

THESE

Présentée à
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Ecole doctorale Biologie-Santé

Par

Elsa VANHECKE

EXPRESSION ET EFFETS BIOLOGIQUES DES NEUROTROPHINES DANS LE CANCER DU SEIN

Soutenue le 16 Octobre 2008 devant la commission d'examen :

Rapporteurs :	Dr. Marc BRACKE Dr. Anthony GONCALVES
Président de jury :	Pr. Philippe DELANNOY
Examineur :	Dr. Patrick MEHLEN
Co-encadrant :	Pr. Eric ADRIAENSSENS
Directeur de thèse :	Pr. Hubert HONDERMARCK

Remerciements

Les travaux de thèse présentés dans ce mémoire ont été réalisés sous le tutorat scientifique de Monsieur le Professeur Hubert Hondermarck, et co-encadrés par Monsieur le Professeur Eric Adriaenssens, dans l'unité INSERM U-908 « Signalisation des facteