and 5'-GATGACCAGCCCAAG-

GAGA-3'. The subsequent PCR conditions 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) with the SYBRGreen option (with dissociation curves). p75^{NTR} mRNA level was expressed as relative quantity compared to that expressed by control cells.

2.4. Western blot analysis

Extraction of total protein as well as protein from mitochondrial and cytosolic fractions was performed before Western blot analysis, as previously described [22]. Primary antibodies used are as follows: antibodies against p75^{NTR} (1:2000, Promega), p21^{waf1} (1:500), cleaved caspase 3 (1:1000), caspase 8 (1:1000), caspase 9 (1:1000), COX IV antibody (1:1000), cyclin D1 (1:500), cyclin D3 (1:500), cyclin E (1:500), E2F(1:500), p27^{Kip1} (1:500), phospho-Rb Ser795 (1:500), Rb (1:500), p15^{INK4B} (1:500), p16^{INK4A} (1:500) from Cell Signaling Technology®, antibodies against PARP (1:200) from Santa Cruz Biotechnology®, antibodies against c-IAP and Bid (1:500, R&D System®), anti-XIAP (1:500, BD Transduction™), anti-β-actin (1:5000, Sigma-Aldrich®) and anti-cytochrome C (1:5000, Millipore™).

2.5. Immunocytochemistry

Cells (1 × 10⁴) were grown on cover slips and treated with 10 µM PA for 24 h in culture medium containing 10% FBS. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min (4 °C) and after two washes, they were permeabilized and blocked in PBS containing 1% BSA and 100 mM glycine for 45 min at room temperature. Cover slips were incubated with FITC coupled anti-p75 antibody (1:25, Cedarlane Laboratories®) overnight at 4 °C in PBS–1% BSA. After several washes in PBS, cover slips were mounted in Mowiol. Observation was performed on a Zeiss LSM 510 confocal microscope (488 nm excitation for FITC).

2.6. Apoptosis detection and cell survival assay

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

2.7. Cell growth assay and cell cycle analysis

2.7.1. Cell growth

Cells (5 × 10⁴) were plated in 35 mm dishes and cultured in EMEM containing different concentrations of serum. Cell numbers were evaluated after 72 h by using a cell counter (Beckman Coulter).

2.7.2. Cell cycle analysis

Cells were trypsinized and washed twice with PBS. They were subsequently stained by Cell Cycle Coulter reagent (Beckman Coulter). Briefly, pelleted cells (1 × 10⁶) were mixed with 50 µl of reagent A (15 s, 20 °C, under vortex agitation) and 950 µl of reagent B. After incubation for 2 h at 4 °C in the dark, cell cycle was analyzed with a Beckman FACS analyzer.

2.8. siRNA inhibition

siRNA oligonucleotides targeting p21^{waf1} 5'-GGACCUGUCACUGU-CUUGUACCC-3' and 3'-GGGUACAAGACAGUACAGGUCC-5', p75^{NTR} 5'-AUGCCUCCUUGGCCAUCC-3' and 5'-GGAGGUGCCAAGGAGGCAU-3' or

negative control siRNA 5'-GCUGACCCUGAAGUUAUUAU-3' and 3'-TTGACUGGGACUUAAGUAG-5' were used for cell transfection by electroporation (Amaxa®) according to the manufacturer's instructions.

2.9. Tumor xenograft growth in immunodeficient mice

Six-week-old female severe combined immunodeficient (SCID) mice were from Institut Pasteur de Lille, France. Mice were maintained in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee procedures and guidelines. MDA-MB-231 p75^{NTR}-inducible cells were subcutaneously injected into flanks of the animals (5×10^6 cells per flank). When tumor volume reached about 1 cm³ (day 0), 100 μ l PBS containing 100 μ M PA or DMSO vehicle (3 times per week) and/or 3.3 μ g TRAIL (2 times per week) were injected as close as possible to the tumor. The tumor volume was determined regularly by measuring the length (l) and width (w) and then calculating the volume as $\pi/6 \times l \times w \times (l + w)/2$. Eight animals were used in each group.

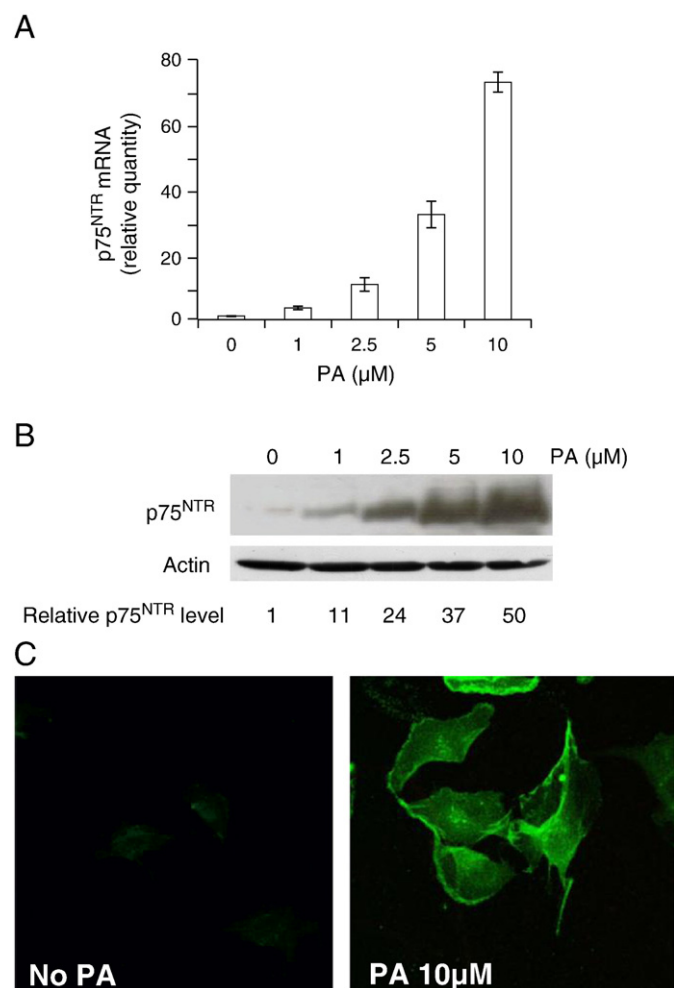


Fig. 1. Establishment of inducible p75^{NTR} overexpressing clone. MDA-MB-231 breast cancer cells were first transfected with pVGRXR and then with pIND containing the full length sequence of p75^{NTR} cDNA as described in Section 2. The clone presenting the highest responsiveness to ponasterone A (PA) was chosen for further study. (A) Real time RT-PCR quantification of p75^{NTR} mRNA. Total RNA from the selected clone treated with various concentrations of PA for 24 h was isolated and reverse-transcribed. Levels of p75^{NTR} mRNA were expressed as relative quantities compared to that expressed by cells not treated with PA (considered as 1). (B) Western blot analysis of p75^{NTR} protein. Cells were cultured with various concentrations of PA for 24 h. The relative p75^{NTR} protein levels were quantified using NIS-Elements BR software (Nikon). (C) p75^{NTR} immunostaining of cells treated or not with 10 μ M PA for 24 h.

2.10. Immunohistochemistry

Xenograft tumor samples were fixed in 4% paraformaldehyde buffer, embedded in paraffin, sectioned at 5 μ m, dewaxed by methylcyclohexane (3×10 min) and rehydrated through a graded series of ethanol and water. Tissue sections were incubated with a Tris sodium citrate buffer 10 mM (pH 6) for 40 min at 95 °C. Mouse monoclonal antibody against

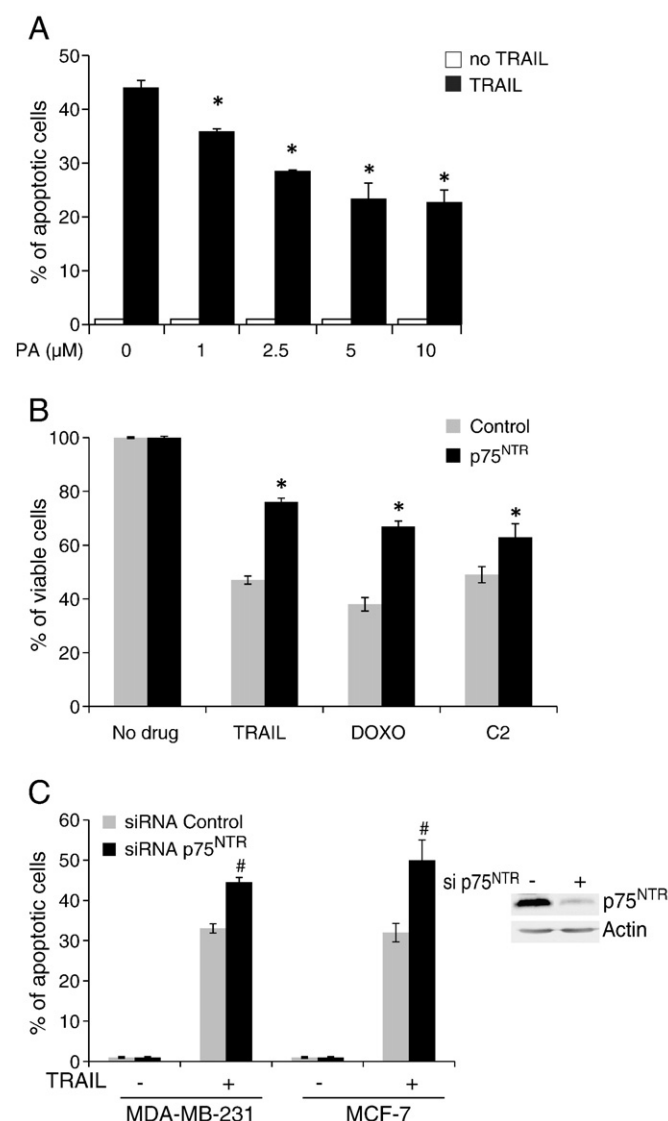
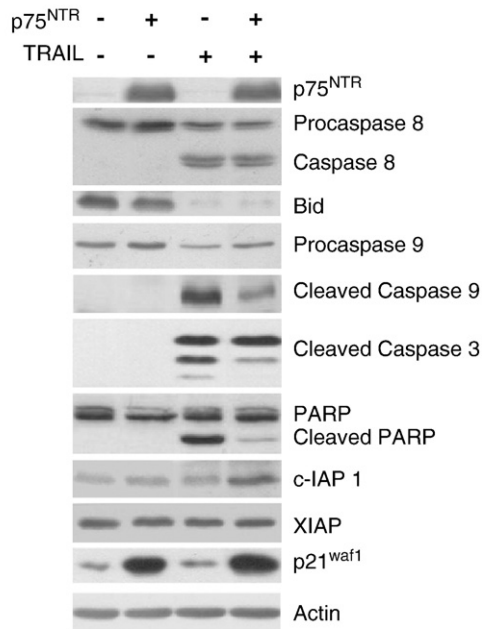


Fig. 2. Effect of p75^{NTR} overexpression on apoptosis. (A) p75^{NTR} inhibited TRAIL-induced apoptosis in a dose-dependent manner. MDA-MB-231 inducible cells were treated with various concentrations of PA for 24 h and then with 4 ng/ml TRAIL for 4 h. Apoptotic nuclei were counted after Hoechst staining under a fluorescence microscope. Results are the mean of at least 3 independent experiments each in triplicate $\pm$ SD. * $p < 0.01$. (B) p75^{NTR} overexpression increased the survival of cells to different apoptogens. Cells were induced with 10 μ M PA for 24 h and then treated with 1 ng/ml TRAIL, 10 μ M doxorubicin (Doxo), or 20 μ M ceramide 2 (C2) for another 24 h. Cell viability was determined by MTT assay (8 wells per condition). Results are the mean of 2 independent experiments $\pm$ SD. * $p < 0.01$, p75^{NTR} versus control cells. (C) Knock-down of endogenous p75^{NTR} rendered breast cancer cells more sensitive to TRAIL-induced apoptosis. Native MDA-MB-231 and MCF-7 cells were transfected with 4 μ M siRNA against p75^{NTR} or with siRNA control and cultured in complete medium for 24 h. Cells were then treated with 4 ng/ml TRAIL for 4 h. TRAIL-induced apoptotic nuclei were counted after Hoechst staining under a fluorescence microscope. Results are the mean of 2 independent experiments each in triplicate $\pm$ SD. * $p < 0.05$ versus cells transfected with control siRNA. Efficiency of siRNA against p75^{NTR} was shown by Western blot after transfection of MDA-MB-231 inducible cells treated with 10 μ M PA for 24 h.

A



B

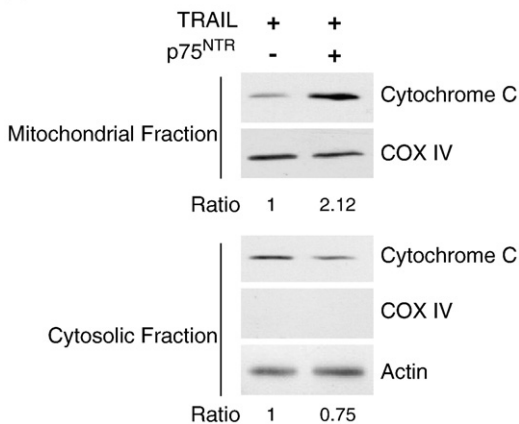


Fig. 3. Effects of p75^{NTR} overexpression on apoptosis regulators. (A) Cells were induced with 10 μ M PA for 24 h (p75^{NTR}). Cells were then treated with 4 ng/ml TRAIL in starved medium for another 4 h before the extraction of proteins. (B) Cells were induced with 10 μ M PA for 48 h and then treated with 4 ng/ml TRAIL for another 4 h in starved medium before subcellular fractionation. The levels of different molecules involved in apoptosis induction were analyzed by Western blot. COX IV and actin served as loading and purity controls of mitochondrial and cytosolic fractions, respectively. Results are from one experiment representative of two independent experiments. The relative cytochrome C protein levels were analyzed with the Bio-Rad GS-800 calibrated densitometer and quantified using Quantity One Software.

p21^{waf1} (1:100 dilution) from Cell Signaling Technology® and rabbit monoclonal antibody against p75^{NTR} (1:50 dilution) from Promega were used. These primary antibodies were incubated overnight at 4 °C. Biotinylated goat anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Sigma-Aldrich) were used as the secondary antibodies (1:200 dilution, 1 h at room temperature). The slides were treated with the Renaissance TSA Biotin System kit (Perkin Elmer) according to the manufacturer's instructions. The signals were visualized with SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets (Sigma-Aldrich) for 5 min. The sections were then counterstained with hematoxylin (Sigma-Aldrich) and mounted with Dako Glycergel (Dakocytomation). Pictures were taken at 20 $\times$ magnification under Nikon Eclipse Ti-U microscope.

2.11. Statistical analysis

Results are expressed as means $\pm$ SD. Analysis of statistical significance was performed using the Prism 5.0 program (GraphPad, USA). Student's t test was used for paired observations. Three or more values were tested using one-way ANOVA and Dunnett's post hoc test. A p-value less than 0.05 was considered significant.

3. Results

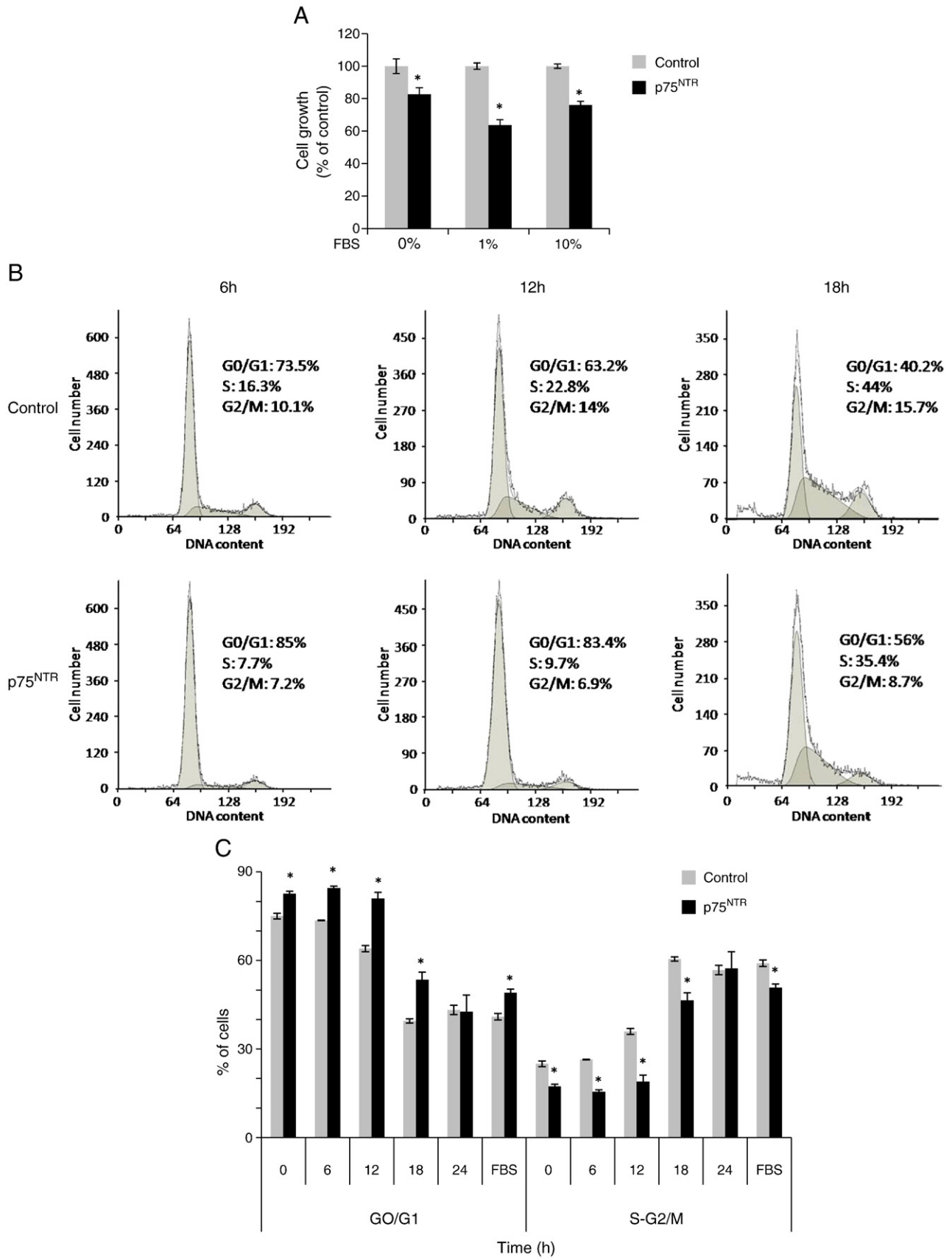
3.1. Generation of inducible p75^{NTR} overexpressing cells

To determine the functional importance of p75^{NTR} overexpression in breast cancer development, we established inducible p75^{NTR} overexpressing cells by transfecting MDA-MB-231 breast cancer cells with pVgRXR and pIND-p75^{NTR} vectors. The most responsive clone was chosen as described in Section 2. Without ponasterone A (PA) induction, no modification of p75^{NTR} expression was observed in the selected clone when compared to untransfected cells (data not shown). As shown in Fig. 1A and B, the levels of p75^{NTR} mRNA and protein increased in a dose-dependent manner after PA induction. Upon induction with 10 μ M PA, cells expressed more than 50-fold of p75^{NTR} when compared to control; this level is similar to that observed in the majority of breast tumor biopsies [16]. Importantly, we also showed that the overexpressed p75^{NTR} protein was successfully addressed to the cytoplasmic membrane, as revealed by immunocytochemical analysis (Fig. 1C). In further experiments, p75^{NTR} overexpression was realized after induction with 10 μ M PA.

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

p75^{NTR} has been reported to favor cell survival or apoptosis, depending on cell context [11,19,21]. Thus, we evaluated the incidence of p75^{NTR} overexpression in the survival of breast cancer cells. For this, cells were treated with TRAIL, and apoptosis was measured after Hoechst staining (Fig. 2A). The number of characteristic condensed and fragmented nuclei was determined in cells expressing various levels of p75^{NTR}. As shown in Fig. 2A, p75^{NTR} inhibited TRAIL-induced apoptosis in a dose-dependent manner, indicating the increased survival ability of p75^{NTR} overexpressing cells. This was further consolidated using MTS assay (Fig. 2B): upon treatment with TRAIL, doxorubicin or ceramide, the percentage of cell viability was higher in p75^{NTR} overexpressing cells compared to control cells. The increased survival was due to the specific action of p75^{NTR}, as PA had no effect on the survival of parental MDA-MB-231 cells (data not shown). To ensure the relevance of the survival effect of p75^{NTR}, the endogenous receptor was knocked down thanks to specific siRNA in both the parental MDA-MB-231 and the MCF-7 breast cancer cell lines. As shown in Fig. 2C, the inhibition of endogenous p75^{NTR} rendered cells more sensitive to TRAIL-induced apoptosis, thus confirming the pro-survival effect of p75^{NTR} in breast cancer cells.

To decipher the mechanisms involved in p75^{NTR} overexpression-enhanced cell survival, we first analyzed the expression of major proteins implicated in apoptotic pathways by Western blot. As shown in Fig. 3A and B, no modification was observed on TRAIL-induced cleavage of procaspase 8 or Bid when p75^{NTR} overexpressing cells were compared to control cells. In contrast, p75^{NTR} overexpressing cells exhibited a decrease of TRAIL-induced cleavage of caspase 9, caspase 3 and PARP, which was associated with a decrease of cytochrome C release from the mitochondria. These results suggested that the pro-survival effect of p75^{NTR} implicated essentially the inhibition of intrinsic apoptotic pathway. Interestingly, the inhibitor of apoptosis protein-1 (c-IAP1) was increased when p75^{NTR} overexpressing cells were treated with TRAIL (Fig. 3A). In contrast, p21^{waf1} was strongly increased in p75^{NTR} overexpressing cells whatever the TRAIL treatment.



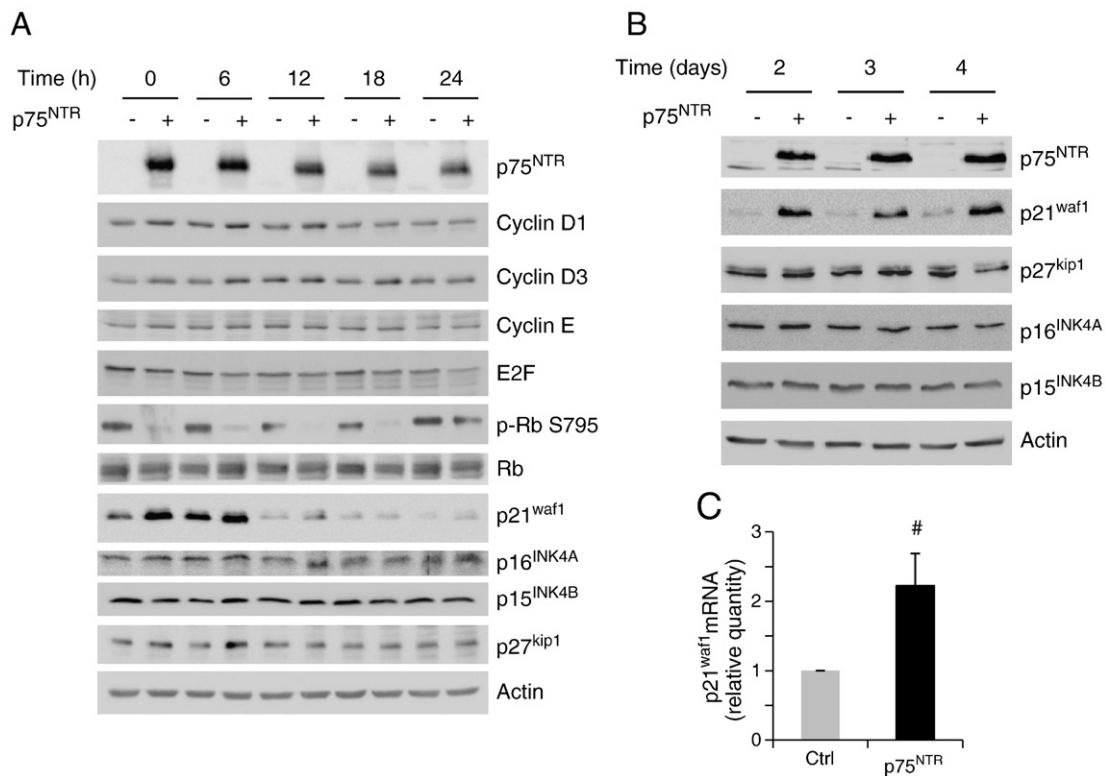


Fig. 5. Effects of p75^{NTR} overexpression on cell cycle regulators. (A) Western blot analysis of proteins from cells cultured after the release of synchronized cultures. Cells were treated with or without 10 μ M PA for 24 h (p75^{NTR}) in complete medium containing 10% FBS and then cultured in serum-free medium for the synchronization with or without PA. Forty-eight hours later, the serum-free medium was replaced by the complete medium for 6, 12, 18 or 24 h. Results are from one experiment representative of three independent experiments. (B) Western blot analysis of proteins from cells cultured in medium containing 1% FBS. Cells were cultured in medium containing 1% FBS with or without 10 μ M PA (p75^{NTR}) for 2 to 4 days. Results are from one experiment representative of three independent experiments. (C) Real time RT-PCR quantification of p21^{waf1} mRNA. Cells were cultured in medium containing 1% FBS with or without 10 μ M PA (p75^{NTR}) for 48 h. The results were expressed as relative quantities compared to the control cells (considered as 1) and are the mean of 3 independent experiments $\pm$ SD. [#]p<0.05, p75^{NTR} versus control.

3.3. p75^{NTR} overexpression inhibits cell growth by accumulating cells in the G0/G1 phase

The incidence of p75^{NTR} overexpression on cell behaviors was investigated in different culture conditions. No significant difference was observed between p75^{NTR} overexpressing cells and control cells in terms of migration, invasion and adhesion (data not shown). However, p75^{NTR} overexpressing cells exhibited reduced cell growth compared to control cells (Fig. 4A) whatever the serum concentration in the medium. We then analyzed cell cycle distribution by flow cytometry. For this, cells were synchronized by serum starvation during 48 h and then cultured in medium containing 10% serum. As shown in Fig. 4B and C, up to 12 h after the release of synchronized cultures, the percentage of p75^{NTR} overexpressing cells in the G0/G1 phase (about 85%) remained constant, while that of control cells decreased with a concomitant increase in S–G2/M phases. Twenty four hours after the release of synchronized cultures, the percentages of cells in G0/G1 and S–G2/M phases were equivalent in both control and p75^{NTR} overexpressing cells, indicating the progression of synchronized cells in cell cycle. Of note, in both serum starvation condition (time 0 h after starvation) and 10% FBS containing medium,

higher percentages of cells in the G0/G1 phase were observed when p75^{NTR} was overexpressed (Fig. 4C). PA did not modify cell cycle progression of parental MDA-MB-231 cells (data not shown), indicating the specific action of p75^{NTR} on G0/G1 accumulation. Together, these results suggest that p75^{NTR} overexpression could slow down breast cancer cell growth with an accumulation of cells in the G0/G1 phase.

We then determined the expression of principal proteins implicated in G1–S transition by Western blot analysis. For this, cells were first synchronized by serum starvation for 48 h and then cultured in medium containing 10% serum. As shown in Fig. 5A, a reduction of phospho-Rb and an increase of p21^{waf1} were observed in p75^{NTR} overexpressing cells compared to control cells. These differences disappeared 24 h after the release of synchronized cultures, confirming a similar cell cycle distribution observed in Fig. 4C. In contrast, no significant variation was detected for the proteins such as cyclin D1, cyclin D3, cyclin E, E2F, Rb, p16^{INK4A}, p15^{INK4B} and p27^{kip1}. The upregulation of p21^{waf1} in p75^{NTR} overexpressing cells was also observed when cells were cultured in medium containing 1% FBS (Fig. 5B), while other cyclin inhibitors such as p15^{INK4B}, p16^{INK4A} and p27^{kip1} were not modified in the same conditions. To further

Fig. 4. Effects of p75^{NTR} overexpression on cell growth *in vitro*. (A) Effect of p75^{NTR} overexpression on cell growth. MDA-MB-231 inducible cells were cultured with or without 10 μ M PA for 72 h in medium containing 1 or 10% FBS. Results are the mean of 3 independent experiments each in triplicate $\pm$ SD. The mean number of control cells was considered as 100%. *p<0.01, p75^{NTR} versus control cells. (B) Effect of p75^{NTR} overexpression on cell cycle progression. Cells were first cultured with or without 10 μ M PA for 24 h in 10% FBS medium which was then replaced by serum-free medium with or without PA for another 48 h. Starvation medium was then replaced by 10% FBS medium (time 0 h) and cells were cultured for further 6, 12, 18 or 24 h. The percentage of cells in each phase was determined by flow cytometry analysis. (C) Results in (B) are represented as histogram and are the mean of 3 independent experiments $\pm$ SD. The condition "FBS" was used as a control without step of serum starvation. *p<0.01, p75^{NTR} versus control cells.

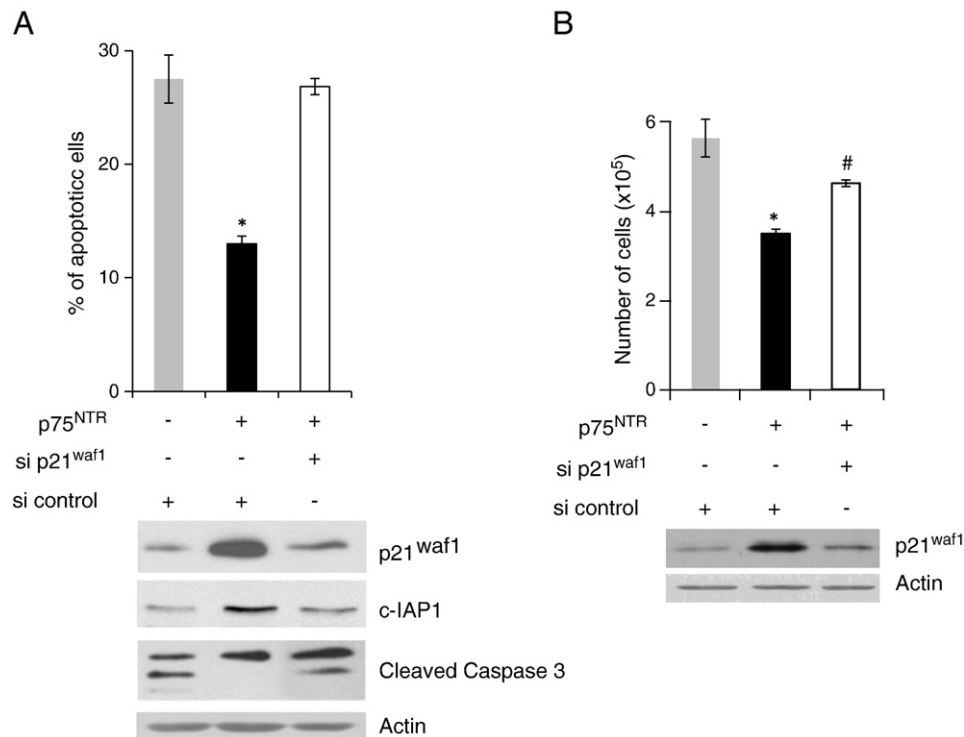


Fig. 6. Effects of sip21^{waf1} on p75^{NTR}-induced cell growth inhibition and survival. (A) Cell survival assay and Western blot analysis. Cells were transfected with 3 μ M siRNA p21^{waf1} or with siRNA control and cultured in 10% FBS medium for 24 h. Cells were then cultured with or without 10 μ M PA for another 24 h in serum-free medium and further treated with 4 ng/ml TRAIL for 4 h before Hoechst staining or protein extraction. Results are the mean of two independent experiments each in triplicate $\pm$ SD. * $p < 0.01$, p75^{NTR} (black column) versus control (grey column). (B) Cell growth assay. Cells were transfected with 3 μ M siRNA p21^{waf1} or with siRNA control and cultured in 10% FBS medium for 24 h, cells were then rinsed and cultured in 1% FBS medium with or without 10 μ M PA (p75^{NTR}) for another 3 days. Results are the mean of two independent experiments each in triplicate $\pm$ SD. * $p < 0.01$, # $p < 0.05$, p75^{NTR} versus control (grey column).

determine the molecular mechanisms of p21^{waf1} modification, we then performed real time RT-PCR analysis. As shown in Fig. 5C, after 48 h of culture in medium containing 1% FBS, p75^{NTR} overexpressing cells expressed more than 2-fold p21^{waf1} mRNA compared to control cells.

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

As p21^{waf1} was strongly increased in p75^{NTR} overexpressing cells, we tried to determine its potential involvement in p75^{NTR}-mediated biological effects, by using an siRNA approach (Fig. 6). Transfection of p75^{NTR} overexpressing cells with p21^{waf1} siRNA decreased the level of p21^{waf1} to that of control cells and abolished the pro-survival effect of p75^{NTR}, which was accompanied by a decrease of c-IAP1 level and an increase of procaspase 3 cleavage (Fig. 6A). Moreover, inhibition of p21^{waf1} partially restored cell growth slowdown of p75^{NTR} overexpressing cells (Fig. 6B). These results indicated that p21^{waf1} was a key element in mediating the biological effects of p75^{NTR}.

3.5. p75^{NTR} overexpression increases tumor growth and resistance to TRAIL in SCID mice

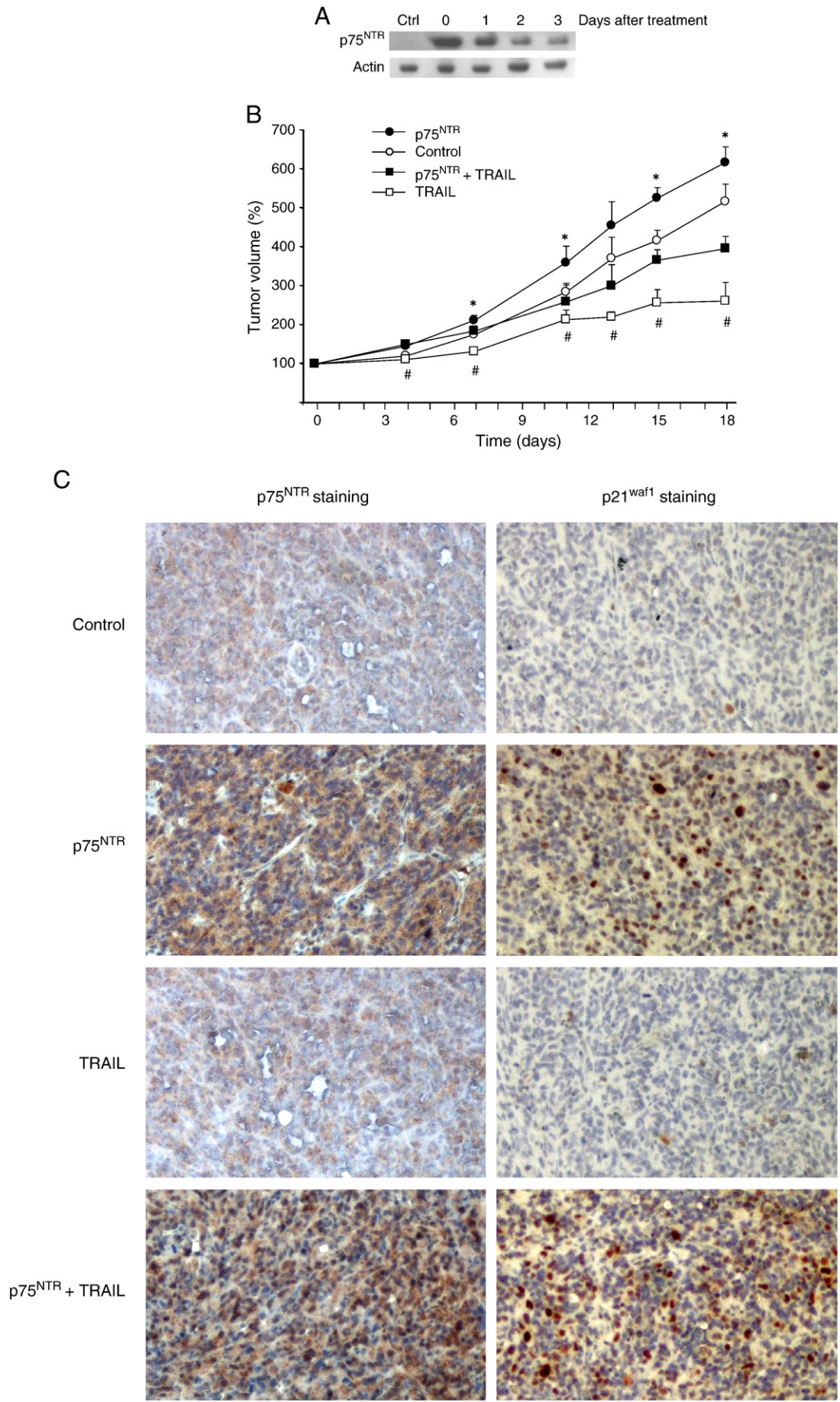
To investigate whether p75^{NTR} expression could alter the growth of breast tumors *in vivo*, we first determined the stability of p75^{NTR} after PA induction. As shown in Fig. 7A, the levels of p75^{NTR} decreased with time but still remained high even 3 days after PA induction

compared to control cells. We then subcutaneously injected MDA-MB-231 cells into SCID mice and performed p75^{NTR} induction and/or TRAIL treatment as described in Section 2. Tumors formed by p75^{NTR} overexpressing cells exhibited significantly higher growth rate, with an increase of 20% of tumor volume at the end of the experiment. Furthermore, p75^{NTR} overexpression rendered tumors more resistant to TRAIL treatment, resulting in an increase of more than 50% of tumor volume at the end of the experiment, when compared to the control group (Fig. 7B). Of note, immunohistochemical staining showed that tumors, under PA induction, maintained high levels of p75^{NTR} and p21^{waf1} whatever the TRAIL treatment (Fig. 7C). These data supported our *in vitro* findings and suggested the tumor favoring function of p75^{NTR} through p21^{waf1}.

4. Discussion

p75^{NTR} has been proposed as a potential tumor suppressor in carcinomas of prostate, bladder, stomach and liver. In these cancers, p75^{NTR} is often downregulated and ectopic overexpression of p75^{NTR} inhibits cell proliferation [10] and invasion [23], and induces apoptosis [24]. In other cancers including melanoma and pancreatic carcinoma, p75^{NTR} exerts rather a tumor-promoting function by favoring survival and invasion of cancer cells [12,13,25]. We have previously shown that p75^{NTR} is involved in the pro-survival effect of NGF in breast cancer cells [19,20]. To further investigate the role of p75^{NTR} in breast cancer cell growth, we established a model of inducible expression of p75^{NTR} using MDA-MB-231 breast cancer cells.

Fig. 7. Effects of p75^{NTR} overexpression on tumor growth in SCID mice. (A) Evaluation of overexpressed p75^{NTR} protein stability. Cells were treated with 10 μ M PA for 24 h and then cultured without PA for 1 to 3 days. The levels of p75^{NTR} protein were evaluated by Western blot. (B) SCID mice were injected with p75^{NTR} inducible MDA-MB-231 breast cancer cells. When mean tumor volumes reached about 1 cm³ (day 0), mice were treated with 100 μ M PA and/or 3.3 μ g TRAIL. All injections were performed near the tumor site 3 times per week for PA and 2 times per week for TRAIL until animal sacrifice. Tumor volume was monitored regularly as indicated in the figure. Eight animals were used for each group and Student's *t* test was performed. * $p < 0.05$, p75^{NTR} versus control; # $p < 0.05$, p75^{NTR} + TRAIL versus TRAIL. (C) Representative immunostaining of p75^{NTR} and p21^{waf1} on xenografted tumor sections.



We showed that p75^{NTR} overexpression did not affect cell adhesion, migration or invasion (data not shown) but could enhance cell survival. The pro-survival effect of p75^{NTR} was mainly mediated by the inhibition of the intrinsic mitochondrial pathway, as p75^{NTR} overexpressing cells exhibited a decrease of TRAIL-induced cleavage of procaspase 9, procaspase 3 and PARP, which was associated with a decrease of cytochrome C release from the mitochondria. In contrast, TRAIL-induced cleavage of procaspase 8 or Bid was not modified in p75^{NTR} overexpressing cells.

Importantly, we showed that p75^{NTR}-enhanced survival was mediated through the upregulation of p21^{waf1}. p21^{waf1} has been described to favor or inhibit apoptosis according to cell context [26,27]. Several mechanisms have been so far reported for the pro-survival effect of p21^{waf1}. For instance, cytoplasmic p21^{waf1} can complex and inhibit apoptosis signal-regulated kinase 1 (ASK1) [28] which is known to activate a mitochondrial apoptotic pathway [29]. p21^{waf1} can also prevent apoptosis by binding and inhibiting p34cdc-2/CDK-1 complex, which plays an important role in apoptosis induced by Taxol or docetaxel in breast and prostate cancer cells [30]. Moreover, p21^{waf1} is reported to interact with procaspase 3 leading to resistance to Fas-induced apoptosis [31] and stabilization of apoptotic inhibitor protein c-IAP1 [32]. Accordingly, we have shown that p21^{waf1} was also involved in increased expression of c-IAP1 in p75^{NTR} overexpressing cells. However, by performing co-immunoprecipitation assay, we have not observed any interaction between p21^{waf1} and procaspase 3 in breast cancer cells (data not shown). Thus, the molecular mechanism by which p75^{NTR}, through p21^{waf1}, inhibited the intrinsic mitochondrial pathway in breast cancer cells remains to be determined.

p21^{waf1} is a well known cyclin/CDK inhibitor; it inhibits cell progression from G1 to S phase by inhibiting cyclin/CDK activities and thereby maintains the hypophosphorylated repressor state of Rb. Moreover, p21^{waf1} can also associate with transcription factors such as E2F or c-Myc to suppress cell cycle progression [33,34]. Accordingly, we showed that an accumulation of cells in G0/G1 was associated with an increase of p21^{waf1} and a decrease of Rb phosphorylation in p75^{NTR} overexpressing cells. The anti-proliferative effect of p75^{NTR} has been described in several types of cancer cells such as that of prostate [9], bladder [14], stomach [10] and liver [11]. In these cancers, p75^{NTR} is often absent or significantly decreased compared with their normal counterparts. Overexpression of p75^{NTR} induces an accumulation of cells in the G0/G1 phase with a concomitant decrease of cyclins, cyclin-dependent kinase 2, and phospho-Rb and an increase of CDK inhibitors such as p27^{Kip1} or p16^{ink4}, depending on cell types. The differences observed by us and others in the modification of cell cycle control molecules may be due to the specific cell context.

To our knowledge, we are the first to show that p75^{NTR} overexpression could favor survival and inhibit proliferation in the same cell type by upregulating both mRNA and protein of p21^{waf1}. Our findings place p21^{waf1} as the central element of p75^{NTR}-mediated biological effects. This is of particular importance, as increased p21^{waf1} expression has been linked to poorer prognosis in breast cancer [35,36]. Moreover, p21^{waf1} overexpression has been reported to be an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia [37]. Also consistent with our findings, Fortino et al. have shown that phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) can enhance the survival and reduce the proliferation of MCF-7 breast cancer cells via p21^{waf1} [38]. Similarly, the expression of unliganded estrogen receptor- α inhibits MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell growth through upregulation of p21^{waf1} [39]. p21^{waf1} is one of the major transcriptional targets of p53 [40], but we can exclude the involvement of p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells, as p53 is mutated and not functional in these cells [41]. Recently, Pincheira et al. have identified the transcription factor Sall2 as a novel interacting protein of p75^{NTR} in neural cells, and have shown that Sall2 is able to increase p21^{waf1} transcription [42]. Furthermore, NGF is known to induce p21^{waf1} transcription through the cooperation between p300 and Sp1 transcription factors in PC12 cells [43].

It has been largely argued that cell cycle arrest can protect cancer cells from stress-induced apoptosis, by preventing DNA damages or permitting repair of damaged DNA [44–47]. We made the hypothesis that p21^{waf1}-mediated G0/G1 accumulation might render p75^{NTR} overexpressing cells more resistant to apoptogens. Significantly, we observed that in a SCID mice xenografted breast tumor model, p75^{NTR} overexpression strongly increased tumor resistance to the treatment with TRAIL, one of the most promising anti-cancer agents. Furthermore, p75^{NTR} overexpression also favored tumor growth, probably by enhancing basal cell survival through p21^{waf1}, as we observed an upregulation of p21^{waf1} in tumor sections formed by p75^{NTR} overexpressing cells.

5. Conclusion

Although more basic studies are clearly needed to understand the mechanism linking p75^{NTR} and p21^{waf1} upregulation, our results emphasized the pro-survival function of p75^{NTR} and the crucial role of p21^{waf1} in p75^{NTR}-mediated biological effects in breast cancer cells. The enhanced tumor growth and tumor resistance to TRAIL treatment in xenograft model suggest that p75^{NTR} overexpression might be implicated in cancer development and drug resistance in a subpopulation of breast cancer patients. Our results provide thus a rationale to consider p75^{NTR} as a potential target for the future design of innovative therapeutic strategies.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Grant support: INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2009), le comité Nord de la Ligue Nationale Contre le Cancer, le Ministère de l'Éducation Nationale, and la Région Nord-Pas-de-Calais. S Verbeke had a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

References

- [1] M.V. Chao, *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (4) (2003) 299.
- [2] C.K. Underwood, E.J. Coulson, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (9) (2008) 1664.
- [3] B. Lu, P.T. Pang, N.H. Woo, *Nat. Rev. Neurosci.* 6 (8) (2005) 603.
- [4] E. Liepinsh, L.L. Ilag, G. Otting, C.F. Ibanez, *EMBO J.* 16 (16) (1997) 4999.
- [5] A. Nykjaer, T.E. Willnow, C.M. Petersen, *Curr. Opin. Neurobiol.* 15 (1) (2005) 49.
- [6] A.S. Rocha, B. Risberg, J. Magalhaes, V. Trovisco, I.V. de Castro, P. Lazarovici, P. Soares, B. Davidson, M. Sobrinho-Simoes, *Hum. Pathol.* 37 (5) (2006) 562.
- [7] F. Truzzi, A. Marconi, R. Lotti, K. Dallaglio, L.E. French, B.L. Hempstead, C. Pincelli, *J. Invest. Dermatol.* 128 (8) (2008) 2031.
- [8] F. Khwaja, D. Djakiew, *Mol. Carcinog.* 36 (3) (2003) 153.
- [9] F. Khwaja, A. Tabassum, J. Allen, D. Djakiew, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341 (4) (2006) 1184.
- [10] H. Jin, Y. Pan, L. Zhao, H. Zhai, X. Li, L. Sun, L. He, Y. Chen, L. Hong, Y. Du, D. Fan, *Neoplasia* 9 (6) (2007) 471.
- [11] H. Yuanlong, J. Haifeng, Z. Xiaoyin, S. Jialin, L. Jie, Y. Li, X. Huahong, S. Jiugang, P. Yanglin, W. Kaichun, D. Jie, F. Daiming, *Cancer Lett.* 268 (1) (2008) 110.
- [12] D. Marchetti, R. Aucoin, J. Blust, B. Murry, A. Greiter-Wilke, *J. Cell. Biochem.* 91 (1) (2004) 206.
- [13] D.G. Menter, J.L. Herrmann, D. Marchetti, G.L. Nicolson, *Invasion Metastasis* 14 (1–6) (1994) 372.
- [14] A. Tabassum, F. Khwaja, D. Djakiew, *Int. J. Cancer* 105 (1) (2003) 47.
- [15] E. Adriaenssens, E. Vanhecke, P. Saule, A. Mougel, A. Page, R. Romon, V. Nurcombe, X. Le Bourhis, H. Hondermarck, *Cancer Res.* 68 (2) (2008) 346.
- [16] S. Descamps, V. Pawlowski, F. Revillon, L. Hornez, M. Hebbat, B. Boilly, H. Hondermarck, J.P. Peyrat, *Cancer Res.* 61 (11) (2001) 4337.
- [17] Y. Sakamoto, Y. Kitajima, G. Edakuni, T. Hamamoto, K. Miyazaki, *Oncol. Rep.* 8 (5) (2001) 973.
- [18] J.S. Reis-Filho, D. Steele, S. Di Palma, R.L. Jones, K. Savage, M. James, F. Milanezi, F.C. Schmitt, A. Ashworth, *Mod. Pathol.* 19 (2) (2006) 307.
- [19] S. Descamps, R.A. Toillon, E. Adriaenssens, V. Pawlowski, S.M. Cool, V. Nurcombe, X. Le Bourhis, B. Boilly, J.P. Peyrat, H. Hondermarck, *J. Biol. Chem.* 276 (21) (2001) 17864.
- [20] I. El Yazidi-Belkoura, E. Adriaenssens, L. Dolle, S. Descamps, H. Hondermarck, *J. Biol. Chem.* 278 (19) (2003) 16952.

- [21] A. Naderi, A.E. Teschendorff, J. Beigel, M. Cariati, I.O. Ellis, J.D. Brenton, C. Caldas, *Cancer Res.* 67 (14) (2007) 6725.
- [22] V. Chopin, C. Slomianny, H. Hondermarck, X. Le Bourhis, *Exp. Cell Res.* 298 (2) (2004) 560.
- [23] H. Jin, Y. Pan, L. He, H. Zhai, X. Li, L. Zhao, L. Sun, J. Liu, L. Hong, J. Song, H. Xie, J. Gao, S. Han, Y. Li, D. Fan, *Mol. Cancer Res.* 5 (5) (2007) 423.
- [24] F.S. Khwaja, E.J. Quann, N. Pattabiraman, S. Wynne, D. Djakiew, *Mol. Cancer Ther.* 7 (11) (2008) 3539.
- [25] W. Wang, H. Zhao, S. Zhang, E. Kang, Y. Chen, C. Ni, M. Zhu, *Eur. J. Surg. Oncol.* 35 (8) (2009) 826.
- [26] T. Abbas, A. Dutta, *Nat. Rev. Cancer* 9 (6) (2009) 400.
- [27] O. Coqueret, *Trends Cell Biol.* 13 (2) (2003) 65.
- [28] M. Asada, T. Yamada, H. Ichijo, D. Delia, K. Miyazono, K. Fukumuro, S. Mizutani, *EMBO J.* 18 (5) (1999) 1223.
- [29] K. Zu, L. Hawthorn, C. Ip, *Mol. Cancer Ther.* 4 (1) (2005) 43.
- [30] S.C. Shen, T.S. Huang, S.H. Jee, M.L. Kuo, *Cell Growth Differ.* 9 (1) (1998) 23.
- [31] A. Suzuki, Y. Tsutomi, N. Yamamoto, T. Shibutani, K. Akahane, *Mol. Cell. Biol.* 19 (5) (1999) 3842.
- [32] R.A. Steinman, D.E. Johnson, *Mol. Med.* 6 (9) (2000) 736.
- [33] L. Delavaine, N.B. La Thangue, *Oncogene* 18 (39) (1999) 5381.
- [34] A.L. Gartel, K. Shchors, *Exp. Cell Res.* 283 (1) (2003) 17.
- [35] Z.E. Winters, R.D. Leek, M.J. Bradburn, C.J. Norbury, A.L. Harris, *Breast Cancer Res.* 5 (6) (2003) R242.
- [36] W. Yang, K.S. Klos, X. Zhou, J. Yao, Y. Yang, T.L. Smith, D. Shi, D. Yu, *Cancer* 98 (6) (2003) 1123.
- [37] A.V. Biankin, J.G. Kench, A.L. Morey, C.S. Lee, S.A. Biankin, D.R. Head, T.B. Hugh, S.M. Henshall, R.L. Sutherland, *Cancer Res.* 61 (24) (2001) 8830.
- [38] V. Fortino, C. Torricelli, E. Capurro, G. Sacchi, G. Valacchi, E. Maioli, *Cancer Invest.* 26 (1) (2008) 13.
- [39] M. Maynadier, J.M. Ramirez, A.M. Cathiard, N. Platet, D. Gras, M. Gleizes, M.S. Sheikh, P. Nirde, M. Garcia, *FASEB J.* 22 (3) (2008) 671.
- [40] A.L. Gartel, S.K. Radhakrishnan, *Cancer Res.* 65 (10) (2005) 3980.
- [41] R.M. Neve, K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F.L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J.P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P.T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N.J. Wang, W.L. Kuo, J.L. Stilwell, D. Pinkel, D.G. Albertson, F.M. Waldman, F. McCormick, R.B. Dickson, M.D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar, J.W. Gray, *Cancer Cell* 10 (6) (2006) 515.
- [42] R. Pincheira, M. Baerwald, J.D. Dunbar, D.B. Donner, *EMBO J.* 28 (3) (2009) 261.
- [43] N. Billon, D. Carlisi, M.B. Datto, L.A. van Grunsven, A. Watt, X.F. Wang, B.B. Rudkin, *Oncogene* 18 (18) (1999) 2872.
- [44] A.L. Gartel, A.L. Tyner, *Mol. Cancer Ther.* 1 (8) (2002) 639.
- [45] H.V. Le, A.J. Minn, J. Massague, *J. Biol. Chem.* 280 (36) (2005) 32018.
- [46] N.F. Villeneuve, Z. Sun, W. Chen, D.D. Zhang, *Cell Cycle* 8 (20) (2009) 3255.
- [47] P.F. Vitiello, Y.C. Wu, R.J. Staversky, M.A. O'Reilly, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (1) (2009) 33.

RESULTATS

RESULTATS

TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES : LE CLIVAGE DE p75^{NTR} DANS LE CANCER DU SEIN

Dans les neurones, le récepteur p75^{NTR} subit une protéolyse appelée RIP pour *Regulated Intramembrane Proteolysis*. Cela consiste en un premier clivage du récepteur dans la partie juxtamembranaire extracellulaire par l'enzyme ADAM17/TACE. Ce clivage libère l'ectodomaine de p75^{NTR} pour laisser un fragment attaché à la membrane appelé p75^{NTR}-CTF. Ce fragment subit ensuite un deuxième clivage dans son domaine transmembranaire par la presenilin-1 qui fait partie du complexe γ -sécrétase. S'en suit la libération dans le cytoplasme de la partie intracellulaire du récepteur appelée p75^{NTR}-ICD et décrit comme ayant des capacités de signalisation (voir Introduction § II.A.3.b). Nous avons donc cherché, si dans les cellules cancéreuses mammaires, cette protéolyse de p75^{NTR} avait également lieu et si elle pouvait être impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par ce récepteur.

MATERIELS ET METHODES

Pour cette étude, les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 surexprimant de manière inducible le récepteur p75^{NTR} ont été utilisées (Voir article 1, Verbeke *et al.*, 2010, pour l'élaboration de cette lignée cellulaire). Brièvement, la surexpression de p75^{NTR} est induite par un traitement de 24h avec la Ponasterone A (PA), un analogue synthétique de l'ecdysone. Les cellules sont ensuite traitées avec des inhibiteurs pharmacologiques ou préalablement transfectées avec des siRNA afin d'analyser le clivage, la signalisation et l'effet de survie de p75^{NTR}.

❖ *Traitement des cellules avec les inhibiteurs pharmacologiques*

Après 24h d'induction à la PA, les cellules surexprimant p75^{NTR} sont prétraitées 1h avec des inhibiteurs pharmacologiques avant la récupération des protéines pour les analyses par Western blot ou avant l'induction de l'apoptose pour les tests de survie. Les inhibiteurs utilisés proviennent de chez Calbiochem® et sont les suivants :

- TAPI-1 (10 μ M) : inhibiteur des MMP et de l'enzyme ADAM17/TACE
- Composé E (1 μ M) : inhibiteur du complexe γ -sécrétase
- MG132 (5 μ M) : inhibiteur du protéasome
- LY294002 (10 μ M) : inhibiteur de la PI3-Kinase
- PD98059 (20 μ M) : inhibiteur de la MAP-kinase kinase MEK

❖ Séquences et transfection des siRNA

Les cellules MDA-MB-231 sont transfectées à l'aide du système de nucléofection Amaxa® (programme X-013, tampon V) selon le ratio suivant : 1.10^6 de cellules pour 5µM de siRNA. Les cellules sont ensuite remises en culture pendant 24h avant tout autre traitement. Les séquences des siRNA utilisés sont les suivantes :

- siRNA ADAM17 : 5'-GGAAGCUGACCUUGGUACAACUCAU-3'
- siRNA contrôle: 5'-GCUGACCCUGAAGUUCAUC-3'

Les tests de survie sont réalisés en induisant l'apoptose avec la cytokine TRAIL (4ng/ml, 4h) puis grâce à un marquage des noyaux aux Hoechst 33342 (1µg/ml). Après fixation des cellules au méthanol glacé (20min, -20°C), les noyaux apoptotiques sont comptés sous un microscope à fluorescence (Nikon). Un minimum de 500 cellules par condition sont examinées.

RESULTATS

Afin de détecter d'éventuels fragments de p75^{NTR}, nous avons réalisé des Western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie intracellulaire du récepteur (Figure 22). En plus de la forme pleine longueur de p75^{NTR} (75kDa), une bande de 25kDa correspondant au fragment p75^{NTR}-CTF est détectée dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant de manière dose-dépendante le récepteur (Figure 22A). Le fragment p75^{NTR}-ICD étant connu pour être rapidement dégradé, l'inhibiteur du protéasome MG132 a été utilisé. En présence de cet inhibiteur, une bande de 20kDa apparaît et l'ajout d'un inhibiteur du complexe γ-sécrétase (Composé E) empêche cette apparition signifiant la présence du fragment soluble de p75^{NTR}. Enfin, l'inhibition des métalloprotéases et d'ADAM17/TACE (TAPI-1) empêche les deux clivages de p75^{NTR} comme l'indique la disparition des 2 fragments (Figure 22B). Ces résultats montrent que p75^{NTR} subit deux clivages successifs dans les cellules cancéreuses mammaires à l'instar de ce qui est observé dans les neurones.

Le récepteur p75^{NTR} ayant une action anti-apoptotique dans le cancer du sein, nous avons regardé l'impact de ces clivages sur cet effet biologique. Pour cela, des tests de survie en présence des différents inhibiteurs utilisés préalablement (Composé E et TAPI-1) ont été réalisés (Figure 23). Les cellules surexprimant p75^{NTR} en absence d'inhibiteur ou en présence du composé E montrent une diminution significative du pourcentage de cellules apoptotiques témoignant de l'effet de survie du récepteur. En revanche, en présence du TAPI-1, le pourcentage d'apoptose est comparable dans les cellules contrôles et les cellules surexprimant p75^{NTR}. Ces résultats suggèrent un rôle prédominant du 1^{er} clivage dans l'effet de survie induit par p75^{NTR} puisque lorsqu'il est inhibé, la survie l'est aussi. Par

RESULTATS

contre le 2nd clivage, lui, ne semble pas être impliqué puisque son inhibition n'altère pas la survie induite par p75^{NTR}.

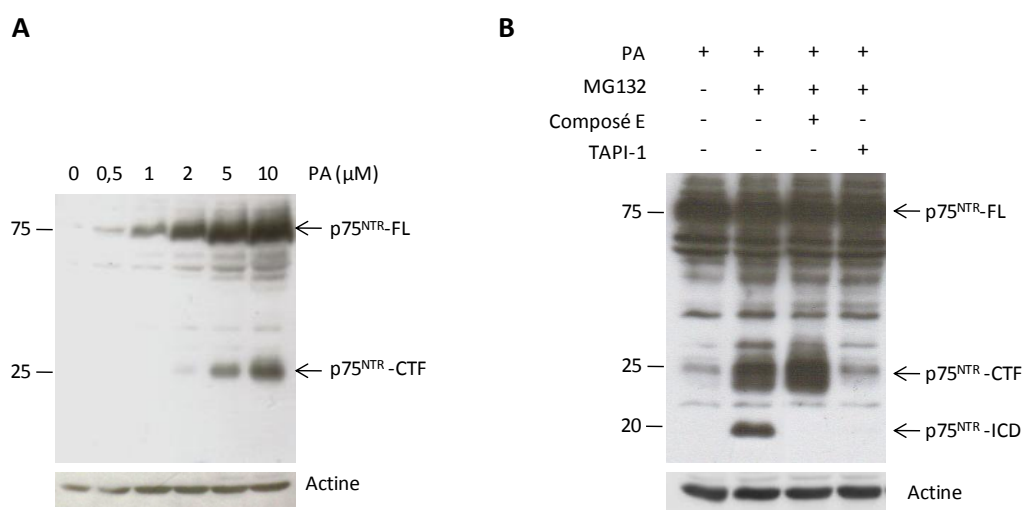


Figure 22 : Clivages de p75^{NTR} dans les cellules cancéreuses mammaires.

Western blot réalisés avec un anticorps dirigé contre la partie intracellulaire de p75^{NTR}. A, les cellules MDA-MB-231 inducibles sont traitées avec des doses croissantes de Ponasterone A (PA) pendant 24h avant la lyse cellulaire. B, les cellules MDA-MB-231 inducibles sont traitées avec 10μM de PA pendant 24h puis avec les différents inhibiteurs pharmacologiques pendant 1h avant la récupération des protéines. L'actine est utilisée comme marqueur d'équicharge.

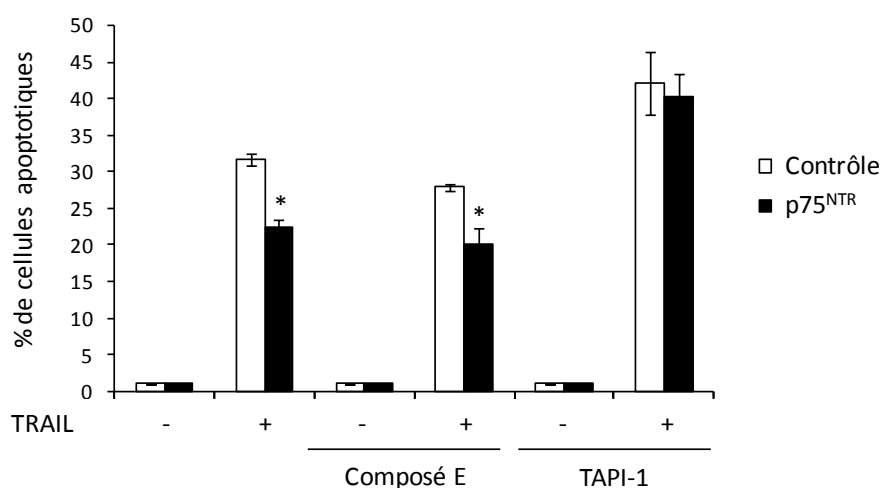


Figure 23: Le 1^{er} clivage de p75^{NTR} est nécessaire à son effet de survie.

Les cellules MDA-MB-231 induites avec 1μM de PA pendant 24h sont notées « p75^{NTR} ». Après une nuit de sevrage, les cellules surexprimant ou non p75^{NTR} sont prétraitées 1h avec le composé E ou le TAPI-1 puis 4h avec la cytokine TRAIL (4ng/ml) pour induire l'apoptose. Toutes les cellules sont ensuite récupérées et marquées au Hoechst afin de dénombrer le pourcentage de cellules apoptotiques. Expérience réalisée en duplicat, test de Student *p<0,001.

Afin de confirmer ces résultats et d'être plus spécifique, nous avons utilisé des siRNA dirigés contre ADAM17, l'enzyme responsable du 1^{er} clivage dans les neurones. L'efficacité du siRNA ADAM17 est vérifiée par Western blot (Figure 24A). En sa présence, la quantité globale d'ADAM17 est diminuée tout comme l'apparition du fragment p75^{NTR}-CTF signifiant que cette enzyme est également responsable du 1^{er} clivage de p75^{NTR} dans les cellules cancéreuses mammaires. Nous avons donc testés l'effet de ce siRNA sur la survie induite par p75^{NTR}. Les résultats obtenus avec le siRNA ADAM17 sont identiques à ceux obtenus avec l'inhibiteur TAPI-1, à savoir une inhibition de l'effet anti-apoptotique de p75^{NTR} (Figure 24B). On peut noter que dans les 2 cas, une augmentation globale de l'apoptose est observée sans qu'il n'y ait d'effet cytotoxique de l'inhibiteur ou du siRNA, suggérant une éventuelle inhibition de l'effet de survie du récepteur endogène.

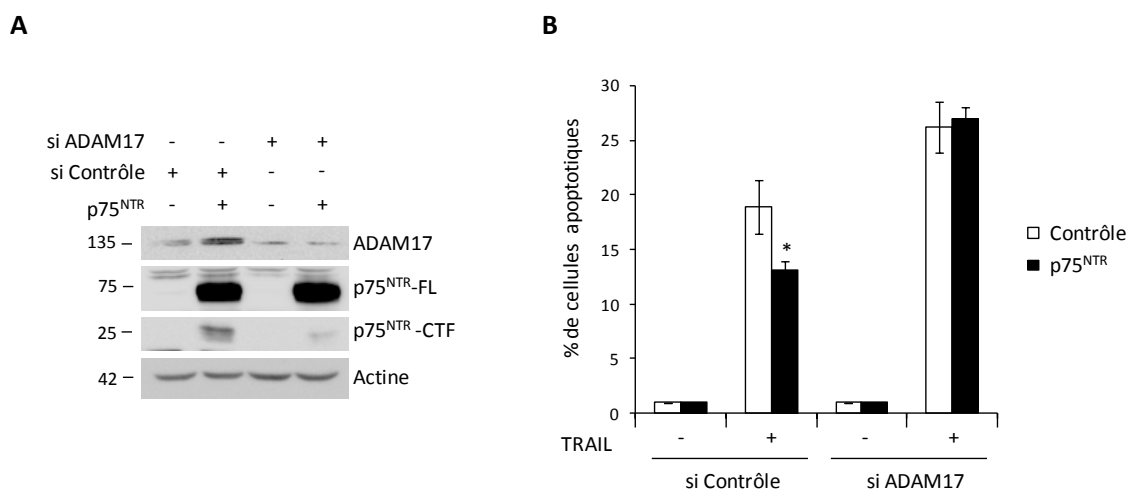


Figure 24 : L'invalidation d'ADAM17 inhibe la survie et le clivage de p75^{NTR}.

Les cellules MDA-MB-231 sont transfectées avec 5µM de siRNA puis induite avec 10µM de PA pendant 24h. Ensuite, les cellules sont soit lysées et les protéines sont analysées par Western blot (A), soit traitées avec la cytokine TRAIL pendant 4h avant d'être récupérées et marquées au Hoechst (B). Expérience réalisée en duplicat, test de Student *p<0,05.

Récemment, une équipe a montré que la voie des MAPK pouvait être impliquée dans le clivage de p75^{NTR} qui, une fois clivé, activerait la voie Akt pour induire l'arrêt du cycle des cellules PC12 (Ceni *et al.*, 2010). Nous avons donc testé une éventuelle implication de ces voies de signalisation sur le clivage et l'effet de survie induit par p75^{NTR} dans les cellules de cancer du sein. Pour cela, nous avons regardé la phosphorylation de Akt et de Erk dans les cellules surexprimant le récepteur et l'impact des inhibiteurs LY294002 et PD98059 sur son clivage et son effet anti-apoptotique (Figure 25). Le facteur de croissance HGF, connu pour induire la survie des cellules cancéreuses mammaires grâce à l'activation des voies PI3K/Akt et MAPK a été utilisé comme contrôle positif. L'analyse par Western

RESULTATS

blot de phospho-Akt et phospho-Erk montre que les cellules surexprimant p75^{NTR} activent très légèrement, comparativement au HGF, ces 2 voies de signalisation (Figure 25A). Néanmoins, l'inhibition de celles-ci par leurs inhibiteurs respectifs ne semble pas influencer le clivage de p75^{NTR} comme en témoigne la présence du fragment p75^{NTR}-CTF. De plus, en présence du LY294002 ou du PD98059, les cellules surexprimant p75^{NTR} sont toujours résistantes à l'apoptose alors que l'effet de survie du HGF est lui inhibé (Figure 25B). Ces résultats montrent que ni la voie PI3K/Akt, ni la voie des MAPK ne semble être impliquée dans le clivage et la survie due à p75^{NTR}.

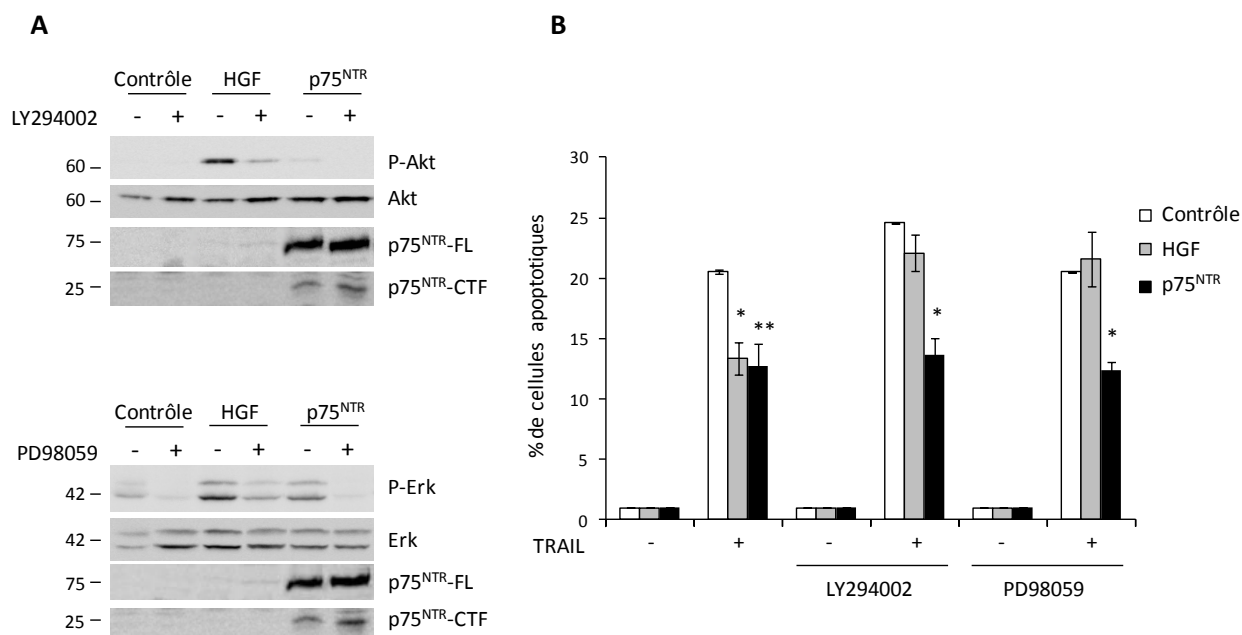


Figure 25 : Les voies PI3K/Akt et Erk ne sont pas impliquées dans le clivage et la survie de p75^{NTR}. Après 24h d'induction à la PA (10μM), les cellules sont prétraitées 1h avec le LY294002 ou le PD98059 avant l'extraction des protéines pour une analyse par Western blot (A) ou avant l'ajout de la cytokine TRAIL pour induire l'apoptose (B). Les cellules MDA-MB-231 traitées avec le HGF (30min, 25ng/ml) sont utilisées comme contrôle positif. Expérience réalisée en duplicat, test de Student *p<0,01 ; **p<0,02.

CONCLUSION/DISCUSSION

Ces travaux supplémentaires ont permis, non seulement, de mettre en évidence une protéolyse de p75^{NTR} dans les cellules cancéreuses mammaires mais aussi son rôle dans l'effet anti-apoptotique de ce récepteur. En effet, à l'image de ce qui est observé dans les neurones, p75^{NTR} semble subir, dans les cellules de cancer du sein, la même protéolyse consistant en un 1^{er} clivage par l'enzyme ADAM17/TACE suivi d'un 2nd clivage par le complexe γ-sécrétase. L'étude de leurs implications dans l'effet de survie du récepteur a permis de montrer que le 1^{er} clivage est indispensable à cet effet alors que le 2nd ne semble pas impliqué. Peu d'études décrivent un rôle propre à ce fragment p75^{NTR}-CTF

issu du 1^{er} clivage. Il est généralement considéré comme une étape intermédiaire conduisant au 2nd clivage qui lui va aboutir au fragment soluble ayant une capacité de signalisation. Cependant, nos résultats suggèrent plutôt que c'est le 1^{er} fragment ancré à la membrane qui permet la survie cellulaire. Un mécanisme similaire a été décrit dans les neurones sensoriels où suite au 1^{er} clivage, le fragment p75^{NTR}-CTF est transloqué dans les domaines riches en cholestérol où il induit dans ce modèle, la mort neuronale. Le 2nd clivage par le complexe γ -sécrétase quant à lui, permettrait de stopper ce signal de mort (Underwood *et al.*, 2008). A ce stade de nos travaux, il est prématuré de conclure à un tel mécanisme, néanmoins, il serait intéressant de confirmer le rôle exact de chaque fragment à l'aide de récepteurs p75^{NTR} non clivables et/ou de construits « mimant » chaque fragment.

Nos résultats préliminaires montrent également que les voies PI3K/Akt et Erk MAPK n'interviennent ni dans le clivage de p75^{NTR}, ni dans son effet anti-apoptotique. Aussi la recherche d'autres voies de signalisation menant à cette protéolyse ou étant activées suite aux clivages du récepteur permettrait d'éclaircir les mécanismes associés à celui-ci. Il serait notamment intéressant d'étudier le rôle de la voie NF κ B dans le clivage de p75^{NTR} (et *vice versa*) puisque celle-ci est activée lors de la survie induite par le récepteur dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Descamps *et al.*, 2001b). De même, une activation biphasique de la voie JNK permet à p75^{NTR} d'autoréguler son clivage dans les neurones sympathiques (Kenchappa *et al.*, 2010). Bien que dans de nombreux modèles, la voie JNK induise la mort cellulaire, celle-ci peut également être associée à la survie, elle constitue donc une piste à explorer.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

POUVOIR PRO-TUMORAL DE p75^{NTR} DANS LE CANCER DU SEIN

Les données précédemment décrites montrent une action pro-tumorale des neurotrophines dans le cancer du sein *via* notamment un effet anti-apoptotique du récepteur p75^{NTR}. A travers mes travaux de thèse, je me suis appliquée à préciser le rôle de ce récepteur et sa signalisation dans le cancer du sein. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur un modèle cellulaire utilisé dans de nombreuses études et donc bien caractérisé : la lignée de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Bien que ces cellules soient considérées comme une lignée prototypique hormono-insensible du cancer du sein, elles n'expriment que faiblement le récepteur p75^{NTR} (environ 50x moins) en comparaison aux biopsies tumorales (Descamps *et al.*, 2001a). Nous avons donc établi une lignée de cellules cancéreuses mammaires inductibles permettant une surexpression dosée de p75^{NTR}. Ce modèle de choix a permis d'approfondir la signalisation anti-apoptotique de ce récepteur. Ainsi, en accord avec les travaux précédemment réalisés dans notre laboratoire sur la lignée MCF-7, la surexpression de p75^{NTR} augmente considérablement la résistance des cellules à divers apoptogènes tels que la doxorubicine, la cytokine TRAIL et le céramide C2. Cette résistance est caractérisée par une augmentation de la protéine anti-apoptotique c-IAP1, une inhibition du relargage du cytochrome C et une diminution du clivage de PARP et des procaspases 3 et 9 sans affecter celui de la procaspase 8 et de Bid. Ces données suggèrent une régulation de la voie intrinsèque (ou mitochondriale) de l'apoptose par p75^{NTR}. Nos travaux ont montré que la surexpression de ce récepteur s'accompagnait également d'un ralentissement de la prolifération dû à une accumulation des cellules en phases G0/G1 du cycle cellulaire. Cet effet a déjà été reporté dans d'autres cancers tels que ceux de la prostate (Khawaja *et al.*, 2006), de la vessie (Khawaja et Djakiew, 2003), du foie (Yuanlong *et al.*, 2008) et de l'estomac (Jin *et al.*, 2007b). Dans ces cancers, le ralentissement de la prolifération est associé à une diminution de phospho-Rb et des cyclines A, D1 et E et à une augmentation des inhibiteurs p16^{INK4a} ou p27^{Kip1}. Dans le cancer du sein, bien que l'effet soit le même, le mécanisme semble différent puisque seule la diminution de phospho-Rb est retrouvée, l'expression des autres protéines (cyclines, p16^{INK4a} et p27^{Kip1}) n'étant pas modifiées. En revanche, une augmentation de l'ARNm et de la protéine p21^{Waf1} est systématiquement observée. Cette régulation de p21^{Waf1} a déjà été reportée sous l'action du NGF. En effet, dans les cellules de rat PC12, le NGF permet une coopération entre la protéine Sp1 et son co-facteur p300 pour induire la transcription de p21^{Waf1} conduisant à l'arrêt du cycle et la différenciation neuronale (Billon *et al.*, 1999). Dans les mêmes cellules, le NGF peut induire la transcription de p21^{Waf1} *via* p53 ce qui aboutit à une inhibition de l'apoptose (Brynczka et Merrick, 2007). L'activation du facteur de transcription AP1 par le NGF a également été reportée comme participant à la transcription de p21^{Waf1} dans les cellules de neuroblastomes (Diolaiti *et al.*, 2007). Enfin, plus récemment, un lien direct entre p75^{NTR} et p21^{Waf1} a été décrit grâce au facteur de

transcription Sall2 qui s'avèrent être un adaptateur de p75^{NTR} qui, sous l'action du NGF, est transloqué dans le noyau pour induire p21^{Waf1} et l'arrêt du cycle cellulaire (Pincheira *et al.*, 2009). A l'exception de p53 qui n'est pas fonctionnel dans les MDA-MB-231, ces différents facteurs de transcription potentiellement activés par p75^{NTR} sont donc autant d'hypothèses à vérifier pour expliquer la régulation de p21^{Waf1}.

L'augmentation de p21^{Waf1} par p75^{NTR} est d'autant plus intéressante que son inhibition abolit le retard de croissance mais aussi l'effet de survie induit par le récepteur, faisant de p21^{Waf1} une protéine clef dans la signalisation de p75^{NTR}. Si le lien entre p21^{Waf1} et le cycle cellulaire est évident, celui avec la régulation de l'apoptose est moins connu. Néanmoins quelques mécanismes ont été décrits tels qu'une interaction directe entre p21^{Waf1} et la kinase Ask1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) ou la procaspase 3. En effet, dans les monocytes, la protéine p21^{Waf1} induit l'arrêt du cycle cellulaire lorsqu'elle est nucléaire alors qu'une fois dans le cytoplasme celle-ci peut se fixer à Ask1 pour inhiber l'apoptose (Asada *et al.*, 1999). Par ailleurs, Ask1 induit l'apoptose *via* la voie intrinsèque en favorisant le relargage du cytochrome c et les clivages des procaspases 9 et 3 (Hatai *et al.*, 2000). Au vu de ces données, l'hypothèse d'une inhibition de la voie Ask1 par le duo p75^{NTR}/p21^{Waf1} est tout à fait envisageable. La protéine p21^{Waf1} régule également l'apoptose en interagissant directement avec la procaspase 3 inhibant ainsi son clivage et l'apoptose induite par Fas dans les cellules cancéreuses hépatiques (Suzuki *et al.*, 1999a). La formation de ce complexe nécessiterait l'intervention de la mitochondrie et la phosphorylation de p21^{Waf1} par la PKA (Suzuki *et al.*, 1999b; Suzuki *et al.*, 2000). Après des expériences d'immunoprécipitations, nous n'avons néanmoins pas pu observer d'interactions entre p21^{Waf1} et la procaspase 3 dans les cellules cancéreuses mammaires (Données non présentées). Enfin, p21^{Waf1} inhibe l'apoptose dans les cellules du cancer de la prostate grâce à une interaction inhibitrice avec la CDK1 (*Cyclin-Dependent Kinase 1*) (Canfield *et al.*, 2006) ou encore en stabilisant la protéine c-IAP1 dans les cellules leucémiques (Steinman et Johnson, 2000).

Ainsi, le récepteur p75^{NTR}, par l'intermédiaire de p21^{Waf1} est à la fois capable de ralentir la prolifération et de favoriser la survie cellulaire, deux effets qui semblent *a priori* opposés puisque l'un est considéré comme anti-tumoral et l'autre pro-tumoral, respectivement. Cependant, plusieurs études associent ces deux effets. C'est le cas dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et dans les cellules HCT116 de cancers colorectaux où l'induction de p21^{Waf1} permet l'arrêt du cycle cellulaire et la survie des cellules (Fortino *et al.*, 2008; Le *et al.*, 2005). De la même manière, un traitement des précurseurs de la peau (*SKP, Skin-derived precursor*) avec la NT3 et l'acide rétinoïque augmente la quantité protéique de p75^{NTR} et de p21^{Waf1} pour aboutir à un ralentissement de la croissance permettant la différenciation et la survie des cellules (Zhang *et al.*, 2009). Ainsi, un nombre croissant de travaux montre qu'en ralentissant le cycle cellulaire, la protéine p21^{Waf1} permet aux cellules de

faire une pause afin de réparer leur ADN endommagé et est, à ce titre, considérée comme une potentielle cible thérapeutique dans certain cancer comme celui du sein (Fan *et al.*, 2003; Gartel et Tyner, 2002; Weiss, 2003). Le récepteur p75^{NTR}, en augmentant p21^{Waf1}, réduit donc considérablement l'efficacité des agents anticancéreux comme le montre nos expériences de xénogreffes menées *in vivo*.

Le récepteur p75^{NTR}, qui ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque, agit en recrutant des partenaires protéiques qui vont induire différentes signalisations selon le contexte cellulaire. Cependant, l'activité de ce récepteur peut également être modulé par ce qui est appelé la RIP pour *Regulated Intramembrane Proteolysis*. Nos travaux supplémentaires ont montré que p75^{NTR} subissait cette même protéolyse dans les cellules cancéreuses mammaires à l'image de ce qui est décrit dans les neurones. De plus, ces clivages successifs semblent être impliqués dans l'effet anti-apoptotique du récepteur. Bien que nos données suggèrent un rôle prédominant du fragment p75^{NTR}-CTF issu du 1^{er} clivage par l'enzyme ADAM17/TACE, on ne peut exclure un rôle potentiel du fragment soluble p75^{NTR}-ICD. Il est vrai que sa détection n'est possible qu'en présence d'un inhibiteur de protéasome ce qui suggèrent plutôt un processus de dégradation du récepteur. Cependant, malgré sa rapide dégradation, ce fragment soluble est largement décrit comme ayant des capacités de signalisation grâce à sa translocation nucléaire, notamment avec NRIF ou TRAF6 (Kanning *et al.*, 2003; Kenchappa *et al.*, 2006). Il a également été reporté que le fragment p75^{NTR}-ICD pouvait se fixer directement sur le promoteur de la cycline E1 pour le réprimer (Parkhurst *et al.*, 2010). Il serait donc intéressant d'étudier la localisation de ce fragment dans les cellules cancéreuses mammaires. De plus, la surexpression de p21^{Waf1} par p75^{NTR} étant indispensable à son effet anti-apoptotique, on peut supposer un lien entre la protéolyse du récepteur et la régulation de cette protéine. Des investigations en ce sens permettraient d'éclaircir le mécanisme d'action global du récepteur p75^{NTR}. D'un point de vue plus appliqué, l'étude du clivage présente un certain intérêt thérapeutique. Dans les gliomes par exemple, où la protéolyse de p75^{NTR} est indispensable à son effet sur l'invasion, la γ -sécrétase est présentée comme une cible thérapeutique intéressante. En effet, l'expression de p75^{NTR} non clivable ou l'utilisation d'un inhibiteur de la γ -sécrétase chez des souris xénogreffées permet de diminuer l'invasion des gliomes et prolonge la survie des animaux (Wang *et al.*, 2008). Dans le cancer du sein, nous montrons que le 1^{er} clivage par l'ADAM17/TACE est indispensable à l'effet de survie du récepteur. De plus, ADAM17/TACE est surexprimée dans ce cancer et est associé à un mauvais pronostic (Mcgowan *et al.*, 2007; McGowan *et al.*, 2008). Des études comparables à celles réalisées pour les gliomes pourraient donc placer l'enzyme ADAM17/TACE comme une éventuelle cible thérapeutique, son inhibition dans le cancer du sein permettant de contrecarrer les effets imputés à p75^{NTR}.

ACTIVATION CONSTITUTIVE DE p75^{NTR} ?

Les effets biologiques reportés dans ces travaux ont tous été observés en absence de ligands exogènes suggérant une activation « spontanée » de p75^{NTR} dans notre modèle de surexpression inducible. Ce phénomène avait déjà été observé dans des cellules élaborées au laboratoire surexprimant de manière stable le récepteur TrkA. Cependant, il est connu que la surexpression de TrkA conduit à son autophosphorylation et à l'activation constitutive des voies PI3K/Akt et MAPK (Leoni et Valtorta, 2002). Le récepteur p75^{NTR} n'ayant pas d'activité kinase intrinsèque, son activation ne peut donc pas être attribuée à une autophosphorylation. Cependant plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Tout d'abord notre laboratoire a montré l'existence d'une boucle autocrine de NGF dans le cancer du sein (Dolle *et al.*, 2003). En effet, les cellules cancéreuses mammaires expriment et sécrètent le NGF qui, *via* p75^{NTR}, inhibe l'apoptose. De plus, d'autres travaux plus récents (Vanhecke *et al.*, 2010, article en annexe) montrent que les neurotrophines BDNF et NT4/5 peuvent, elles aussi, être sécrétées par les cellules de cancer du sein et favorisées leurs survies *via* p75^{NTR}. Deux nouvelles boucles autocrines viennent donc s'ajouter à celle du NGF, ce qui peut expliquer que l'ajout de neurotrophines exogènes n'ait pas d'effet supplémentaire sur la survie induite par le récepteur. L'activation de p75^{NTR} serait donc à son niveau maximum. Si l'on considère que les effets observés sont dus à l'activation de p75^{NTR} par les neurotrophines endogènes, on peut alors se poser la question de l'action de p75^{NTR} en absence de ligand. Ce récepteur est effectivement décrit comme appartenant à la famille des récepteurs dits « à dépendance ». Dans ce concept, la liaison du ligand sur son récepteur induit une signalisation « positive » telle que la survie alors que l'absence de ligand induit une signalisation « négative » telle que l'apoptose (Mehlen et Bredesen, 2003). Selon ce concept, l'inhibition des neurotrophines dans les cellules cancéreuses mammaires pourrait donc conduire à leur mort cellulaire. Rappelons que l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre le NGF, le BDNF et la NT4/5 dans des modèles de xénogreffes chez la souris permet d'inhiber la croissance tumorale et qu'une analyse par TUNEL montre que cette inhibition est corrélée à une augmentation de l'apoptose (Adriaenssens *et al.*, 2008) (Vanhecke *et al.*, 2010, article en annexe).

L'observation d'effets biologiques en absence de ligands peut également s'expliquer par une éventuelle multimérisation spontanée de p75^{NTR} due à la forte concentration de récepteur à la surface cellulaire. Dans la mesure où sa dimérisation semble nécessaire à sa signalisation (voir § II.B.3), l'augmentation de la population du récepteur dans les cellules peut conduire à un rapprochement physique des monomères. De la même manière, les cellules cancéreuses mammaires expriment les récepteurs TrkA et TrkB-T1, tous deux impliqués dans la survie cellulaire (Lagadec *et al.*, 2009) (Vanhecke *et al.*, 2010, article en annexe). Même si p75^{NTR} est capable d'agir

indépendamment, on ne peut exclure une collaboration avec ces corécepteurs qui serait facilitée par sa forte concentration. En effet, comme nous l'avons déjà vu, dans de nombreux modèles, p75^{NTR} et les récepteurs Trk peuvent interagir directement en formant des hétérodimères ou par le biais de leurs signalisations. La modification stœchiométrique engendrée par la surexpression de p75^{NTR} pourrait donc conduire à la formation d'hétérodimères actifs capables de signaler en absence de ligands. Des co-immunoprécipitations et l'invalidation des récepteurs TrkA et TrkB-T1 dans les cellules surexprimant p75^{NTR} permettrait d'éclaircir la contribution apportée ou non par chacun de ces corécepteurs.

Enfin, comme nous l'avons vu, p75^{NTR} est clivé dans notre modèle cellulaire et la question du facteur déclencheur de ce clivage se pose. La boucle autocrine des neurotrophines suffit-elle à activer la protéolyse de p75^{NTR} ou s'agit-il d'un clivage constitutif ligand-indépendant ? La plupart des études sur ce sujet sont faites sur des modèles de surexpression dans des types cellulaires très différents (PC12, HEK293, neurones, cellules de Schwann...). Si le mécanisme global du clivage de p75^{NTR} semble être commun à tous ces travaux, l'intervention d'un ligand est en revanche moins évidente. L'équipe de Kanning, qui fut l'un des premiers à montrer l'importance du clivage de p75^{NTR} dans sa signalisation, a testé l'effet de plusieurs neurotrophines (NT3, proNGF et NGF, proBDNF et BDNF) et aucune d'entre elles ne potentialise ou n'inhibe le clivage du récepteur (Kanning *et al.*, 2003). Au contraire, dans d'autres études, l'ajout de NGF ou de BDNF est nécessaire pour déclencher la protéolyse et la signalisation de p75^{NTR} (Ceni *et al.*, 2010; Kenchappa *et al.*, 2010). L'utilisation d'anticorps bloquants ou l'invalidation des neurotrophines dans nos cellules permettrait d'éclaircir ce point. Il faudrait toutefois inhiber simultanément le NGF, le BDNF et la NT4/5 afin d'éviter d'éventuels effets de compensation. De plus, il est possible que la surexpression du récepteur favorise sa colocalisation avec les enzymes nécessaires au clivage. Aussi, il serait judicieux de vérifier la présence des différents fragments de p75^{NTR} dans les cellules natives ne surexprimant pas le récepteur afin de s'assurer de la relevance physiologique de ce mécanisme.

p75^{NTR}, CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LE CANCER DU SEIN ?

Les thérapies actuelles, bien qu'efficaces, sont malheureusement soit agressives (chirurgie, chimiothérapie), soit restreintes à une faible proportion de malades exprimant certaines cibles moléculaires (récepteur hormonaux, HER2...). De plus, elles sont confrontées à une résistance intrinsèque ou acquise des cellules cancéreuses qui limite leur efficacité. Contrecarrer ces phénomènes de résistance fait donc partie des enjeux majeurs dans la recherche de nouvelles thérapies. Dans ce contexte, le récepteur p75^{NTR} peut représenter une cible intéressante puisqu'il relaye le message anti-apoptotique de toutes les neurotrophines. De plus, l'utilisation d'anticorps

bloquants dirigés contre le NGF, le BDNF et la NT4/5 dans des modèles de xénogreffes chez la souris permet d'inhiber la croissance tumorale en augmentant l'apoptose au sein des tumeurs. A l'image d'autres thérapies actuelles, on pourrait donc imaginer un anticorps antagoniste neutralisant les sites de liaisons des neurotrophines sur p75^{NTR}. Une telle stratégie aurait l'avantage de cibler l'ensemble des neurotrophines avec un seul anticorps limitant ainsi de potentiels effets cytotoxiques. De plus, nos résultats *in vitro* montrent qu'une inhibition spécifique de p75^{NTR} par siRNA permet de sensibiliser les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF-7 à l'apoptogène TRAIL. De la même manière, le récepteur p75^{NTR} permet *in vivo* de protéger les tumeurs traitées avec du TRAIL. Sachant que des molécules visant la voie TRAIL sont actuellement en essais cliniques, combiner un traitement anti-p75^{NTR} à de telles molécules pourrait donc en améliorer l'efficacité. A ce titre, l'inhibiteur de p75^{NTR} nommé Pep5 peut s'avérer intéressant. Il s'agit d'un peptide de 15 acides aminés isolés à partir d'une librairie de peptides synthétiques capable de se fixer au domaine intracellulaire de p75^{NTR}. Une analyse par résonance magnétique nucléaire a permis d'identifier le site de liaison dans une zone hydrophobe située entre les hélices 5 et 6 du domaine de mort du récepteur (Ilag *et al.*, 1999). Dans les neurones, cet inhibiteur Pep5 empêche la protéine Rho-GDI de se fixer à p75^{NTR}, inhibant ainsi l'activation de RhoA ce qui favorise la croissance des neurites (Yamashita et Tohyama, 2003). Plus récemment, les effets de cet inhibiteur ont été testés dans les cellules cancéreuses mammaires en combinaison avec le Tamoxifen ou le Taxol, deux drogues anticancéreuses couramment utilisées dans le traitement des cancers du sein. Les auteurs montrent une action synergique de Pep5 avec l'activité pro-apoptotique du Tamoxifen et du Taxol dans les lignées cancéreuses MCF-7 et T47-D (Naderi et Hughes-Davies, 2009). L'utilisation d'un tel inhibiteur ciblant le récepteur p75^{NTR} permet donc d'augmenter l'apoptose induite par les drogues anticancéreuses dans les cellules cancéreuses mammaires. Des études plus approfondies à l'aide d'un échantillonnage plus grand de cellules et d'apoptogènes sont évidemment nécessaires ainsi que des études précliniques chez l'animal qui permettraient de vérifier la biodisponibilité et la toxicité d'un tel traitement. Néanmoins, au vue de données existantes et des résultats présentés dans cette thèse, le récepteur p75^{NTR} s'avère être une cible thérapeutique intéressante dans le cancer du sein.

Un autre aspect intéressant associé au récepteur p75^{NTR} a été soulevé dans les cancers de l'œsophage. Dans ces cancers, les cellules exprimant p75^{NTR} montrent des capacités d'auto-renouvellement, de formation de sphères et de résistance accrue aux drogues, trois caractéristiques majeures des cellules souches cancéreuses (Huang *et al.*, 2009). Sachant que dans le cancer du sein, p75^{NTR} est déjà associé à une résistance à l'apoptose, il serait intéressant d'étudier son effet sur ces deux autres caractéristiques. De plus, les cellules souches cancéreuses mammaires sont définies par le phénotype moléculaire CD44⁺/CD24^{-low} rendant possible leur sélection par FACS (Ponti *et al.*, 2005). Aussi, l'étude de l'expression de p75^{NTR} dans une telle population permettrait d'ouvrir de

nouveaux axes de recherches quant à l'implication de ce récepteur dans le développement du cancer du sein.

Pour conclure, les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'éclaircir les mécanismes associés au récepteur p75^{NTR} dans les cellules cancéreuses mammaires et soulignent l'importance de son action pro-tumorale *in vivo*. De nombreuses questions restent évidemment en suspens quant au rôle de ces corécepteurs ou des neurotrophines dans les effets observés ; p75^{NTR} interagit-il avec TrkA, TrkB-T1 ou la sortiline, tous trois exprimés dans les cellules de cancer du sein ? Ces éventuelles interactions se traduiront-elles par une synergie de leurs effets ou par un remaniement complet de leur mode de fonctionnement ? Quel est l'apport de chaque neurotrophine dans la signalisation de p75^{NTR} et son clivage ?

D'autre part, le NGF produit par les cellules cancéreuses mammaires a une action paracrine sur les cellules endothéliales (Romon *et al.*, 2010) et le récepteur p75^{NTR} est également exprimé dans les cellules myoépithéliales (Popnikolov *et al.*, 2005). Aussi, ce récepteur, en plus de son action sur les cellules épithéliales du cancer du sein, pourrait avoir une influence sur le microenvironnement tumoral. Enfin, à l'image de ce qui est décrit dans les cancers de l'œsophage, p75^{NTR} pourrait agir sur les cellules souches cancéreuses et ainsi jouer un rôle dans le développement du cancer du sein.

Toutes ces questions/hypothèses ouvrent un large champ d'investigation afin de mieux appréhender le rôle du récepteur p75^{NTR} dans le cancer du sein et bien que des études approfondies soient nécessaires, les travaux présentés ici constituent la base de futurs projets prometteurs qui pourraient à terme faire de p75^{NTR} une cible thérapeutique potentielle dans cette pathologie.

ANNEXE

Article 2

BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR AND NEUROTROPHIN-4/5 STIMULATE BREAST CANCER CELL SURVIVAL THROUGH AN AUTOCRINE LOOP MEDIATED BY p75^{NTR} AND TRKB-T1

Ces travaux, auxquels j'ai collaboré, montrent que les neurotrophines BDNF et NT4/5 contribuent à la progression du cancer du sein en conférant aux cellules cancéreuses une résistance à l'apoptose. En effet, les lignées cellulaires cancéreuses mammaires ainsi que les cellules épithéliales issues de biopsies tumorales de sein expriment le BDNF, la NT4/5 et leurs récepteurs communs p75^{NTR}. La forme tronquée de TrkB, TrkB-T1, a également été détectée alors que le récepteur entier n'est, lui, pas exprimé. Enfin, l'effet de survie du BDNF et de la NT4/5 passe par la stimulation de ces 2 récepteurs p75^{NTR} et TrkB-T1 et contribue à la croissance tumorale *in vivo*.

Ces résultats sont soumis pour publication dans le journal *Clinical Cancer Research*.

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

Elsa Vanhecke¹, Eric Adriaenssens¹, Stéphanie Verbeke¹, Samuel Meignan¹, Emmanuelle Germain¹,
Nathalie Berteaux², Victor Nurcombe³, Xuefen Le Bourhis¹ and Hubert Hondermarck^{1,*}

¹INSERM U 908 "Growth factor signaling in breast cancer cells. Functional proteomics", IFR-147,
University of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

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

³Institute of Medical Biology, A*STAR Institute, Biopolis drive,
Singapore 138673.

Running title: BDNF and NT-4/5 promote breast tumor growth.

Financial support: This study was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée 2009), le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et la Région Nord/Pas-de-Calais. E.V. was the recipient of a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

* **Correspondence to:** H. Hondermarck, INSERM U 908, bâtiment SN3, University of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Phone: +33 (0)3 20434097. Fax: +33 (0)3 20434038 Email: hubert.hondermarck@univ-lille1.fr

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

TRANSLATIONAL RELEVANCE

The identification of new molecular markers and targets is crucial for the development of better targeted treatments for breast cancer. To date, the effort to design such treatments have been limited by the molecular and cellular heterogeneity of breast tumors. The two clinically validated molecular targets currently used for this pathology, the estrogen receptors and the tyrosine kinase receptor ErbB2, have a restricted spectrum of use; thus the discovery of new targets in breast cancer constitutes a major objective. Here we show that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-4/5 (NT-4/5) are expressed in breast tumors, promote breast cancer cell survival through p75^{NTR} and TrkB-T1, and can be targeted to inhibit tumor growth. Thus, the assaying and targeting of these neurotrophins in breast cancer may have clinical ramifications.

ABSTRACT

Purpose: Given that nerve growth factor has previously been shown to be involved in breast cancer progression, we have tested here the hypothesis that the other neurotrophins (NT) are expressed and have an influence in breast tumor growth.

Experimental design: The expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), NT-3 and NT-4/5, as well as the neurotrophin receptor p75^{NTR}, TrkB and TrkC, was studied by RT-PCR, Western-blotting and immunohistochemistry in cell lines and tumor biopsies. The biological impacts of neurotrophins, and associated mechanisms, were analyzed in cell cultures and xenografted mice.

Results: BDNF and NT-4/5 were expressed and secreted by breast cancer cells, and the use of blocking antibodies suggested an autocrine loop mediating cell resistance to apoptosis. The corresponding tyrosine kinase receptor TrkB was only rarely observed at full length, whereas the expression of TrkB-T1, lacking the kinase domain, as well as p75^{NTR}, were detected in all tested breast cancer cell lines and tumor biopsies. In contrast, NT-3 and TrkC were not detected. SiRNA against p75^{NTR} and TrkB-T1 abolished the anti-apoptotic effect of BDNF and NT-4/5, whereas the pharmacological inhibitors K252a and PD98059 had no effect, suggesting the involvement of p75^{NTR} and TrkB-T1, but not of kinase activities from Trks and MAPK. In xenografted mice, anti-BDNF or anti-NT-4/5 treatments resulted in tumor growth inhibition, characterized by an increase in cell apoptosis, but with no change in proliferation.

Conclusion: BDNF and NT-4/5 contribute to breast cancer cell survival and can serve as prospective targets in attempts to inhibit tumor growth.

INTRODUCTION

The neurotrophins constitute a family of structurally and functionally related polypeptides including the prototypic nerve growth factor (NGF), as well as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) and neurotrophin 4/5 (NT-4/5). They are primarily known for their crucial roles in the development and maintenance of the nervous system, where they stimulate neuronal cell survival, differentiation and plasticity (1). Neurotrophin activities are mediated through two classes of cell surface receptors: the Trk tyrosine kinase receptors and the neurotrophin receptor $p75^{NTR}$, the latter a member of the Tumor Necrosis Factor-receptor superfamily (2). NGF preferentially binds TrkA, whereas BDNF and NT-4/5 bind TrkB; NT-3 primarily binds TrkC, but also TrkA and TrkB to a lesser extent (3). In contrast, all neurotrophins bind and activate $p75^{NTR}$. Interestingly, non neuronal cells can also respond to neurotrophins, in both healthy tissues and disease states; in addition to their involvement in neuroblastomas and glioblastomas, several studies have suggested a role for neurotrophins and their receptors in non neuronal cancers (4, 5). Indications that neurotrophins and their receptors can participate in tumorigenesis include data from Wilm's tumors (6), medullary thyroid carcinoma (7), prostatic cancer (8, 9), melanoma (10), myeloma (11), as well as pancreatic (12, 13), ovarian (14) and hepatocellular (15) carcinomas. Nevertheless, these data appear fragmentary, and no comprehensive picture has been established for the involvement of all neurotrophin family members in a defined type of cancer.

In breast cancer, it has previously been shown that NGF is able to stimulate the proliferation and survival of breast tumor cells through the activation of TrkA and $p75^{NTR}$ respectively (16-19). In addition, NGF cooperates with HER2 to activate breast cancer cell growth (20) and the anti-estrogen drug tamoxifen, which is widely used in breast cancer therapy, is able to inhibit the mitogenic effect of NGF (21). In addition, repression of SHP-1 phosphatase expression by p53 leads to TrkA tyrosine phosphorylation and the suppression of breast cancer cell proliferation (22). Given the TrkA and $p75^{NTR}$ expression in breast tumors (23-25), the demonstration that NGF is overexpressed in the majority of human breast tumors and that its inhibition results in diminished tumor growth in

preclinical models, pointed to the potential value of NGF as a therapeutic target (26). With regard to the other neurotrophins, although it has previously been shown that exogenously added BDNF, NT-4/5 or NT-3 can produce anti-apoptotic effects on breast cancer cells *in vitro* (16), no studies have systematically investigated the expression of these neurotrophins and their associated receptors in breast cancer cells or their potential subsequent impact on tumor growth.

Here, we report for the first time that BDNF and NT-4/5 are both expressed and secreted by breast cancer cells. An autocrine stimulation loop of BDNF and NT-4/5, mediated through p75^{NTR} and TrkB-T1, a variant form of TrkB lacking the kinase domain, was found to be involved in tumor cell survival. These results indicate that BDNF and NT-4/5 directly contribute to breast cancer progression.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Cell culture reagents were purchased from BioWhittaker except foetal bovine serum (Perbio), culture medium (Cambrex), fibronectin (Falcon-Biocoat), insulin and transferrin (Sigma). The flasks and Petri dishes were obtained from Starstedt (Fisher-Scientific). Recombinant human neurotrophins, Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) were from R & D Systems. Ceramide C2 was from Sigma. Antibodies used for immunostaining were rabbit polyclonal anti-BDNF, anti-NT-3, anti-NT-4/5, anti-TrkB and anti-TrkC from Santa Cruz Biotechnology, p75^{NTR} antibody from Promega, anti-actin from Sigma, and secondary antibodies from Jackson laboratories. ECL reagents were obtained from Pierce Interchim. Neutralizing anti- NT-4/5 and BDNF antibodies were from R&D systems. K252a and PD98059 were obtained from Calbiochem. RNA and histological slides of breast tumor biopsies were from CliniSciences. Hoechst 33342, electrophoresis reagents and chemicals were from Sigma, solvent from Fluka and Glycergel from Dako. DNase and Retro-Transcription reagents were from Invitrogen (Fisher-Scientific) and the Quantitect SYBR®Green PCR kit, used for real time PCR, was obtained from Qiagen. Primers for BDNF, NT-3,

NT-4/5, p75^{NTR}, TrkB, TrkB-T1, TrkB-T-shc and RPLP0 were from Eurogentec, primers for TrkC from Qiagen. Molecular weight standards were obtained from Fermentas.

Cell culture. The human breast epithelial cell lines (MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, BT-20 and MCF-10A) and the human neural precursor cells NTERA-2 cl.D1 (NT2/D1) derived from the NT-2 teratocarcinoma were obtained from the American Type Culture Collection. The Human Mammary Epithelial cells (HMEC) were from Cambrex. MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, BT-20, MCF-10A, were routinely grown in monolayer cultures as described previously (17). HMEC and NT2/D1 were grown in conditions given by the supplier. To obtain conditioned media, MCF-7, MDA-MB-231 and HMEC were plated in 175 cm² flasks. When they reached confluence, they were washed and incubated in basal medium. Two hours later, the basal medium was changed and cells were further cultured for 24 h. The medium was then collected, concentrated with column (Amicon) and stored at -80°C prior to use. To test neurotrophins activities, breast cancer cells were transfected by nucleofection (Amaza) with siRNA against p75^{NTR} 5'-AUGCCUCCUUGGCACCUCC-3' and 5'-GGAGGUGCCAAGGAGGCAU-3', or control siRNA 5'-GCUGACCCUGAAGUUCAUC-3' and 5'-GAUGAACUUCAGGGUCAGC-3', or TrkB-T1 5'-GCCUGCAUAUACUGUGAGC-3' and 5'-GCUCACAGUAUAUGCAGGC-3'. 48h after transfection, apoptosis of breast cancer cells was induced by TRAIL, which is pro-apoptotic for breast cancer cells, at 5 ng/ml for 6h in serum free medium. To evaluate the anti-apoptotic activity of exogenous neurotrophins, we used the concentration of 200 ng/ml with or without pharmacological inhibitors: 10nM K252a (inhibitor of Trk receptors) or 20μM PD98059 (inhibitor of the MAP-Kinases). Anti-apoptotic activity of endogenous neurotrophins was tested using BDNF and NT-4/5 neutralizing antibodies (R&D systems) or non relevant antibodies as control, diluted at 1μg/ml in serum free medium 45 min before inducing apoptosis with TRAIL. For determination of apoptotic cell percentage, all cells (adherent and non adherent) were fixed with cold methanol (-20°C) during 20 min and washed with phosphate-buffered saline (PBS) after staining with 1 μg/ml Hoechst 33342, for 15 min at room temperature in the dark. The apoptotic cells, exhibiting condensed and fragmented nuclei, were counted under a Leica

fluorescence microscope in randomly selected fields. A minimum of 500-1000 cells was examined for each condition, and results were expressed as a ratio of the total number of counted cells.

Real time RT-PCR. Total RNA from cells were isolated with TriReagent® (Euromedex) and RNA from cells and biopsies treated with DNase. RNA from breast tumor tissues corresponded to 1 fibroadenoma, 1 ductal carcinoma *in situ*, 1 adenocarcinoma, 3 invasive ductal carcinomas, 2 invasive lobular carcinomas, 1 mixed ductal and lobular carcinoma and 1 medullary carcinoma. Reverse transcription was performed with 1 µg of RNAs, 0.5 µg of random hexamers, 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase for 10 min at 25°C, 50 min at 37°C and 15 min at 70°C in a final volume of 20 µl. Real time PCR amplifications were performed using a Quantitect SYBR®Green PCR kit with 2 µl of 1/10 cDNA and 500 nM of primers. The primers used were as follows: for *NT-3* transcript 5'-TGGCATCCAAGGTAACAACA-3' and 5'-CTCTGTTGTCGCAGCAGTTC-3'; *NT-4/5* 5'-AGGCCAAGCAGTCCTATGT-3' and 5'-GGTCTCTCAGCATCCAGCT-3'; *BDNF* 5'-TGGCTGACACTTTCGAACAC-3' and 5'-CCTCATGGACATGTTTGCAG-3'; *p75^{NTR}* 5'-ACGGCTACTACCAGGATGAG-3' and 5'-TGGCCTCGTCGGAATACGTG-3'; *TrkB full length* 5'-AGGGCAACCCGCCCACGGAA-3' and 5'-GGATCGGTCTGGGGAAAAGG-3'; *TrkB-T1* 5'-TAAAACCGGTTGGGAACATC-3' and 5'-ACCCATCCAGTGGGATCTTA-3'; *TrkB-T-shc* 5'-ATGATGACTCTGCCAGCCCA-3' and 5'-ATCAGGCGGGTCTTGGGGGAA-3'; *TrkC* primers were Quantitect® Primer Assay: QT00052906 (Qiagen) and for *RPLP0* (human acidic ribosomal phosphoprotein P0), which was used as a reference gene: 5'-GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT-3' and 5'-GATGACCAGCCCAAAGGAGA-3'. The subsequent PCR conditions were carried out in the following manner: 95°C for 15s, 60°C (or 55°C for Quantitect® Primer Assay) for 20 s, and 72°C for 30 s. Data were analyzed using the MX4000 PCR system software (Stratagene) with the SYBRGreen option (with dissociation curves). Standard curves were performed on serial dilutions of genomic human DNA or RT-transcripts. Values were obtained with the following calculation: ratio = (cycle number - b/a) target/(cycle number - b/a) reference (where a = slope of the standard curve and b = ordinate of origin). In real time PCR, Ct (Cycle threshold) is defined as the number of cycles required for the accumulation of a fluorescent signal

(corresponding to the accumulation of PCR product) to cross the threshold. Here, the ΔC_t corresponding to (Ct interest gene – Ct reference gene) is added for information.

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

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

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

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

RESULTS

Expression of neurotrophins and their receptors in breast cancer cells. The expression of BDNF, NT-3, NT-4/5, TrkB full length (TrkB-FL), TrkB-T1, TrkB-T-shc, TrkC and p75^{NTR} was examined in the breast cancer cell lines MDA-MB-231, MCF-7, T-47D, BT-20 as well as in the non-cancerous breast epithelial cell lines MCF-10A and HMEC, using both real time RT-PCR and immunoblotting. The results (Fig. 1) indicated that these cell lines expressed both BDNF and NT-4/5 transcripts, visualized at 200 pb and 164 pb respectively after RT-PCR (Fig. 1A). All breast epithelial cells, except

MCF-10A, expressed the neurotrophin receptor p75^{NTR}, whereas TrkB-FL was detected only in MCF-7 cells. TrkC was never observed. In contrast, TrkB-T1 transcripts were observed in all cell lines. TrkB-T-shc was also never detected (data not shown). NT-3, detected at 249 pb, was either low or not expressed, depending on the cell type, and its tyrosine kinase receptor TrkC was not detectable in any of the tested cell lines. Relative mRNA quantifications and ΔCt (cycle threshold), obtained for each neurotrophin and for p75^{NTR}, as well as TrkB-T1 and TrkB-FL, are depicted in Figure 1B. The sequencing of TrkB-T1 product from MCF-7 cells is shown in Supplemental Data 1. Western-blotting on total cell lysates revealed 14 kDa bands, corresponding to BDNF and NT-4/5, in all tested cell types (Fig. 1C). In contrast, NT-3 was not detected at the protein level, in line with the low or absent levels of mRNA. Receptor expression profiles were also tested by Western-blotting, and both p75^{NTR} and TrkB-T1 were detected in all cell types except MCF-10A. Neither TrkB-FL nor TrkC were detected at the protein level, again confirming data from RT-PCR analysis. In addition, our results show that BDNF and NT-4/5 were detectable in the conditioned media of both normal and breast cancer cells, indicating the active secretion of these neurotrophins (Fig. 1D).

BDNF, NT-4/5 and associated receptors in breast tumors. Expression of BDNF, NT-4/5, and associated receptors was detected by real time RT-PCR in a pilot series of 10 breast tumor biopsies, with a series of 45 breast tumors also being analyzed by immunohistochemistry. The RT-PCR results (Fig. 2A) show that NT-4/5, TrkB-T1 and p75^{NTR} transcripts were present in all biopsies studied whereas TrkB-FL was found only in a few samples. BDNF was detected in 6/10 tumors. We then determined the relative expression levels of BDNF, NT-4/5, p75^{NTR} and TrkB-T1 in these biopsies. The corresponding mRNA levels were very variable, confirming the previously noted molecular heterogeneity among mammary tumors (Fig. 2B). To study the cellular distribution of BDNF and NT-4/5, breast tissue arrays were analysed by immunohistochemistry. Figure 3 summarizes the results obtained with the different spots of tissue for each tumor. The staining intensities for NT-4/5, BDNF and TrkB-T1 were concentrated in and around the cancerous cells and were slightly elevated in cancer biopsies compared to normal tissues, whatever the breast cancer type. The distribution/quantification of p75^{NTR} was not shown here, as it has been reported previously (24, 25). The levels of NT-4/5 and

BDNF were estimated by microscopic observation, and breast tissues were classified into four different categories depending on the intensity of labelling. However the results show no apparent relationship between the levels of BDNF, NT-4/5 and TrkB irrespective of stage, node invasion, estrogen or progesterone receptors and p53 levels, suggesting no correlation with classical clinicopathological factors (data not shown). Together, these data demonstrate that BDNF, NT-4/5 and TrkB-T1 are expressed in breast tumors.

Biological impact of BDNF and NT-4/5 in breast cancer cells. As BDNF and NT-4/5 were found expressed in breast cancer cells, we next tested their effect on cell survival, proliferation and migration. Our data indicated no effect of exogenously added neurotrophins on breast cancer cell proliferation and migration (data not shown), whereas an anti-apoptotic effect was observed, confirming previous data (16). The two exogenously added neurotrophins exhibited a rescue effect on TRAIL-treated MCF-7 cells (Fig. 4A). MDA-MB-231 cells and HMEC cells were also tested, as well as the pro-apoptotic ceramide C2, and the same prosurvival effect of BDNF and NT-4/5 was obtained (data not shown). In contrast, no significant anti-apoptotic effects of BDNF and NT-4/5 were observed with MCF-10A cells (data not shown). Interestingly, siRNA against p75^{NTR} or TrkB-T1 abolished the NT-4/5 and BDNF anti-apoptotic effect (Fig. 4A and B). siRNA against p75^{NTR} and TrkB-T1 even increased the apoptosis rate compared to siRNA control. Moreover, the Trk pharmacological inhibitors K252a and the MEK inhibitor PD98059 had no impact on the BDNF and NT-4/5 survival effect, indicating the non-involvement of either the Trk receptor tyrosine kinase or the MAP kinase pathway. The control of siRNA efficacy in depleting p75^{NTR} and TrkB-T1 mRNA is shown in Figure 4C. We then tested the effect of endogenously produced NT-4/5 and BDNF on breast cancer cell growth, through a strategy of inhibition utilizing blocking antibodies. In the absence of exogenously added neurotrophins, the addition of neutralizing anti-NT-4/5 or anti-BDNF resulted in the inhibition of cell survival (Fig. 4D). In the same experimental conditions, antibodies against NT-3 had no effect (data not shown). These data strongly suggest an autocrine loop of BDNF and NT-4/5 resulting in the breast cancer cell survival. This hypothesis was confirmed *in vivo*, with the highly tumorigenic breast cancer cells MDA-MB-231 which were xenografted in SCID mice. The results indicated that treatments with

anti-NT-4/5 or anti-BDNF induced an inhibition of tumor growth, resulting in a decrease of final tumor size (Figs. 5 A and B). In addition, the proliferative and apoptotic rates in tumors were assessed by immunohistochemistry with anti-PCNA antibodies and TUNEL staining respectively (Fig. 5C), and the number of brown TUNEL or PCNA labeled nuclei counted in each condition. The results, synthesized in Fig. 5D, revealed an increase of cell apoptosis in tumor treated with antibodies against neurotrophins, whereas no significant modification of proliferation was observed. Together, these data indicate that BDNF and NT-4/5 stimulate breast tumor cell survival and resistance to apoptosis, hence promoting tumor development.

DISCUSSION

BDNF and NT-4/5 were first described for their neurotrophic properties, as they contribute to the development and maintenance of neurons in both central and peripheral nervous systems. They are generally produced by the postsynaptic targets of innervation, allowing nerve fibres to be attracted into and thus for the neuronal cell bodies to survive and establish connections into specific organs and tissues. Our results show for the first time that BDNF and NT-4/5 are also expressed and secreted by cancerous breast epithelial cells, with a widespread expression amongst both cell lines and tumor biopsies. Unlike NGF, which is overexpressed only in breast cancer cells (17), our results show that NT-4/5 and BDNF are also synthesized and secreted in significant amounts by normal breast epithelial cells, and thus they cannot be pursued as new biomarkers for breast cancer diagnosis. Considering the levels of immunoreactivity in tumor biopsies, and the strong staining observed in breast metastatic (lymph node) tissue, they may well be related to the degree of tumor aggressiveness, albeit we have not as yet established any relationship with the known prognostic factors. Therefore, although a direct prognostic value was not shown here, we have nonetheless established that BDNF and NT-4/5 expression occurs in breast tumors.

In contrast to BDNF and NT-4/5, the corresponding tyrosine kinase receptor TrkB-FL was rarely detected, and only at low levels. The involvement of TrkB in neuronal and non neuronal cancers has been documented, with TrkB being overexpressed in some cancers (neuroblastoma, prostate adenocarcinoma, Wilm's tumors, pancreatic adenocarcinoma, myeloma), resulting in an increased resistance to chemotherapy, and eventually a promotion of tumor invasion, proliferation and neoangiogenesis (27). However, for breast cancer, this study establishes that there is only a limited expression of TrkB-FL, which was observed in only 1/4 cell lines and 2/10 breast tumors. Expression of TrkB has been reported in mouse and human breast tumors (28, 29), but although these studies did not distinguish the alternative forms of TrkB, they also reported, through Western-blotting, the truncated form of TrkB at higher levels of expression than TrkB-FL itself. This prompted us to look for the expression of alternative forms of TrkB. PCR assays were designed to specifically detect TrkB-FL, TrkB-T1 and TrkB-shc. The results showed that TrkB-shc was not expressed, albeit in contrast, we detected TrkB-T1 in all tested breast cancer samples. The other receptor for BDNF and NT-4/5, p75^{NTR}, has already been shown to be expressed in breast tumors, and has been shown to have prognostic value (23-25). Supporting this, we confirm here the expression of p75^{NTR} in all breast cancer cell lines and tumors.

Several neurotrophic factors and receptors are involved in carcinogenesis (4). In neuroblastoma, the TrkAIII splice variant is able to act as a stimulator, and the BDNF/TrkB axis enhances not only neuroblastoma cell survival, but also resistance to chemotherapy and tumor progression (30-32). In breast cancer, the expression of NGF and glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) increases proliferation, survival and breast cancer cell scattering (26, 33). Here we show that BDNF and NT-4/5 stimulation could rescue breast cancer cells from apoptosis via p75^{NTR} and TrkB-T1, and that they can therefore be considered as prosurvival factors. The pharmacological inhibitors of Trk and MEK had no influence over the BDNF and NT-4/5 prosurvival effect, reinforcing the idea that Trk kinase activities are not involved in BDNF and NT-4/5 signaling in breast cancer cells.

The p75^{NTR} receptor regulates neuronal cell apoptosis/survival balance (34) and binds all neurotrophins with the same affinity. In carcinogenesis, p75^{NTR} plays complicated roles, as it is on one hand involved in the development of melanoma, through its ability to increase cell invasion, survival and brain metastasis (35, 10) and yet, on the other hand, it acts as a growth inhibitor in prostate, gastric and hepatocarcinomas (36-38). In this study, the inhibition of p75^{NTR} or TrkB-T1, with specific siRNAs, abolished the BDNF and NT-4/5 anti-apoptotic/prosurvival effect. Abolition of p75^{NTR} or TrkB-T1 further increased the basal level of TRAIL-induced apoptosis, suggesting an endogenous stimulation of p75^{NTR} and TrkB-T1 through BDNF and NT-4/5 secretion. To date, the biological role of TrkB-T1 has remained elusive. It has been hitherto described exclusively for the nervous system, where its overexpression *in vitro* has been reported to inhibit TrkB-FL and modulate p75^{NTR}, leading to neuronal precursor proliferation and differentiation (39-41). Nevertheless, its mechanism of action/intracellular signalling remains unknown. Our data extend the current knowledge about TrkB-T1 by reporting its expression outside the nervous system, it also being the first time that TrkB-T1 involvement is reported for cancer. In addition, we demonstrated that TrkB-T1 is capable of stimulating breast cancer cell resistance to apoptosis, and although its precise mechanism of action has yet to be defined, our data point to a similar effect of inhibiting either TrkB-T1 or p75^{NTR}. The hypothesis of BDNF- and NT4/5-mediated autocrine loops was sustained by our *in vivo* experiments, with tumor cell xenograft in immunodeficient mice, wherein blocking anti-BDNF and anti-NT-4/5 antibodies were able to decrease tumor growth. Interestingly, immunohistochemical analysis revealed that anti-BDNF or anti-NT-4/5 treatments induced increases in tumor cell apoptosis, with no effect on the rates of cell proliferation. Therefore, both the *in vitro* and *in vivo* experiments contributed to the evidence for the positive impact of BDNF and NT-4/5 on breast cancer cell apoptotic resistance.

In conclusion, our study reveals that BDNF and NT-4/5 are involved in breast cancer. The stimulation of a resistance to apoptosis by BDNF and NT-4/5, through p75^{NTR} and TrkB-T1, suggests their potential value as therapeutic targets in breast cancer that offer new directions for the design of innovative strategies based on neurotrophin inhibition.

FOOTNOTES

The abbreviations used are:

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

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Isabelle Pollet-Lefebvre and Nathalie Ziental-Gelus for excellent technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4:299–309.
2. Lu B, Pang PT and Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:603–14.
3. Huang EJ and Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003;72:609–42.
4. Kruttgen A, Schneider I and Weis J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain Pathol* 2006;16:304–10.
5. Sariola H. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1061–6.
6. Donovan MJ, Hempstead B, Huber LJ, Kaplan D, Tsoulfas P, Chao M, et al. Identification of the neurotrophin receptors p75 and trk in a series of Wilms' tumors. *Am J Pathol* 1994;145:792–801.
7. McGregor LM, McCune BK, Graff JR, McDowell PR, Romans KE, Yancopoulos GD, et al. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4540–5.
8. Dalal R and Djakiew D. Molecular characterization of neurotrophin expression and the corresponding tropomyosin receptor kinases (trks) in epithelial and stromal cells of the human prostate. *Mol Cell Endocrinol* 1997;134:15–22.
9. Montano X, Djamgoz MB. Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer. *FEBS Lett* 2004;571:1–8.
10. Truzzi F, Marconi A, Lotti R, Dallaglio K, French LE, Hempstead BL, et al. Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* 2008;128:2031–40.
11. Pearse RN, Swendeman SL, Li Y, Rafii D and Hempstead BL. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* 2005;105:4429–36.
12. Ketterer K, Rao S, Friess H, Weiss J, Buchler MW and Korc M. Reverse transcription-PCR analysis of laser-captured cells points to potential paracrine and autocrine actions of neurotrophins in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:5127–36.

13. Miknyoczki SJ, Lang D, Huang L, Klein-Szanto AJ, Dionne CA and Ruggeri BA. Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *Int J Cancer* 1999;81:417–27.
14. Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Nesland JM, Skrede M, Risberg B, et al. Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:2248–59.
15. Yang ZF, Ho DW, Lam CT, Luk JM, Lum CT, Yu WC, et al. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:219–25.
16. Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V, et al. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 2001;276:17864–70.
17. Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V and Hondermarck H. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22:5592–601.
18. El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Dolle L, Descamps S and Hondermarck H. Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278:16952–6.
19. Naderi A, Teschendorff AE, Beigel J, Cariati M, Ellis IO, Brenton JD, et al. BEX2 is overexpressed in a subset of primary breast cancers and mediates nerve growth factor/nuclear factor-kappaB inhibition of apoptosis in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2007;67:6725–36.
20. Tagliabue E, Castiglioni F, Ghirelli C, Modugno M, Asnaghi L, Somenzi G, et al. Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000;275:5388–94.
21. Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, Cantarella G, Bianchi A and Bernardini R. Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* 2001;61:3002–8.
22. Montano X. Repression of SHP-1 expression by p53 leads to trkA tyrosine phosphorylation and suppression of breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 2009;28:3787–800.
23. Aragona M, Panetta S, Silipigni AM, Romeo DL, Pastura G, Mesiti M, et al. Nerve growth factor receptor immunoreactivity in breast cancer patients. *Cancer Invest* 2001;19: 692–7.

24. Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Ann Florenes V, Nielsen S and 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.
25. Descamps S, Pawlowski V, Revillion F, Hornez L, Hebbar M, Boilly B, et al. Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:4337–40.
26. Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, Mougél A, Page A, Romon R, et al. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:346–51.
27. Thiele CJ, Li Z and McKee AE. On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res* 2009;15:5962–7.
28. Cameron HL and Foster WG. Dieldrin promotes resistance to anoikis in breast cancer cells in vitro. *Reprod Toxicol* 2008;25:256–62.
29. Cameron HL and Foster WG. Developmental and lactational exposure to dieldrin alters mammary tumorigenesis in Her2/neu transgenic mice. *PLoS One* 2009;4:e4303.
30. Li Z, Jaboin J, Dennis PA and Thiele CJ. Genetic and pharmacologic identification of Akt as a mediator of brain-derived neurotrophic factor/TrkB rescue of neuroblastoma cells from chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 2005;65:2070–5.
31. Li Z, Zhang J, Liu Z, Woo CW and Thiele CJ. Downregulation of Bim by brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from paclitaxel but not etoposide or cisplatin-induced cell death. *Cell Death Differ* 2007;14:318–26.
32. Schulte JH, Schramm A, Klein-Hitpass L, Klenk M, Wessels H, Hauffa BP, et al. Microarray analysis reveals differential gene expression patterns and regulation of single target genes contributing to the opposing phenotype of TrkA- and TrkB-expressing neuroblastomas. *Oncogene* 2005;24:165–77.
33. Essegir S, Todd SK, Hunt T, Poulsom R, Plaza-Menacho I, Reis-Filho JS, et al. A role for glial cell derived neurotrophic factor induced expression by inflammatory cytokines and RET/GFR alpha 1 receptor up-regulation in breast cancer. *Cancer Res* 2007;67:11732–41.
34. Nykjaer A, Willnow TE and Petersen CM. p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 2005;15:49–57.
35. Marchetti D, Aucoin R, Blust J, Murry B and Greiter-Wilke A. p75 neurotrophin receptor functions as a survival receptor in brain-metastatic melanoma cells. *J Cell Biochem* 2004;91:206–15.

36. Jin H, Pan Y, Zhao L, Zhai H, Li X, Sun L, et al. p75 neurotrophin receptor suppresses the proliferation of human gastric cancer cells. *Neoplasia* 2007;9:471–8.
37. Papatsoris AG, Liolitsa D and Deliveliotis C. Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2007;16:303–9.
38. Yuanlong H, Haifeng J, Xiaoyin Z, Jialin S, Jie L, Li Y, et al. The inhibitory effect of p75 neurotrophin receptor on growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2008;268:110–9.
39. Hartmann M, Brigadski T, Erdmann KS, Holtmann B, Sendtner M, Narz F, et al Truncated TrkB receptor-induced outgrowth of dendritic filopodia involves the p75 neurotrophin receptor. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 24):5803–14.
40. Tervonen TA, Ajamian F, De Wit J, Verhaagen J, Castren E, Castren M. Overexpression of a truncated TrkB isoform increases the proliferation of neural progenitors. *Eur J Neurosci.* 2006;24:1277–85.
41. Carim-Todd L, Bath KG, Fulgenzi G, Yanpallewar S, Jing D, Barrick CA, Endogenous truncated TrkB.T1 receptor regulates neuronal complexity and TrkB kinase receptor function in vivo. *J Neurosci* 2009;29:678–85.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Expression of neurotrophins and their receptors in breast cancer cells *in vitro*. **A**, Total RNA from breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF-7, T-47D, BT-20) and noncancerous breast epithelial cells (MCF-10A and HMEC), plus the neuronal NT2/D1 cells as control, were isolated and reverse-transcribed. Real time PCR amplifications of BDNF, NT-3, NT-4/5, p75^{NTR}, TrkB-FL, TrkB-T1, TrkB-shc, TrkC, and RPLP0 as loading control, were migrated in 2 % agarose gel. **B**, mRNA relative quantification for BDNF, NT-3, NT-4/5, p75^{NTR}, TrkB-FL and TrkB-T1 in breast cancer cells were calculated as explained in Material and Methods. The ΔC_t are indicated. The control represents value obtained for the NT2/D1 cells. The histogram for TrkC was not presented here because its expression was not found in any cell type. **C**, Protein extracts of various cells were processed for Western blotting using anti-neurotrophins (anti-BDNF, anti-NT-3, anti-NT4/5) and anti-receptors (anti-p75^{NTR}, anti-TrkB, anti-TrkC) antibodies. Recombinant proteins or NT2/D1 cells served as positive control and an anti-actin antibody was used for equiloading control. **D**, Secretion of BDNF and NT-4/5 by breast epithelial cells. Immunoblotting of conditioned media from MDA-MB-231, MCF-7 cells and HMEC was performed using anti-BDNF and anti-NT-4/5 antibodies, recombinant BDNF and NT-4/5 proteins were used as control.

Figure 2. Expression of neurotrophins and their receptors in breast tumors. **A**, Total RNA from 10 breast tumors were reverse-transcribed as described in "Material and Methods". Real time PCR amplifications of BDNF, NT-4/5, p75^{NTR}, TrkB-FL, TrkB-T1 and RPLP0 as loading control, were migrated in 2 % agarose gel. **B**, Relative quantification of neurotrophins and receptors mRNA expression in breast tumors. The ΔC_t are indicated.

Figure 3. Immunohistochemistry of BDNF and NT-4/5 in breast tumors. Antibodies against BDNF and NT-4/5 were used on breast tissue arrays. Specific immunoreactivity was observed for all histological types of breast cancer compared to normal breast tissues (e, m, u) or control without primary antibody (a, i, q). b, j, r: ductal carcinoma *in situ*; c, k, s: infiltrating ductal carcinoma; d, l, t:

infiltrating lobular carcinoma; f, n, v: metastatic atypical medullary carcinoma in lymph node; g, o, w: metastatic infiltrating ductal carcinoma in lymph node; h, p, x: metastatic infiltrating lobular carcinoma in lymph node. Relative quantification of immunostaining intensities are presented in Table 1.

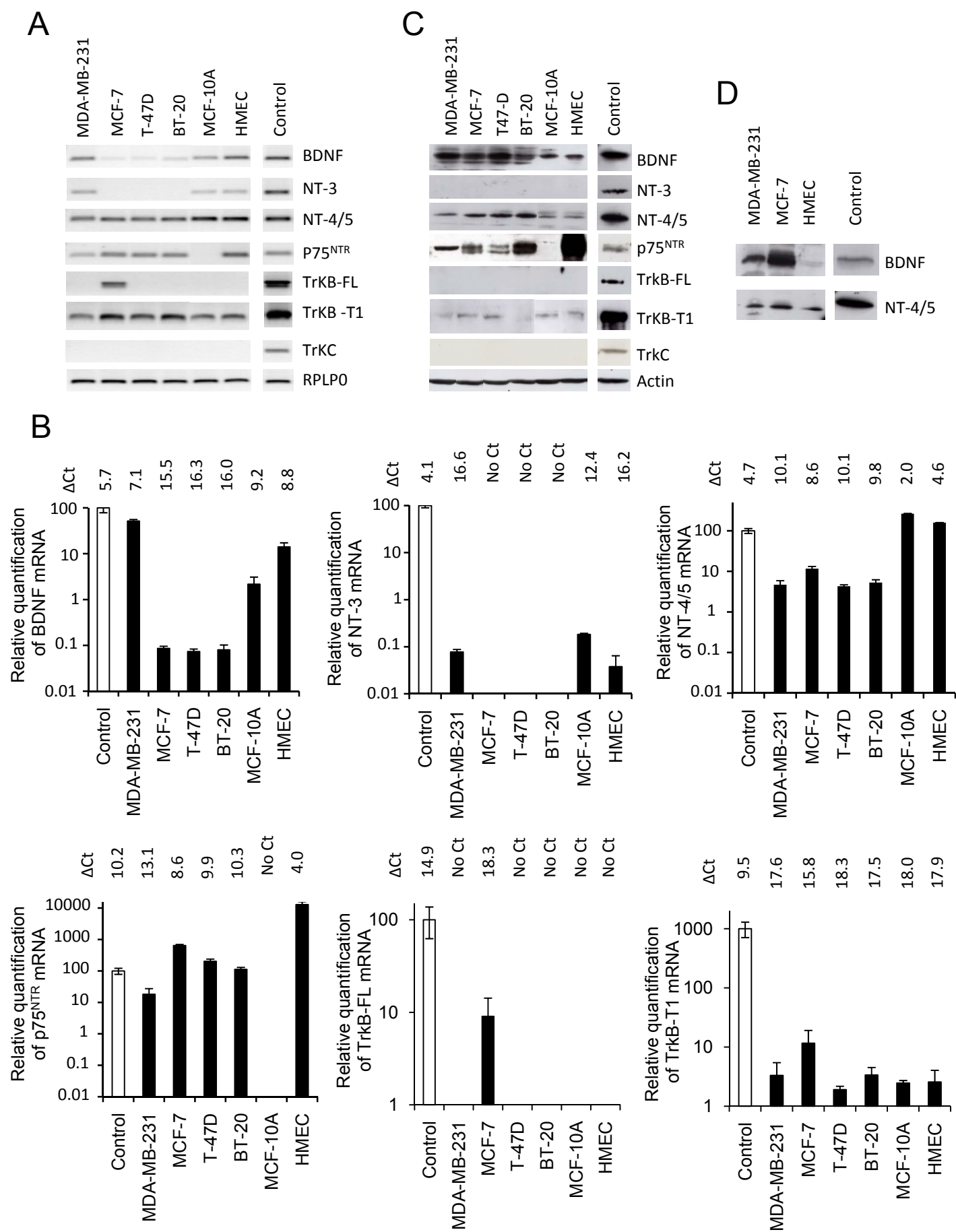
Figure 4. Effect of BDNF and NT-4/5 on breast cancer cells *in vitro*.

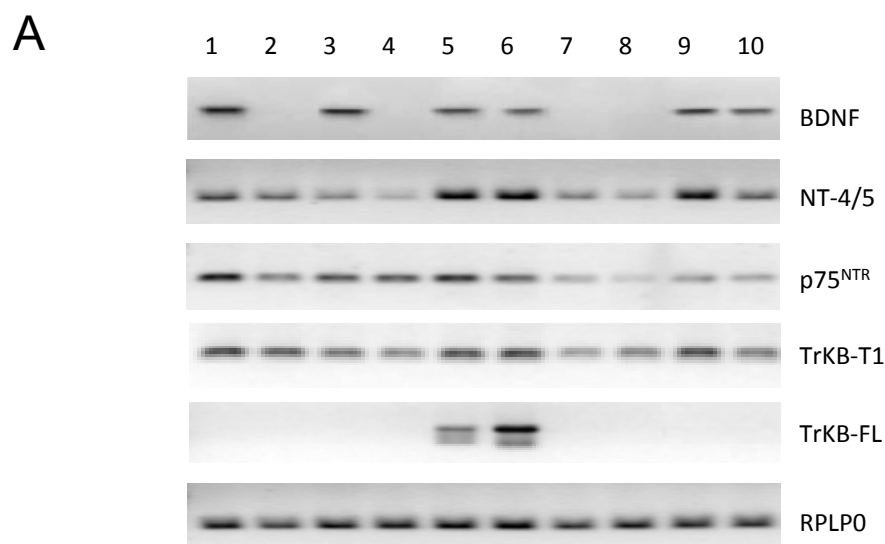
A, Effect of recombinant BDNF and NT-4/5 on breast cancer cell survival. 36h after transfection with siRNA against p75^{NTR} (black bars), or TrkB-T1 (grey bars) or control siRNA (white bars), MCF-7 cells were serum-deprived in minimum essential medium overnight and treated with 5 ng/ml TRAIL, with or without 200 ng/ml BDNF or NT-4/5, in presence or absence of 10 nM K252a or 20 μ M PD98059 during 6 h. Apoptotic nuclei were determined after Hoechst staining under a fluorescence microscope. **B**, Hoechst staining of MCF-7 cells in control versus siRNA p75^{NTR} condition. Apoptotic nuclei, appearing condensed or fragmented, are indicated by arrows. **C**, Demonstration of siRNA efficacy. MCF-7 cells were treated with siRNA against p75^{NTR} or TrkB-T1 and the quantity of p75^{NTR} or trkB-T1 mRNA was then assessed by Q-RT-PCR. RPLP0 was used as control. Lane 1, control siRNA; lane 2, siRNA against p75^{NTR}; lane 3, siRNA against TrkB-T1. **D**, Effect of blocking antibodies against BDNF and NT-4/5 on survival and resistance to apoptosis of breast cancer cells. As previously described, MCF-7 cells were induced into apoptosis with 5 ng/ml TRAIL, in the absence of exogenously added neurotrophins, with or without neutralizing antibodies against BDNF or NT-4/5, and apoptotic nuclei percentage was determined after Hoechst staining under a fluorescence microscope. *, $p < 0.05$.

Figure 5. *In vivo* effect of BDNF and NT-4/5 inhibition on tumor xenograft in immunodeficient mice.

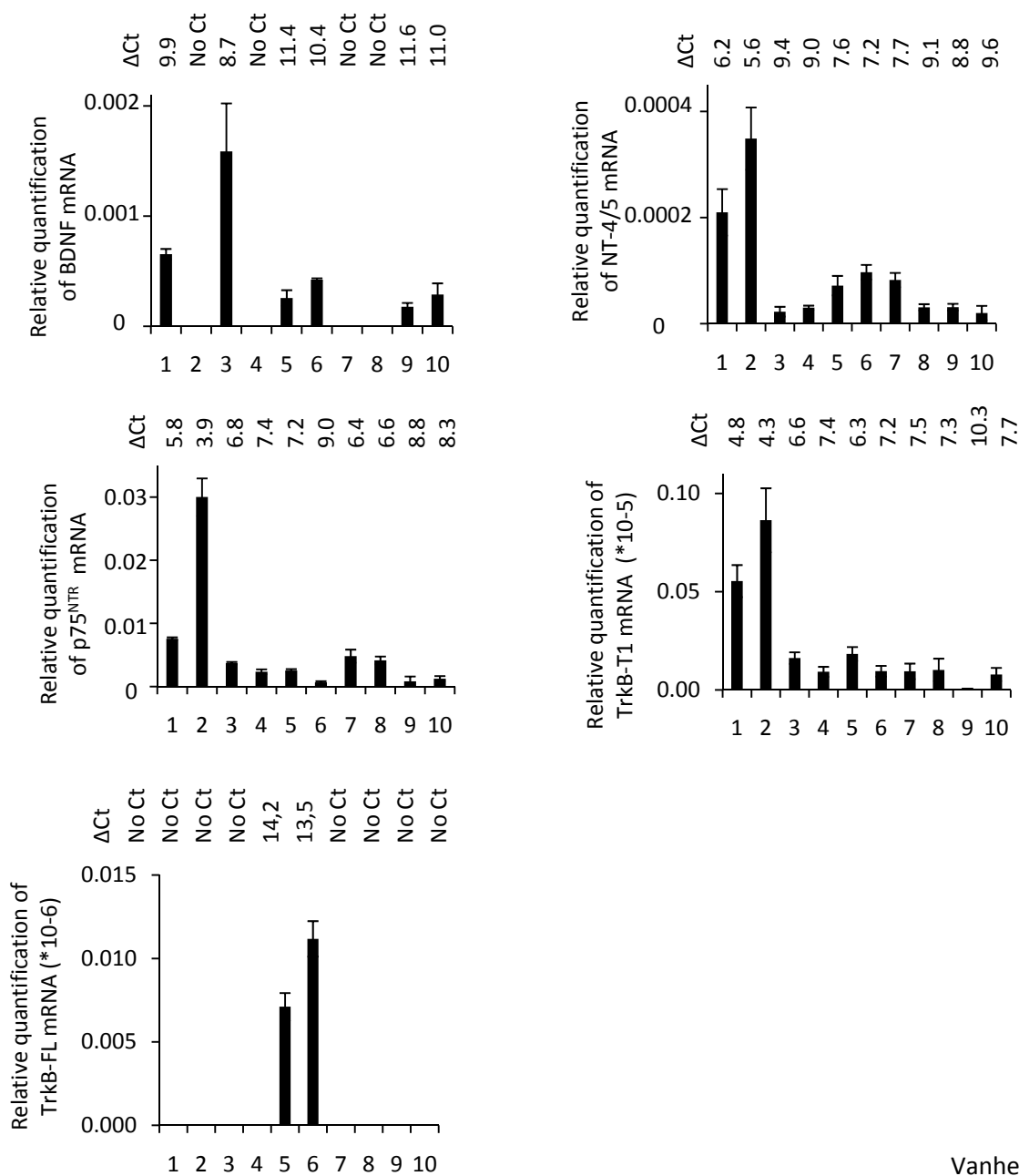
A, 3 days after subcutaneous injection of MDA-MB-231 cells, SCID mice were injected with 12.5 μ g of neutralizing antibodies: anti-BDNF (Δ), anti-NT-4/5 ($\blacksquare$) and non relevant antibodies ($\circ$) as control. Treatments were repeated every 3 days until animal sacrifice at day 40. Eight animals were used for each group and student's t test was performed between control groups and anti-NT-4/5 (a) and anti-BDNF (b) antibodies groups. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. The difference between control and NT-

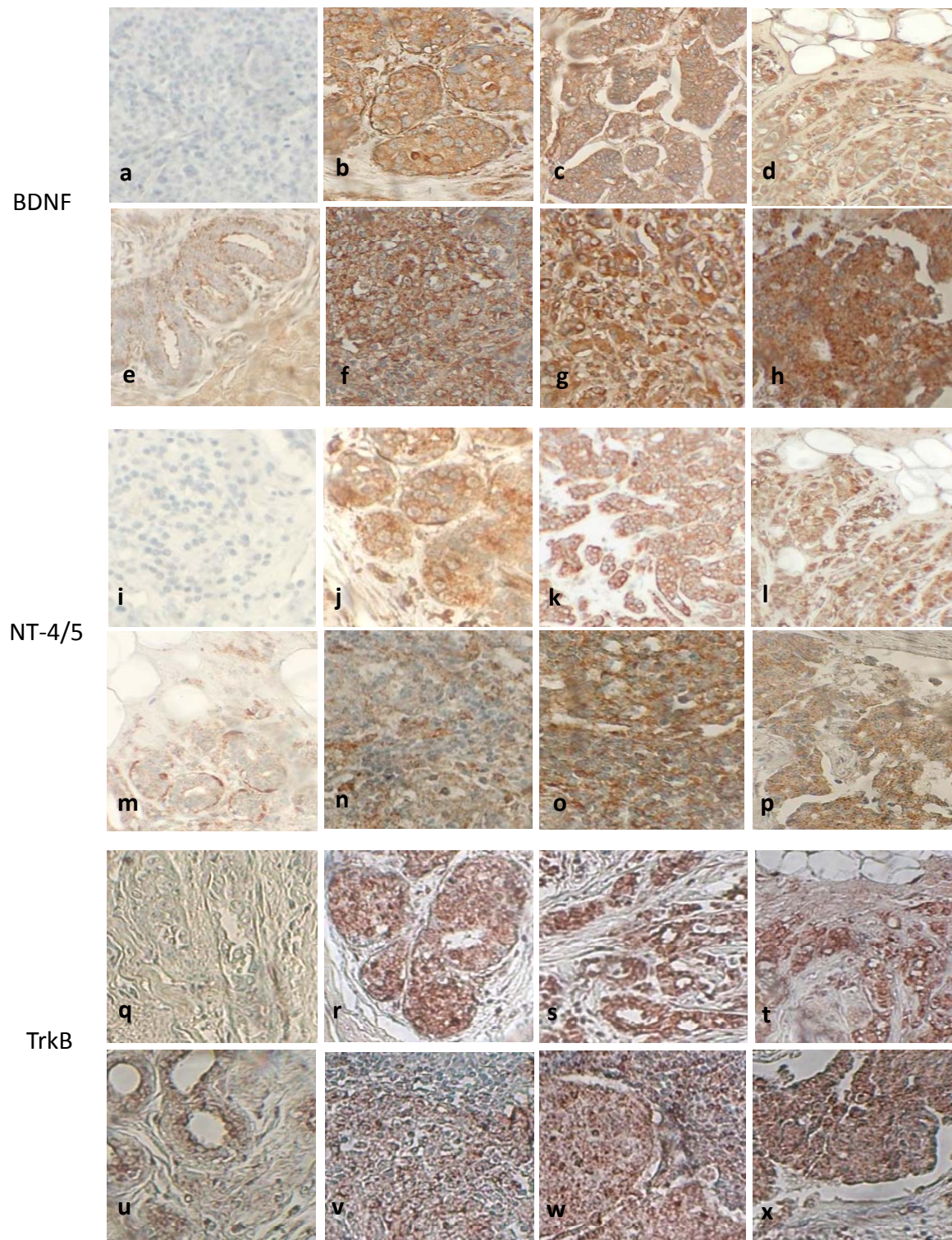
4/5 antibody-treated group was significant from day 26 ($p < 0.01$) through day 40 and between controls and BDNF antibody treated group was significant from day 22 ($p < 0.05$) through days 28 to 40 ($p < 0.01$). Experiments were performed twice with equivalent results. The treatment was also effective if started more than 3 days after cell injection. For instance, starting the injection 3 weeks after injection produced the same inhibition of tumor growth. **B**, Comparative tumor size differences observed after anti-BDNF or anti-NT-4/5 treatments (day 40). **C**, **D**, Cell proliferation and apoptosis were measured by immunohistochemistry against PCNA and TUNEL analysis respectively. Photographic illustrations of xenografted tumors immunohistochemistry after PCNA and TUNEL analysis are presented in **C**. Evaluations of cell proliferation (PCNA labeling) and apoptosis (TUNEL) from xenograft tumors are in **D**.

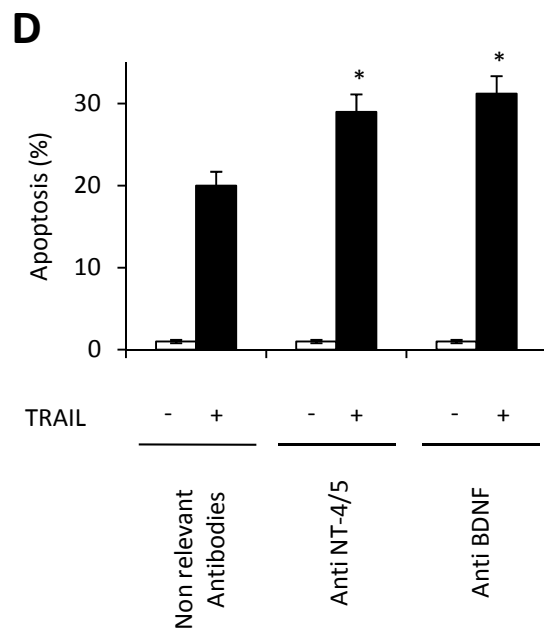
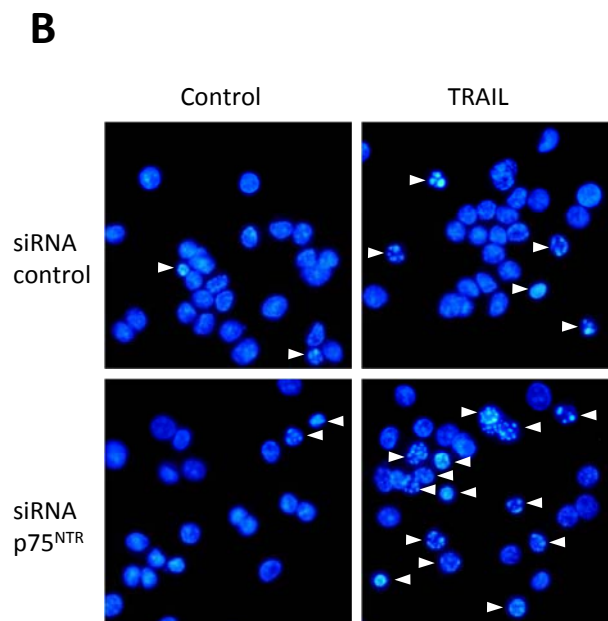
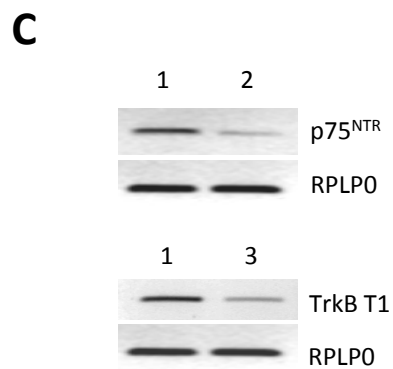
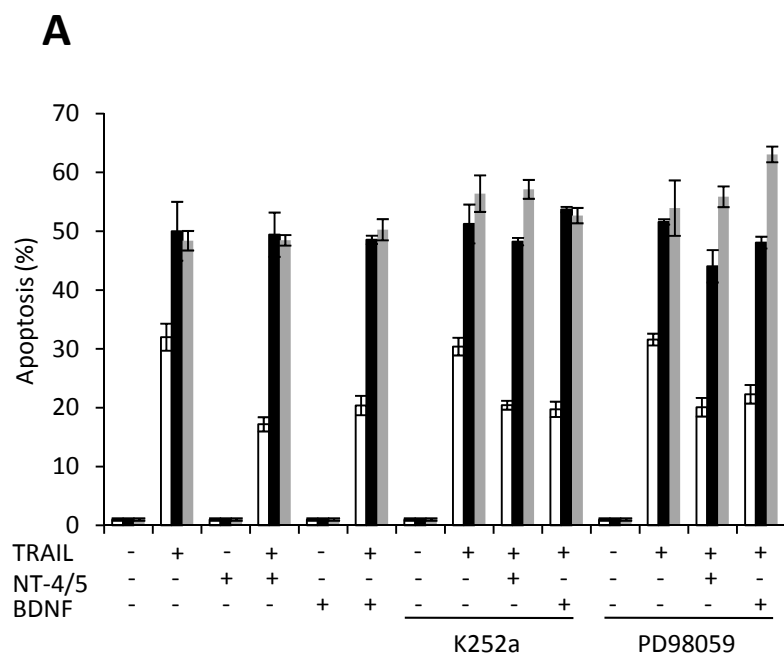


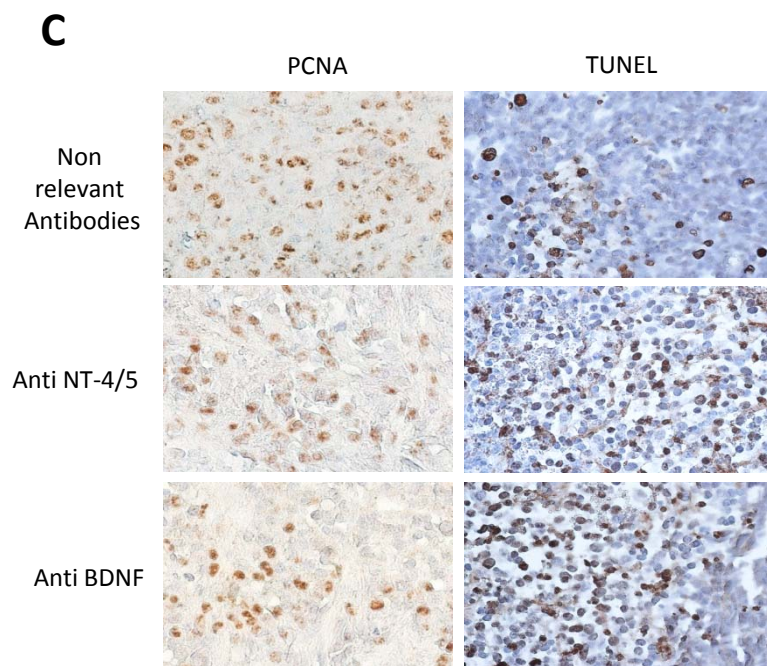
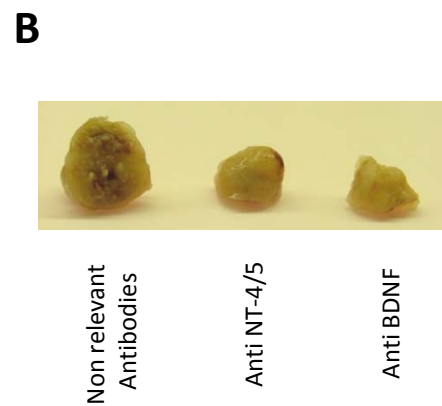
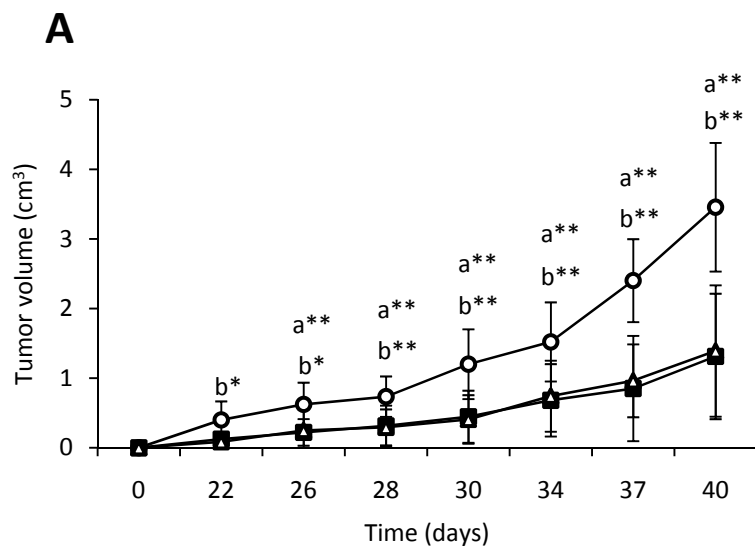


B









D

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

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adriaenssens E., Vanhecke E., Saule P., Mougel A., Page A., Romon R., Nurcombe V., Le Bourhis X. and Hondermarck H.** (2008). Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 68, 346-51.
- Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., Morrison S. J. and Clarke M. F.** (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-8.
- Allemand H., Seradour B., Weill A. and Ricordeau P.** (2008). Decline in breast cancer incidence in 2005 and 2006 in France: a paradoxical trend. *Bull Cancer* 95, 11-5.
- Allen J., Khwaja F. and Djakiew D.** (2004). Gene therapy of prostate xenograft tumors with a p75NTR lipoplex. *Anticancer Res* 24, 2997-3003.
- Allen J., Khwaja F., Byers S. and Djakiew D.** (2005). The p75NTR mediates a bifurcated signal transduction cascade through the NF kappa B and JNK pathways to inhibit cell survival. *Exp Cell Res* 304, 69-80.
- Amann T., Bataille F., Spruss T., Muhlbauer M., Gabele E., Scholmerich J., Kiefer P., Bosserhoff A. K. and Hellerbrand C.** (2009). Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 100, 646-53.
- Arakawa T., Haniu M., Narhi L. O., Miller J. A., Talvenheimo J., Philo J. S., Chute H. T., Matheson C., Carnahan J., Louis J. C. and et al.** (1994). Formation of heterodimers from three neurotrophins, nerve growth factor, neurotrophin-3, and brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 269, 27833-9.
- Arevalo J. C., Conde B., Hempstead B. L., Chao M. V., Martin-Zanca D. and Perez P.** (2000). TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* 20, 5908-16.
- Arevalo J. C., Pereira D. B., Yano H., Teng K. K. and Chao M. V.** (2006). Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 281, 1001-7.
- Arnold A. and Papanikolaou A.** (2005). Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 23, 4215-24.
- Asada M., Yamada T., Ichijo H., Delia D., Miyazono K., Fukumuro K. and Mizutani S.** (1999). Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J* 18, 1223-34.
- Aurikko J. P., Ruotolo B. T., Grossmann J. G., Moncrieffe M. C., Stephens E., Leppanen V. M., Robinson C. V., Saarma M., Bradshaw R. A. and Blundell T. L.** (2005). Characterization of symmetric complexes of nerve growth factor and the ectodomain of the pan-neurotrophin receptor, p75NTR. *J Biol Chem* 280, 33453-60.
- Bandtlow C. and Dechant G.** (2004). From cell death to neuronal regeneration, effects of the p75 neurotrophin receptor depend on interactions with partner subunits. *Sci STKE* 2004, pe24.
- Barde Y. A., Edgar D. and Thoenen H.** (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1, 549-53.

- Barker P. A., Lomen-Hoerth C., Gensch E. M., Meakin S. O., Glass D. J. and Shooter E. M.** (1993). Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J Biol Chem* 268, 15150-7.
- Barker P. A., Barbee G., Misko T. P. and Shooter E. M.** (1994). The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *J Biol Chem* 269, 30645-50.
- Barker P. A. and Shooter E. M.** (1994). Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* 13, 203-15.
- Barker P. A.** (2004). p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 42, 529-33.
- Barker P. A.** (2007). High affinity not in the vicinity? *Neuron* 53, 1-4.
- Barker P. A.** (2009). A p75(NTR) pivoting paradigm propels perspicacity. *Neuron* 62, 3-5.
- Baselga J., Semiglazov V., van Dam P., Manikhas A., Bellet M., Mayordomo J., Campone M., Kubista E., Greil R., Bianchi G., Steinseifer J., Molloy B., Tokaji E., Gardner H., Phillips P., Stumm M., Lane H. A., Dixon J. M., Jonat W. and Rugo H. S.** (2009). Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 27, 2630-7.
- Beattie M. S., Harrington A. W., Lee R., Kim J. Y., Boyce S. L., Longo F. M., Bresnahan J. C., Hempstead B. L. and Yoon S. O.** (2002). ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 36, 375-86.
- Becker E. B., Howell J., Kodama Y., Barker P. A. and Bonni A.** (2004). Characterization of the c-Jun N-terminal kinase-BimEL signaling pathway in neuronal apoptosis. *J Neurosci* 24, 8762-70.
- Berkemeier L. R., Winslow J. W., Kaplan D. R., Nikolics K., Goeddel D. V. and Rosenthal A.** (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 7, 857-66.
- Bertrand M. J., Kenchappa R. S., Andrieu D., Leclercq-Smekens M., Nguyen H. N., Carter B. D., Muscatelli F., Barker P. A. and De Backer O.** (2008). NRAGE, a p75NTR adaptor protein, is required for developmental apoptosis in vivo. *Cell Death Differ* 15, 1921-9.
- Bhakar A. L., Howell J. L., Paul C. E., Salehi A. H., Becker E. B., Said F., Bonni A. and Barker P. A.** (2003). Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J Neurosci* 23, 11373-81.
- Bhowmick N. A., Chytil A., Plieth D., Gorska A. E., Dumont N., Shappell S., Washington M. K., Neilson E. G. and Moses H. L.** (2004). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 303, 848-51.
- Bibel M., Hoppe E. and Barde Y. A.** (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J* 18, 616-22.
- Bilderback T. R., Grigsby R. J. and Dobrowsky R. T.** (1997). Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae. *J Biol Chem* 272, 10922-7.

- Bilderback T. R., Gazula V. R., Lisanti M. P. and Dobrowsky R. T.** (1999). Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem* 274, 257-63.
- Bilderback T. R., Gazula V. R. and Dobrowsky R. T.** (2001). Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways. *J Neurochem* 76, 1540-51.
- Billon N., Carlisi D., Datto M. B., van Grunsven L. A., Watt A., Wang X. F. and Rudkin B. B.** (1999). Cooperation of Sp1 and p300 in the induction of the CDK inhibitor p21WAF1/CIP1 during NGF-mediated neuronal differentiation. *Oncogene* 18, 2872-82.
- Bjornsti M. A. and Houghton P. J.** (2004). The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4, 335-48.
- Blancato J., Singh B., Liu A., Liao D. J. and Dickson R. B.** (2004). Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer* 90, 1612-9.
- Blay J., Lluch A., Gutierrez M., Martin M., Kozloff M., Prady C., Huang X., Verkh L., Chen C., Tassell V., Kern K. and Verma S.** (2010). Sunitinib (SU) in Combination with Trastuzumab (T) for the Treatment of Advanced Breast Cancer (ABC): Activity and Safety Results from a Phase II Study. *Cancer Res* 69, Abstract nr 201.
- Bloch I. A., Blumenstein L. and Ahmadian M. R.** (2004). Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci* 20, 2321-35.
- Bloch I. A. and Bloch I. R.** (2007). A cell-biological model of p75NTR signaling. *J Neurochem* 102, 289-305.
- Bonnet D. and Dick J. E.** (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-7.
- Bosco E. E. and Knudsen E. S.** (2007). RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis and treatment. *Cell Cycle* 6, 667-71.
- Bradshaw R. A., Murray-Rust J., Ibanez C. F., McDonald N. Q., Lapatto R. and Blundell T. L.** (1994). Nerve growth factor: structure/function relationships. *Protein Sci* 3, 1901-13.
- Brann A. B., Scott R., Neuberger Y., Abulafia D., Boldin S., Fainzilber M. and Futerman A. H.** (1999). Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 19, 8199-206.
- Brann A. B., Tcherpakov M., Williams I. M., Futerman A. H. and Fainzilber M.** (2002). Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* 277, 9812-8.
- Brenton J. D., Carey L. A., Ahmed A. A. and Caldas C.** (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 23, 7350-60.
- Bresnahan P. A., Leduc R., Thomas L., Thorner J., Gibson H. L., Brake A. J., Barr P. J. and Thomas G.** (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol* 111, 2851-9.

- Breuza L., Garcia M., Delgrossi M. H. and Le Bivic A.** (2002). Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp Cell Res* 273, 178-86.
- Brodeur G. M., Minturn J. E., Ho R., Simpson A. M., Iyer R., Varela C. R., Light J. E., Kolla V. and Evans A. E.** (2009). Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 15, 3244-50.
- Bronfman F. C., Tcherpakov M., Jovin T. M. and Fainzilber M.** (2003). Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the signaling endosome. *J Neurosci* 23, 3209-20.
- Bronfman F. C.** (2007). Metalloproteases and gamma-secretase: new membrane partners regulating p75 neurotrophin receptor signaling? *J Neurochem* 103 Suppl 1, 91-100.
- Brynczka C. and Merrick B. A.** (2007). Nerve growth factor potentiates p53 DNA binding but inhibits nitric oxide-induced apoptosis in neuronal PC12 cells. *Neurochem Res* 32, 1573-85.
- Burstein H. J., Elias A. D., Rugo H. S., Cobleigh M. A., Wolff A. C., Eisenberg P. D., Lehman M., Adams B. J., Bello C. L., DePrimo S. E., Baum C. M. and Miller K. D.** (2008). Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *J Clin Oncol* 26, 1810-6.
- Butowt R. and von Bartheld C. S.** (2009). Fates of neurotrophins after retrograde axonal transport: phosphorylation of p75NTR is a sorting signal for delayed degradation. *J Neurosci* 29, 10715-29.
- Canfield S. E., Zhu K., Williams S. A. and McConkey D. J.** (2006). Bortezomib inhibits docetaxel-induced apoptosis via a p21-dependent mechanism in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5, 2043-50.
- Carter B. D., Kaltschmidt C., Kaltschmidt B., Offenhauser N., Bohm-Matthaei R., Baeuerle P. A. and Barde Y. A.** (1996). Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272, 542-5.
- Casaccia-Bonofil P., Carter B. D., Dobrowsky R. T. and Chao M. V.** (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383, 716-9.
- Casademunt E., Carter B. D., Benzel I., Frade J. M., Dechant G. and Barde Y. A.** (1999). The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J* 18, 6050-61.
- Ceni C., Kommaddi R. P., Thomas R., Vereker E., Liu X., McPherson P. S., Ritter B. and Barker P. A.** (2010). The p75NTR intracellular domain generated by neurotrophin-induced receptor cleavage potentiates Trk signaling. *J Cell Sci* 123, 2299-307.
- Chan M. M. and Tahan S. R.** (2010). Low-affinity nerve growth factor receptor (P75 NGFR) as a marker of perineural invasion in malignant melanomas. *J Cutan Pathol* 37, 336-43.
- Chang C. F., Westbrook R., Ma J. and Cao D.** (2007). Transforming growth factor-beta signaling in breast cancer. *Front Biosci* 12, 4393-401.
- Chang M. S., Arevalo J. C. and Chao M. V.** (2004). Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J Neurosci Res* 78, 186-92.

- Chao M. V., Bothwell M. A., Ross A. H., Koprowski H., Lanahan A. A., Buck C. R. and Sehgal A.** (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 232, 518-21.
- Charafe-Jauffret E., Monville F., Ginestier C., Dontu G., Birnbaum D. and Wicha M. S.** (2008). Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology* 75, 75-84.
- Chen Z. Y., Ieraci A., Teng H., Dall H., Meng C. X., Herrera D. G., Nykjaer A., Hempstead B. L. and Lee F. S.** (2005). Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci* 25, 6156-66.
- Cheng N., Chytil A., Shyr Y., Joly A. and Moses H. L.** (2007). Enhanced hepatocyte growth factor signaling by type II transforming growth factor-beta receptor knockout fibroblasts promotes mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 67, 4869-77.
- Cheng N., Chytil A., Shyr Y., Joly A. and Moses H. L.** (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res* 6, 1521-33.
- Chiarenza A., Lazarovici P., Lempereur L., Cantarella G., Bianchi A. and Bernardini R.** (2001). Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* 61, 3002-8.
- Chittka A. and Chao M. V.** (1999). Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10705-10.
- Chittka A., Arevalo J. C., Rodriguez-Guzman M., Perez P., Chao M. V. and Sendtner M.** (2004). The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J Cell Biol* 164, 985-96.
- Clary D. O. and Reichardt L. F.** (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11133-7.
- Cohen S., Levi-Montalcini R. and Hamburger V.** (1954). A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40, 1014-8.
- Coulson E. J., Reid K., Baca M., Shipham K. A., Hulett S. M., Kilpatrick T. J. and Bartlett P. F.** (2000). Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem* 275, 30537-45.
- Coulson E. J., Reid K., Shipham K. M., Morley S., Kilpatrick T. J. and Bartlett P. F.** (2004). The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog Brain Res* 146, 41-62.
- Coulson E. J., May L. M., Osborne S. L., Reid K., Underwood C. K., Meunier F. A., Bartlett P. F. and Sah P.** (2008). p75 neurotrophin receptor mediates neuronal cell death by activating GIRK channels through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 28, 315-24.
- Dancey J.** (2010). mTOR signaling and drug development in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 7, 209-19.
- Dang C., Zhang Y., Ma Q. and Shimahara Y.** (2006). Expression of nerve growth factor receptors is correlated with progression and prognosis of human pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 21, 850-8.

- Davidson B., Reich R., Lazarovici P., Ann Florenes V., Nielsen S. and Nesland J. M.** (2004). Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 83, 119-28.
- Dean-Colomb W. and Esteva F. J.** (2008). Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. *Eur J Cancer* 44, 2806-12.
- DeFreitas M. F., McQuillen P. S. and Shatz C. J.** (2001). A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons. *J Neurosci* 21, 5121-9.
- Descamps S., Lebourhis X., Delehedde M., Boilly B. and Hondermarck H.** (1998). Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 273, 16659-62.
- Descamps S., Pawlowski V., Revillion F., Hornez L., Hebbar M., Boilly B., Hondermarck H. and Peyrat J. P.** (2001a). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res* 61, 4337-40.
- Descamps S., Toillon R. A., Adriaenssens E., Pawlowski V., Cool S. M., Nurcombe V., Le Bourhis X., Boilly B., Peyrat J. P. and Hondermarck H.** (2001b). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 276, 17864-70.
- Di Cosimo S. and Baselga J.** (2008). Targeted therapies in breast cancer: where are we now? *Eur J Cancer* 44, 2781-90.
- Diel I. J., Jaschke A., Solomayer E. F., Gollan C., Bastert G., Sohn C. and Schuetz F.** (2008). Adjuvant oral clodronate improves the overall survival of primary breast cancer patients with micrometastases to the bone marrow: a long-term follow-up. *Ann Oncol* 19, 2007-11.
- Diolaiti D., Bernardoni R., Trazzi S., Papa A., Porro A., Bono F., Herbert J. M., Perini G. and Della Valle G.** (2007). Functional cooperation between TrkA and p75(NTR) accelerates neuronal differentiation by increased transcription of GAP-43 and p21(CIP/WAF) genes via ERK1/2 and AP-1 activities. *Exp Cell Res* 313, 2980-92.
- Dirix L., Canon J., Amadori D., Villa E., Aldrighetti D., Machiels J., Verkh L., Bouko Y., Kern K., Giorgetti C. and Cardoso F.** (2010). An Exploratory Study of Sunitinib (SU) Plus Docetaxel (D) and Trastuzumab (T) for First-Line Therapy of HER2+ Advanced Breast Cancer (ABC). *Cancer Res* 69, Abstract nr 6088.
- Dobrowsky R. T., Werner M. H., Castellino A. M., Chao M. V. and Hannun Y. A.** (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 265, 1596-9.
- Dobrowsky R. T., Jenkins G. M. and Hannun Y. A.** (1995). Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J Biol Chem* 270, 22135-42.
- Dolle J. P., Rezvan A., Allen F. D., Lazarovici P. and Lelkes P. I.** (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. and Hondermarck H.** (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 22, 5592-601.

- Dolle L., Oliveira M. J., Bruyneel E., Hondermarck H. and 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.
- El Yazidi-Belkoura I., Adriaenssens E., Dolle L., Descamps S. and Hondermarck H.** (2003). Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells. *J Biol Chem* 278, 16952-6.
- Epa W. R., Markovska K. and Barrett G. L.** (2004). The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation. *J Neurochem* 89, 344-53.
- Esposito D., Patel P., Stephens R. M., Perez P., Chao M. V., Kaplan D. R. and Hempstead B. L.** (2001). The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* 276, 32687-95.
- Esteban P. F., Yoon H. Y., Becker J., Dorsey S. G., Caprari P., Palko M. E., Coppola V., Saragovi H. U., Randazzo P. A. and Tessarollo L.** (2006). A kinase-deficient TrkC receptor isoform activates Arf6-Rac1 signaling through the scaffold protein tamalin. *J Cell Biol* 173, 291-9.
- Fan Y., Borowsky A. D. and Weiss R. H.** (2003). An antisense oligodeoxynucleotide to p21(Waf1/Cip1) causes apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2, 773-82.
- Festuccia C., Muzi P., Gravina G. L., Millimaggi D., Specia S., Dolo V., Ricevuto E., Vicentini C. and Bologna M.** (2007). Tyrosine kinase inhibitor CEP-701 blocks the NTRK1/NGF receptor and limits the invasive capability of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 30, 193-200.
- Foehr E. D., Lin X., O'Mahony A., Geleziunas R., Bradshaw R. A. and Greene W. C.** (2000). NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J Neurosci* 20, 7556-63.
- Fortino V., Torricelli C., Capurro E., Sacchi G., Valacchi G. and Maioli E.** (2008). Antiproliferative and survival properties of PMA in MCF-7 breast cancer cell. *Cancer Invest* 26, 13-21.
- Frade J. M., Rodriguez-Tebar A. and Barde Y. A.** (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383, 166-8.
- Fulda S., Galluzzi L. and Kroemer G.** (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 9, 447-64.
- Gallardo R., Ivarsson Y., Schymkowitz J., Rousseau F. and Zimmermann P.** (2010). Structural diversity of PDZ-lipid interactions. *Chembiochem* 11, 456-67.
- Gargano N., Levi A. and Alema S.** (1997). Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA receptors. *J Neurosci Res* 50, 1-12.
- Gartel A. L. and Tyner A. L.** (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1, 639-49.
- Geetha T., Kenchappa R. S., Wooten M. W. and Carter B. D.** (2005). TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *EMBO J* 24, 3859-68.

- Gentry J. J., Casaccia-Bonnet P. and Carter B. D.** (2000). Nerve growth factor activation of nuclear factor kappaB through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J Biol Chem* 275, 7558-65.
- Gentry J. J., Rutkoski N. J., Burke T. L. and Carter B. D.** (2004). A functional interaction between the p75 neurotrophin receptor interacting factors, TRAF6 and NRIF. *J Biol Chem* 279, 16646-56.
- Geyer F. C., Marchio C. and Reis-Filho J. S.** (2009). The role of molecular analysis in breast cancer. *Pathology* 41, 77-88.
- Ginestier C., Korkaya H., Dontu G., Birnbaum D., Wicha M. S. and Charafe-Jauffret E.** (2007). [The cancer stem cell: the breast cancer driver]. *Med Sci (Paris)* 23, 1133-9.
- Goldschneider D. and Mehlen P.** (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29, 1865-82.
- Gong Y., Cao P., Yu H. J. and Jiang T.** (2008). Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex. *Nature* 454, 789-93.
- Grothey A. and Galanis E.** (2009). Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules. *Nat Rev Clin Oncol* 6, 507-18.
- Guertin D. A. and Sabatini D. M.** (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12, 9-22.
- Guiton M., Gunn-Moore F. J., Glass D. J., Geis D. R., Yancopoulos G. D. and Tavares J. M.** (1995). Naturally occurring tyrosine kinase inserts block high affinity binding of phospholipase C gamma and Shc to TrkC and neurotrophin-3 signaling. *J Biol Chem* 270, 20384-90.
- Haapasalo A., Sipola I., Larsson K., Akerman K. E., Stoilov P., Stamm S., Wong G. and Castren E.** (2002). Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. *J Biol Chem* 277, 43160-7.
- Hallbook F., Ibanez C. F. and Persson H.** (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6, 845-58.
- Hamanoue M., Middleton G., Wyatt S., Jaffray E., Hay R. T. and Davies A. M.** (1999). p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 14, 28-40.
- Hanahan D. and Weinberg R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harrington A. W., Kim J. Y. and Yoon S. O.** (2002). Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci* 22, 156-66.
- Hatai T., Matsuzawa A., Inoshita S., Mochida Y., Kuroda T., Sakamaki K., Kuida K., Yonehara S., Ichijo H. and Takeda K.** (2000). Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J Biol Chem* 275, 26576-81.
- He X. L., Bazan J. F., McDermott G., Park J. B., Wang K., Tessier-Lavigne M., He Z. and Garcia K. C.** (2003). Structure of the Nogo receptor ectodomain: a recognition module implicated in myelin inhibition. *Neuron* 38, 177-85.

- He X. L. and Garcia K. C.** (2004). Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304, 870-5.
- Hempstead B. L., Martin-Zanca D., Kaplan D. R., Parada L. F. and Chao M. V.** (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350, 678-83.
- Hermey G., Sjogaard S. S., Petersen C. M., Nykjaer A. and Gliemann J.** (2006). Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members. *Biochem J* 395, 285-93.
- Hermey G.** (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cell Mol Life Sci* 66, 2677-89.
- Herrup K. and Shooter E. M.** (1973). Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 3884-8.
- Heymach J. V., Jr. and Shooter E. M.** (1995). The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected mammalian cells. *J Biol Chem* 270, 12297-304.
- Higuchi H., Yamashita T., Yoshikawa H. and Tohyama M.** (2003). PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts. *EMBO J* 22, 1790-800.
- Hirata H., Hibasami H., Yoshida T., Ogawa M., Matsumoto M., Morita A. and Uchida A.** (2001). Nerve growth factor signaling of p75 induces differentiation and ceramide-mediated apoptosis in Schwann cells cultured from degenerating nerves. *Glia* 36, 245-58.
- Hohn A., Leibrock J., Bailey K. and Barde Y. A.** (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344, 339-41.
- Huang S. D., Yuan Y., Liu X. H., Gong D. J., Bai C. G., Wang F., Luo J. H. and Xu Z. Y.** (2009). Self-renewal and chemotherapy resistance of p75NTR positive cells in esophageal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer* 9, 9.
- Hung A. Y. and Sheng M.** (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* 277, 5699-702.
- Ilag L. L., Rottenberger C., Liepinsh E., Wellenhofer G., Rudert F. and Otting G.** (1999). Selection of a peptide ligand to the p75 neurotrophin receptor death domain and determination of its binding sites by NMR. *Biochem Biophys Res Commun* 255, 104-9.
- Ip N. Y., Ibanez C. F., Nye S. H., McClain J., Jones P. F., Gies D. R., Belluscio L., Le Beau M. M., Espinosa R., 3rd, Squinto S. P. and et al.** (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3060-4.
- Irie S., Hachiya T., Rabizadeh S., Maruyama W., Mukai J., Li Y., Reed J. C., Bredesen D. E. and Sato T. A.** (1999). Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 460, 191-8.
- 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. and 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. and Fan D.** (2007b). p75 neurotrophin receptor suppresses the proliferation of human gastric cancer cells. *Neoplasia* 9, 471-8.
- Johnson D., Lanahan A., Buck C. R., Sehgal A., Morgan C., Mercer E., Bothwell M. and Chao M.** (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47, 545-54.
- Jones K. R. and Reichardt L. F.** (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.
- Joyce J. A.** (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 7, 513-20.
- Joyce J. A. and Pollard J. W.** (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9, 239-52.
- Jung K. M., Tan S., Landman N., Petrova K., Murray S., Lewis R., Kim P. K., Kim D. S., Ryu S. H., Chao M. V. and Kim T. W.** (2003). Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J Biol Chem* 278, 42161-9.
- Kanning K. C., Hudson M., Amieux P. S., Wiley J. C., Bothwell M. and Schecterson L. C.** (2003). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* 23, 5425-36.
- Kaplan D. R. and Miller F. D.** (2003). Axon growth inhibition: signals from the p75 neurotrophin receptor. *Nat Neurosci* 6, 435-6.
- Kenchappa R. S., Zampieri N., Chao M. V., Barker P. A., Teng H. K., Hempstead B. L. and Carter B. D.** (2006). Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* 50, 219-32.
- Kenchappa R. S., Tep C., Korade Z., Urrea S., Bronfman F. C., Yoon S. O. and Carter B. D.** (2010). p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor- α -converting enzyme/ADAM17. *J Biol Chem* 285, 20358-68.
- Khursigara G., Orlinick J. R. and Chao M. V.** (1999). Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* 274, 2597-600.
- Khursigara G., Bertin J., Yano H., Moffett H., DiStefano P. S. and Chao M. V.** (2001). A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* 21, 5854-63.
- Khwaja F. and Djakiew D.** (2003). Inhibition of cell-cycle effectors of proliferation in bladder tumor epithelial cells by the p75NTR tumor suppressor. *Mol Carcinog* 36, 153-60.
- Khwaja F., Tabassum A., Allen J. and Djakiew D.** (2006). The p75(NTR) tumor suppressor induces cell cycle arrest facilitating caspase mediated apoptosis in prostate tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 1184-92.
- Kimura M. T., Irie S., Shoji-Hoshino S., Mukai J., Nadano D., Oshimura M. and Sato T. A.** (2001). 14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 276, 17291-300.

- Klein R., Parada L. F., Coulier F. and Barbacid M.** (1989). trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J* 8, 3701-9.
- Klein R., Jing S. Q., Nanduri V., O'Rourke E. and Barbacid M.** (1991a). The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65, 189-97.
- Klein R., Nanduri V., Jing S. A., Lamballe F., Tapley P., Bryant S., Cordon-Cardo C., Jones K. R., Reichardt L. F. and Barbacid M.** (1991b). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395-403.
- Knudson A. G.** (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 157-62.
- Kondo T., Setoguchi T. and Taga T.** (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 781-6.
- Kong H., Boulter J., Weber J. L., Lai C. and Chao M. V.** (2001). An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci* 21, 176-85.
- Kozloff M., Chuang E., Starr A., Gowland P. A., Cataruozolo P. E., Collier M., Verkh L., Huang X., Kern K. A. and Miller K.** (2010). An exploratory study of sunitinib plus paclitaxel as first-line treatment for patients with advanced breast cancer. *Ann Oncol* 21, 1436-41.
- Kuwako K., Taniura H. and Yoshikawa K.** (2004). Necdin-related MAGE proteins differentially interact with the E2F1 transcription factor and the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* 279, 1703-12.
- Lachance C., Belliveau D. J. and Barker P. A.** (1997). Blocking nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor on sympathetic neurons transiently reduces trkA activation but does not affect neuronal survival. *Neuroscience* 81, 861-71.
- Lad S. P., Peterson D. A., Bradshaw R. A. and Neet K. E.** (2003). Individual and combined effects of TrkA and p75NTR nerve growth factor receptors. A role for the high affinity receptor site. *J Biol Chem* 278, 24808-17.
- Lagadec C., Meignan S., Adriaenssens E., Foveau B., Vanhecke E., Romon R., Toillon R. A., Oxombre B., Hondermarck H. and Le Bourhis X.** (2009). TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* 28, 1960-70.
- Lamballe F., Klein R. and Barbacid M.** (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 967-79.
- Laneve P., Di Marcotullio L., Gioia U., Fiori M. E., Ferretti E., Gulino A., Bozzoni I. and Caffarelli E.** (2007). The interplay between microRNAs and the neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase C controls proliferation of human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7957-62.
- Large T. H., Weskamp G., Helder J. C., Radeke M. J., Misko T. P., Shooter E. M. and Reichardt L. F.** (1989). Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system. *Neuron* 2, 1123-34.
- Le H. V., Minn A. J. and Massague J.** (2005). Cyclin-dependent kinase inhibitors uncouple cell cycle progression from mitochondrial apoptotic functions in DNA-damaged cancer cells. *J Biol Chem* 280, 32018-25.

- Lee R., Kermani P., Teng K. K. and Hempstead B. L.** (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**, 1945-8.
- Leoni C. and Valtorta F.** (2002). Constitutive TrkA activity in receptor-overexpressing PC12 clones. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 972-8.
- Lewis Kelso R., Colome-Grimmer M. I., Uchida T., Wang H. Q. and Wagner R. F., Jr.** (2006). p75(NGFR) immunostaining for the detection of perineural invasion by cutaneous squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg* **32**, 177-83.
- Li D., Tian Y., Ma Y. and Benjamin T.** (2004). p150(Sal2) is a p53-independent regulator of p21(WAF1/CIP). *Mol Cell Biol* **24**, 3885-93.
- Li Y., Zhang T., Schwartz S. J. and Sun D.** (2009a). New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential. *Drug Resist Updat* **12**, 17-27.
- Li Z., Chang Z., Chiao L. J., Kang Y., Xia Q., Zhu C., Fleming J. B., Evans D. B. and Chiao P. J.** (2009b). TrkBT1 induces liver metastasis of pancreatic cancer cells by sequestering Rho GDP dissociation inhibitor and promoting RhoA activation. *Cancer Res* **69**, 7851-9.
- Liao D. J. and Dickson R. B.** (2000). c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **7**, 143-64.
- Liepinsh E., Ilag L. L., Otting G. and Ibanez C. F.** (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* **16**, 4999-5005.
- Lim P., Robson M., Spaliviero J., McTavish K. J., Jimenez M., Zajac J. D., Handelsman D. J. and Allan C. M.** (2009). Sertoli cell androgen receptor DNA binding domain is essential for the completion of spermatogenesis. *Endocrinology* **150**, 4755-65.
- Linggi M. S., Burke T. L., Williams B. B., Harrington A., Kraemer R., Hempstead B. L., Yoon S. O. and Carter B. D.** (2005). Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) is an essential mediator of apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* **280**, 13801-8.
- Lu B., Pang P. T. and Woo N. H.** (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* **6**, 603-14.
- Luberg K., Wong J., Weickert C. S. and Timmusk T.** (2010). Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J Neurochem* **113**, 952-64.
- Mahadeo D., Kaplan L., Chao M. V. and Hempstead B. L.** (1994). High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem* **269**, 6884-91.
- Maisonpierre P. C., Belluscio L., Squinto S., Ip N. Y., Furth M. E., Lindsay R. M. and Yancopoulos G. D.** (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* **247**, 1446-51.
- Mamidipudi V., Li X. and Wooten M. W.** (2002). Identification of interleukin 1 receptor-associated kinase as a conserved component in the p75-neurotrophin receptor activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* **277**, 28010-8.

- Mamidipudi V., Lin C., Seibenhener M. L. and Wooten M. W.** (2004). Regulation of interleukin receptor-associated kinase (IRAK) phosphorylation and signaling by iota protein kinase C. *J Biol Chem* 279, 4161-5.
- Marchetti D., McQuillan D. J., Spohn W. C., Carson D. D. and Nicolson G. L.** (1996). Neurotrophin stimulation of human melanoma cell invasion: selected enhancement of heparanase activity and heparanase degradation of specific heparan sulfate subpopulations. *Cancer Res* 56, 2856-63.
- Marchetti D., Aucoin R., Blust J., Murry B. and Greiter-Wilke A.** (2004). p75 neurotrophin receptor functions as a survival receptor in brain-metastatic melanoma cells. *J Cell Biochem* 91, 206-15.
- Martin-Zanca D., Hughes S. H. and Barbacid M.** (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319, 743-8.
- Martin-Zanca D., Oskam R., Mitra G., Copeland T. and Barbacid M.** (1989). Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol* 9, 24-33.
- Mayer E. L., Dhakil S., Patel T., Sundaram S., Fabian C., Kozloff M., Qamar R., Volterra F., Parmar H., Samant M. and Burstein H. J.** (2010). SABRE-B: an evaluation of paclitaxel and bevacizumab with or without sunitinib as first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol*
- Mazella J.** (2001). Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* 13, 1-6.
- McCarthy J. V., Ni J. and Dixit V. M.** (1998). RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* 273, 16968-75.
- McDonald N. Q. and Hendrickson W. A.** (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73, 421-4.
- McGowan P. M., Ryan B. M., Hill A. D., McDermott E., O'Higgins N. and Duffy M. J.** (2007). ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression. *Clin Cancer Res* 13, 2335-43.
- McGowan P. M., McKiernan E., Bolster F., Ryan B. M., Hill A. D., McDermott E. W., Evoy D., O'Higgins N., Crown J. and Duffy M. J.** (2008). ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer. *Ann Oncol* 19, 1075-81.
- McGregor L. M., Baylin S. B., Griffin C. A., Hawkins A. L. and Nelkin B. D.** (1994). Molecular cloning of the cDNA for human TrkC (NTRK3), chromosomal assignment, and evidence for a splice variant. *Genomics* 22, 267-72.
- Mehlen P. and Bredesen D. E.** (2003). Meeting report: cellular dependence--old concept, new mechanisms. *Sci STKE* 2003, pe55.
- Metsis M., Timmusk T., Allikmets R., Saarma M. and Persson H.** (1992). Regulatory elements and transcriptional regulation by testosterone and retinoic acid of the rat nerve growth factor receptor promoter. *Gene* 121, 247-54.
- Metsis M.** (2001). Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* 58, 1014-20.

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

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

Moasser M. M. (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26, 6469-87.

Modi S., Stopeck A. T., Gordon M. S., Mendelson D., Solit D. B., Bagatell R., Ma W., Wheler J., Rosen N., Norton L., Cropp G. F., Johnson R. G., Hannah A. L. and Hudis C. A. (2007). Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2 overexpressing breast cancer: a phase I dose-escalation study. *J Clin Oncol* 25, 5410-7.

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

Moreno-Aspitia A., Morton R. F., Hillman D. W., Lingle W. L., Rowland K. M., Jr., Wiesenfeld M., Flynn P. J., Fitch T. R. and Perez E. A. (2009). Phase II trial of sorafenib in patients with metastatic breast cancer previously exposed to anthracyclines or taxanes: North Central Cancer Treatment Group and Mayo Clinic Trial N0336. *J Clin Oncol* 27, 11-5.

Mosyak L., Wood A., Dwyer B., Buddha M., Johnson M., Aulabaugh A., Zhong X., Presman E., Benard S., Kelleher K., Wilhelm J., Stahl M. L., Kriz R., Gao Y., Cao Z., Ling H. P., Pangalos M. N., Walsh F. S. and Somers W. S. (2006). The structure of the Lingo-1 ectodomain, a module implicated in central nervous system repair inhibition. *J Biol Chem* 281, 36378-90.

Moulder S. L., Symmans W. F., Booser D. J., Madden T. L., Lipsanen C., Yuan L., Brewster A. M., Cristofanilli M., Hunt K. K., Buchholz T. A., Zwiebel J., Valero V., Hortobagyi G. N. and Esteva F. J. (2008). Phase I/II study of G3139 (Bcl-2 antisense oligonucleotide) in combination with doxorubicin and docetaxel in breast cancer. *Clin Cancer Res* 14, 7909-16.

Mukai J., Hachiya T., Shoji-Hoshino S., Kimura M. T., Nadano D., Suvanto P., Hanaoka T., Li Y., Irie S., Greene L. A. and Sato T. A. (2000). NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem* 275, 17566-70.

Munck Petersen C., Nielsen M. S., Jacobsen C., Tauris J., Jacobsen L., Gliemann J., Moestrup S. K. and Madsen P. (1999). Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J* 18, 595-604.

Naderi A., Teschendorff A. E., Beigel J., Cariati M., Ellis I. O., Brenton J. D. and Caldas C. (2007). BEX2 is overexpressed in a subset of primary breast cancers and mediates nerve growth factor/nuclear factor-kappaB inhibition of apoptosis in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 67, 6725-36.

Naderi A. and Hughes-Davies L. (2009). Nerve growth factor/nuclear factor-kappaB pathway as a therapeutic target in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 135, 211-6.

- Nakagawara A., Liu X. G., Ikegaki N., White P. S., Yamashiro D. J., Nycum L. M., Biegel J. A. and Brodeur G. M.** (1995). Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics* 25, 538-46.
- Nalbandian A. and Djakiew D.** (2006). The p75(NTR) metastasis suppressor inhibits urokinase plasminogen activator, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in PC-3 prostate cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 23, 107-16.
- Naumann T., Casademunt E., Hollerbach E., Hofmann J., Dechant G., Frotscher M. and Barde Y. A.** (2002). Complete deletion of the neurotrophin receptor p75NTR leads to long-lasting increases in the number of basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurosci* 22, 2409-18.
- Naveilhan P., Neveu I., Baudet C., Funakoshi H., Wion D., Brachet P. and Metsis M.** (1996). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of the low-affinity neurotrophin receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 41, 259-68.
- Newsom-Davis T., Prieske S. and Walczak H.** (2009). Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis* 14, 607-23.
- Niederost B., Oertle T., Fritsche J., McKinney R. A. and Bandtlow C. E.** (2002). Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* 22, 10368-76.
- Nielsen M. S., Madsen P., Christensen E. I., Nykjaer A., Gliemann J., Kasper D., Pohlmann R. and Petersen C. M.** (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J* 20, 2180-90.
- Normanno N., Morabito A., De Luca A., Piccirillo M. C., Gallo M., Maiello M. R. and Perrone F.** (2009). Target-based therapies in breast cancer: current status and future perspectives. *Endocr Relat Cancer* 16, 675-702.
- Nyborg A. C., Ladd T. B., Zwizinski C. W., Lah J. J. and Golde T. E.** (2006). Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. *Mol Neurodegener* 1, 3.
- Nykjaer A., Lee R., Teng K. K., Jansen P., Madsen P., Nielsen M. S., Jacobsen C., Kliemann M., Schwarz E., Willnow T. E., Hempstead B. L. and Petersen C. M.** (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843-8.
- Nykjaer A., Willnow T. E. and Petersen C. M.** (2005). p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 15, 49-57.
- Ohira K., Kumanogoh H., Sahara Y., Homma K. J., Hirai H., Nakamura S. and Hayashi M.** (2005). A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J Neurosci* 25, 1343-53.
- Ohrt T., Mancini A., Tamura T. and Niedenthal R.** (2004). c-Cbl binds to tyrosine-phosphorylated neurotrophin receptor p75 and induces its ubiquitination. *Cell Signal* 16, 1291-8.
- Okumura T., Tsunoda S., Mori Y., Ito T., Kikuchi K., Wang T. C., Yasumoto S. and Shimada Y.** (2006). The biological role of the low-affinity p75 neurotrophin receptor in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 5096-103.

- Orimo A., Gupta P. B., Sgroi D. C., Arenzana-Seisdedos F., Delaunay T., Naeem R., Carey V. J., Richardson A. L. and Weinberg R. A.** (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335-48.
- Osborne C., Wilson P. and Tripathy D.** (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 9, 361-77.
- Paiardini A. and Caputo V.** (2008). Insights into the interaction of sortilin with proneurotrophins: a computational approach. *Neuropeptides* 42, 205-14.
- Palko M. E., Coppola V. and Tessarollo L.** (1999). Evidence for a role of truncated trkC receptor isoforms in mouse development. *J Neurosci* 19, 775-82.
- Pang P. T., Teng H. K., Zaitsev E., Woo N. T., Sakata K., Zhen S., Teng K. K., Yung W. H., Hempstead B. L. and Lu B.** (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487-91.
- Papatsoris A. G., Liolitsa D. and Deliveliotis C.** (2007). Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 16, 303-9.
- Parkhurst C. N., Zampieri N. and Chao M. V.** (2010). Nuclear localization of the p75 neurotrophin receptor intracellular domain. *J Biol Chem* 285, 5361-8.
- Patrawala L., Calhoun T., Schneider-Broussard R., Zhou J., Claypool K. and Tang D. G.** (2005). Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2⁺ and ABCG2⁻ cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 65, 6207-19.
- Perez P., Coll P. M., Hempstead B. L., Martin-Zanca D. and Chao M. V.** (1995). NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol Cell Neurosci* 6, 97-105.
- Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslen L. A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S. X., Lonning P. E., Borresen-Dale A. L., Brown P. O. and Botstein D.** (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-52.
- Persson H., Ayer-Le Lievre C., Soder O., Villar M. J., Metsis M., Olson L., Ritzen M. and Hokfelt T.** (1990). Expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in Sertoli cells downregulated by testosterone. *Science* 247, 704-7.
- Petersen C. M., Nielsen M. S., Nykjaer A., Jacobsen L., Tommerup N., Rasmussen H. H., Roigaard H., Gliemann J., Madsen P. and Moestrup S. K.** (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem* 272, 3599-605.
- Pincheira R., Baerwald M., Dunbar J. D. and Donner D. B.** (2009). Sall2 is a novel p75NTR-interacting protein that links NGF signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth. *EMBO J* 28, 261-73.
- Plo I., Bono F., Bezombes C., Alam A., Bruno A. and Laurent G.** (2004). Nerve growth factor-induced protein kinase C stimulation contributes to TrkA-dependent inhibition of p75 neurotrophin receptor sphingolipid signaling. *J Neurosci Res* 77, 465-74.

- Polyak K. and Hahn W. C.** (2006). Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 12, 296-300.
- Ponti D., Costa A., Zaffaroni N., Pratesi G., Petrangolini G., Coradini D., Pilotti S., Pierotti M. A. and Daidone M. G.** (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65, 5506-11.
- Popnikolov N. K., Cavone S. M., Schultz P. M. and Garcia F. U.** (2005). Diagnostic utility of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) as a marker of breast myoepithelial cells. *Mod Pathol* 18, 1535-41.
- Powell J. C., Twomey C., Jain R. and McCarthy J. V.** (2009). Association between Presenilin-1 and TRAF6 modulates regulated intramembrane proteolysis of the p75NTR neurotrophin receptor. *J Neurochem* 108, 216-30.
- Quistgaard E. M., Madsen P., Groftehaug M. K., Nissen P., Petersen C. M. and Thirup S. S.** (2009). Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nat Struct Mol Biol* 16, 96-8.
- Rabizadeh S., Oh J., Zhong L. T., Yang J., Bitler C. M., Butcher L. L. and Bredesen D. E.** (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261, 345-8.
- Radeke M. J., Misko T. P., Hsu C., Herzenberg L. A. and Shooter E. M.** (1987). Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* 325, 593-7.
- Radziejewski C. and Robinson R. C.** (1993). Heterodimers of the neurotrophic factors: formation, isolation, and differential stability. *Biochemistry* 32, 13350-6.
- Reis-Filho J. S., Steele D., Di Palma S., Jones R. L., Savage K., James M., Milanezi F., Schmitt F. C. and Ashworth A.** (2006). Distribution and significance of nerve growth factor receptor (NGFR/p75NTR) in normal, benign and malignant breast tissue. *Mod Pathol* 19, 307-19.
- Rodriguez-Tebar A., Dechant G. and Barde Y. A.** (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4, 487-92.
- Rodriguez-Tebar A., Dechant G., Gotz R. and Barde Y. A.** (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* 11, 917-22.
- Romon R., Adriaenssens E., Lagadec C., Germain E., Hondermarck H. and Le Bourhis X.** (2010). Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. *Mol Cancer* 9, 157.
- Rose C. R., Blum R., Pichler B., Lepier A., Kafitz K. W. and Konnerth A.** (2003). Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426, 74-8.
- Rosen L. S., Ashurst H. L. and Chap L.** (2010). Targeting signal transduction pathways in metastatic breast cancer: a comprehensive review. *Oncologist* 15, 216-35.
- Rosenthal A., Goeddel D. V., Nguyen T., Lewis M., Shih A., Laramée G. R., Nikolics K. and Winslow J. W.** (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* 4, 767-73.

- Ross J. S., Slodkowska E. A., Symmans W. F., Puztai L., Ravdin P. M. and Hortobagyi G. N.** (2009). The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 14, 320-68.
- Roux P. P., Bhakar A. L., Kennedy T. E. and Barker P. A.** (2001). The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 276, 23097-104.
- Roux P. P. and Barker P. A.** (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67, 203-33.
- Roy P. G. and Thompson A. M.** (2006). Cyclin D1 and breast cancer. *Breast* 15, 718-27.
- Ryden M., Hempstead B. and Ibanez C. F.** (1997). Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* 272, 16322-8.
- Salehi A. H., Roux P. P., Kubu C. J., Zeindler C., Bhakar A., Tannis L. L., Verdi J. M. and Barker P. A.** (2000). NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 27, 279-88.
- Salehi A. H., Xanthoudakis S. and Barker P. A.** (2002). NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 277, 48043-50.
- Sato T., Irie S., Kitada S. and Reed J. C.** (1995). FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268, 411-5.
- Schlotter C. M., Vogt U., Allgayer H. and Brandt B.** (2008). Molecular targeted therapies for breast cancer treatment. *Breast Cancer Res* 10, 211.
- Schnitt S. J.** (2003). Benign breast disease and breast cancer risk: morphology and beyond. *Am J Surg Pathol* 27, 836-41.
- Seidah N. G., Benjannet S., Pareek S., Chretien M. and Murphy R. A.** (1996). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett* 379, 247-50.
- Shelton D. L., Sutherland J., Gripp J., Camerato T., Armanini M. P., Phillips H. S., Carroll K., Spencer S. D. and Levinson A. D.** (1995). Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci* 15, 477-91.
- Shipitsin M. and Polyak K.** (2008). The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Invest* 88, 459-63.
- Shonukan O., Bagayogo I., McCrea P., Chao M. and Hempstead B.** (2003). Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin. *Oncogene* 22, 3616-23.
- Sniderhan L. F., Stout A., Lu Y., Chao M. V. and Maggirwar S. B.** (2008). Ankyrin-rich membrane spanning protein plays a critical role in nuclear factor-kappa B signaling. *Mol Cell Neurosci* 38, 404-16.

- Soland T. M., Brusevold I. J., Koppang H. S., Schenck K. and Bryne M.** (2008). Nerve growth factor receptor (p75 NTR) and pattern of invasion predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* 53, 62-72.
- Sole C., Dolcet X., Segura M. F., Gutierrez H., Diaz-Meco M. T., Gozzelino R., Sanchis D., Bayascas J. R., Gallego C., Moscat J., Davies A. M. and Comella J. X.** (2004). The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kapp B signaling. *J Cell Biol* 167, 479-92.
- Sorlie T., Perou C. M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Thorsen T., Quist H., Matese J. C., Brown P. O., Botstein D., Eystein Lonning P. and Borresen-Dale A. L.** (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-74.
- Sortino M. A., Condorelli F., Vancheri C., Chiarenza A., Bernardini R., Consoli U. and Canonico P. L.** (2000). Mitogenic effect of nerve growth factor (NGF) in LNCaP prostate adenocarcinoma cells: role of the high- and low-affinity NGF receptors. *Mol Endocrinol* 14, 124-36.
- Sotiriou C., Neo S. Y., McShane L. M., Korn E. L., Long P. M., Jazaeri A., Martiat P., Fox S. B., Harris A. L. and Liu E. T.** (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10393-8.
- Steinman R. A. and Johnson D. E.** (2000). p21WAF1 prevents down-modulation of the apoptotic inhibitor protein c-IAP1 and inhibits leukemic apoptosis. *Mol Med* 6, 736-49.
- Stendahl M., Kronblad A., Ryden L., Emdin S., Bengtsson N. O. and Landberg G.** (2004). Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *Br J Cancer* 90, 1942-8.
- Stoilov P., Castren E. and Stamm S.** (2002). Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 1054-65.
- Suzuki A., Tsutomi Y., Miura M. and Akahane K.** (1999a). Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene* 18, 1239-44.
- Suzuki A., Tsutomi Y., Yamamoto N., Shibutani T. and Akahane K.** (1999b). Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. *Mol Cell Biol* 19, 3842-7.
- Suzuki A., Kawano H., Hayashida M., Hayasaki Y., Tsutomi Y. and Akahane K.** (2000). Procaspase 3/p21 complex formation to resist fas-mediated cell death is initiated as a result of the phosphorylation of p21 by protein kinase A. *Cell Death Differ* 7, 721-8.
- Tabassum A., Khwaja F. and Djakiew D.** (2003). The p75(NTR) tumor suppressor induces caspase-mediated apoptosis in bladder tumor cells. *Int J Cancer* 105, 47-52.
- Tacconelli A., Farina A. R., Cappabianca L., Desantis G., Tessitore A., Vetuschi A., Sferra R., Rucci N., Argenti B., Screpanti I., Gulino A. and Mackay A. R.** (2004). TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 6, 347-60.

- Tacconelli A., Farina A. R., Cappabianca L., Cea G., Panella S., Chioda A., Gallo R., Cinque B., Sferra R., Vetuschi A., Campese A. F., Screpanti I., Gulino A. and Mackay A. R.** (2007). TrkAIII expression in the thymus. *J Neuroimmunol* 183, 151-61.
- Tagliabue E., Castiglioni F., Ghirelli C., Modugno M., Asnaghi L., Somenzi G., Melani C. and Menard S.** (2000). Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 275, 5388-94.
- Tanaka H., Yamashita T., Asada M., Mizutani S., Yoshikawa H. and Tohyama M.** (2002). Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *J Cell Biol* 158, 321-9.
- Teng H. K., Teng K. K., Lee R., Wright S., Tevar S., Almeida R. D., Kermani P., Torkin R., Chen Z. Y., Lee F. S., Kraemer R. T., Nykjaer A. and Hempstead B. L.** (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 25, 5455-63.
- Tokusashi Y., Asai K., Tamakawa S., Yamamoto M., Yoshie M., Yaginuma Y., Miyokawa N., Aoki T., Kino S., Kasai S. and Ogawa K.** (2005). Expression of NGF in hepatocellular carcinoma cells with its receptors in non-tumor cell components. *Int J Cancer* 114, 39-45.
- Trim N., Morgan S., Evans M., Issa R., Fine D., Afford S., Wilkins B. and Iredale J.** (2000). Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 156, 1235-43.
- Truzzi F., Marconi A., Lotti R., Dallaglio K., French L. E., Hempstead B. L. and Pincelli C.** (2008). Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* 128, 2031-40.
- Underwood C. K., Reid K., May L. M., Bartlett P. F. and Coulson E. J.** (2008). Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase. *Mol Cell Neurosci* 37, 346-58.
- Urfer R., Tsoulfas P., O'Connell L., Shelton D. L., Parada L. F. and Presta L. G.** (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J* 14, 2795-805.
- Urrea S., Escudero C. A., Ramos P., Lisbona F., Allende E., Covarrubias P., Parraguez J. I., Zampieri N., Chao M. V., Annaert W. and Bronfman F. C.** (2007). TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal gamma-secretase-mediated release of the p75 intracellular domain. *J Biol Chem* 282, 7606-15.
- Venkitaraman A. R.** (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108, 171-82.
- Vilar M., Murillo-Carretero M., Mira H., Magnusson K., Besset V. and Ibanez C. F.** (2006). Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle. *EMBO J* 25, 1219-30.
- Vilar M., Charalampopoulos I., Kenchappa R. S., Simi A., Karaca E., Reversi A., Choi S., Bothwell M., Mingarro I., Friedman W. J., Schiavo G., Bastiaens P. I., Verveer P. J., Carter B. D. and Ibanez C. F.** (2009). Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* 62, 72-83.

- Volosin M., Trotter C., Cragnolini A., Kenchappa R. S., Light M., Hempstead B. L., Carter B. D. and Friedman W. J.** (2008). Induction of proneurotrophins and activation of p75NTR-mediated apoptosis via neurotrophin receptor-interacting factor in hippocampal neurons after seizures. *J Neurosci* 28, 9870-9.
- von Schack D., Casademunt E., Schweigreiter R., Meyer M., Bibel M. and Dechant G.** (2001). Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nat Neurosci* 4, 977-8.
- Walch E. T., Albino A. P. and Marchetti D.** (1999). Correlation of overexpression of the low-affinity p75 neurotrophin receptor with augmented invasion and heparanase production in human malignant melanoma cells. *Int J Cancer* 82, 112-20.
- Wang K. C., Kim J. A., Sivasankaran R., Segal R. and He Z.** (2002). P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420, 74-8.
- Wang L., Rahn J. J., Lun X., Sun B., Kelly J. J., Weiss S., Robbins S. M., Forsyth P. A. and Senger D. L.** (2008). Gamma-secretase represents a therapeutic target for the treatment of invasive glioma mediated by the p75 neurotrophin receptor. *PLoS Biol* 6, e289.
- Wang L. H., Chan J. L. and Li W.** (2007). Rapamycin together with herceptin significantly increased anti-tumor efficacy compared to either alone in ErbB2 over expressing breast cancer cells. *Int J Cancer* 121, 157-64.
- Wang X., Bauer J. H., Li Y., Shao Z., Zetoune F. S., Cattaneo E. and Vincenz C.** (2001). Characterization of a p75(NTR) apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *J Biol Chem* 276, 33812-20.
- Wang Y. M., Seibenhener M. L., Vandenplas M. L. and Wooten M. W.** (1999). Atypical PKC zeta is activated by ceramide, resulting in coactivation of NF-kappaB/JNK kinase and cell survival. *J Neurosci Res* 55, 293-302.
- Watson F. L., Porcionatto M. A., Bhattacharyya A., Stiles C. D. and Segal R. A.** (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J Neurobiol* 39, 323-36.
- Weeraratna A. T., Dalrymple S. L., Lamb J. C., Denmeade S. R., Miknyoczki S., Dionne C. A. and Isaacs J. T.** (2001). Pan-trk inhibition decreases metastasis and enhances host survival in experimental models as a result of its selective induction of apoptosis of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 7, 2237-45.
- Wehrman T., He X., Raab B., Dukipatti A., Blau H. and Garcia K. C.** (2007). Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* 53, 25-38.
- Weiss R. H.** (2003). p21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers. *Cancer Cell* 4, 425-9.
- Wen D., Wildes C. P., Silvian L., Walus L., Mi S., Lee D. H., Meier W. and Pepinsky R. B.** (2005). Disulfide structure of the leucine-rich repeat C-terminal cap and C-terminal stalk region of Nogo-66 receptor. *Biochemistry* 44, 16491-501.
- Weskamp G., Schlondorff J., Lum L., Becherer J. D., Kim T. W., Saftig P., Hartmann D., Murphy G. and Blobel C. P.** (2004). Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J Biol Chem* 279, 4241-9.

- Westergaard U. B., Sorensen E. S., Hermey G., Nielsen M. S., Nykjaer A., Kirkegaard K., Jacobsen C., Gliemann J., Madsen P. and Petersen C. M.** (2004). Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *J Biol Chem* 279, 50221-9.
- Wiezorek J., Holland P. and Graves J.** (2010). Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. *Clin Cancer Res* 16, 1701-8.
- Wilhelm S. M., Adnane L., Newell P., Villanueva A., Llovet J. M. and Lynch M.** (2008). Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 7, 3129-40.
- Wong S. T., Henley J. R., Kanning K. C., Huang K. H., Bothwell M. and Poo M. M.** (2002). A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* 5, 1302-8.
- Wooten M. W., Seibenhener M. L., Mamidipudi V., Diaz-Meco M. T., Barker P. A. and Moscat J.** (2001). The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J Biol Chem* 276, 7709-12.
- Wooten M. W., Geetha T., Seibenhener M. L., Babu J. R., Diaz-Meco M. T. and Moscat J.** (2005). The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-kappaB activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *J Biol Chem* 280, 35625-9.
- Yamashita T., Tucker K. L. and Barde Y. A.** (1999). Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24, 585-93.
- Yamashita T. and Tohyama M.** (2003). The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 6, 461-7.
- Yano H., Torkin R., Martin L. A., Chao M. V. and Teng K. K.** (2009). Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: evidence for retrograde-directed cell killing. *J Neurosci* 29, 14790-802.
- Ye X., Mehlen P., Rabizadeh S., VanArsdale T., Zhang H., Shin H., Wang J. J., Leo E., Zapata J., Hauser C. A., Reed J. C. and Bredesen D. E.** (1999). TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* 274, 30202-8.
- Yoshida K. and Miki Y.** (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* 95, 866-71.
- Yu C., Bruzek L. M., Meng X. W., Gores G. J., Carter C. A., Kaufmann S. H. and Adjei A. A.** (2005). The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene* 24, 6861-9.
- Yuanlong H., Haifeng J., Xiaoyin Z., Jialin S., Jie L., Li Y., Huahong X., Jiugang S., Yanglin P., Kaichun W., Jie D. and Daiming F.** (2008). The inhibitory effect of p75 neurotrophin receptor on growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 268, 110-9.
- Zampieri N., Xu C. F., Neubert T. A. and Chao M. V.** (2005). Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains. *J Biol Chem* 280, 14563-71.

Zapata J. M., Pawlowski K., Haas E., Ware C. F., Godzik A. and Reed J. C. (2001). A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J Biol Chem* 276, 24242-52.

Zhang W., Zeng Y. S., Wang J. M., Ding Y., Li Y. and Wu W. (2009). Neurotrophin-3 improves retinoic acid-induced neural differentiation of skin-derived precursors through a p75NTR-dependent signaling pathway. *Neurosci Res* 64, 170-6.

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

BIBLIOGRAPHIE

Résumé

Les données accumulées par notre laboratoire montrent une action pro-tumorale des neurotrophines dans le cancer du sein *via* notamment des effets anti-apoptotiques du NGF, du BDNF et de la NT4/5. Ces effets sont tous relayés par leur récepteur commun p75^{NTR}, plaçant celui-ci au centre de la signalisation des neurotrophines. A travers mes travaux de thèse, je me suis donc appliquée à préciser le rôle de ce récepteur et sa signalisation dans le cancer du sein. Pour cela, nous avons établi une lignée cellulaire surexprimant de manière inductible p75^{NTR}. Ce nouveau modèle d'étude a permis d'une part de confirmer l'action anti-apoptotique du récepteur et d'autre part, de mettre en évidence son rôle dans la régulation du cycle cellulaire. Aussi, nous avons montré que la survie induite par le récepteur était associée à une augmentation de la protéine anti-apoptotique c-IAP1, à une diminution du clivage de PARP et des procaspases-9 et -3 ainsi qu'à une diminution du relargage du cytochrome C par la mitochondrie ce qui suggère une inhibition de la voie intrinsèque (ou mitochondriale) de l'apoptose. De plus, p75^{NTR} ralentit la prolifération en provoquant une accumulation des cellules dans les phases G0/G1 du cycle cellulaire. Cet effet anti-prolifératif est associé à une diminution de la phosphorylation de Rb et à une augmentation de la protéine p21^{Waf1}. Nos travaux montrent que, *in vitro*, l'invalidation par siRNA de p21^{Waf1}, non seulement restaure la prolifération, mais abolit totalement la survie induite par le récepteur p75^{NTR}, faisant de p21^{Waf1} une protéine clé dans la signalisation de p75^{NTR}. De plus, *in vivo*, la surexpression de p75^{NTR} conduit à une augmentation du volume tumoral et à une résistance accrue à l'apoptogène TRAIL. Enfin, l'analyse de la protéolyse de p75^{NTR} montre que celui-ci subit deux clivages successifs dans les cellules cancéreuses mammaires. Le premier clivage réalisé par l'enzyme ADAM17/TACE semble indispensable à l'effet anti-apoptotique de p75^{NTR}. Le second clivage, réalisé par le complexe γ -sécrétase, semble quant à lui ne pas intervenir dans cet effet suggérant plutôt un processus de dégradation du récepteur.

Ces travaux ont permis d'approfondir les mécanismes d'action de p75^{NTR} dans les cellules cancéreuses mammaires et suggèrent que ce récepteur pourrait contribuer à la croissance tumorale en favorisant la résistance aux drogues anticancéreuses.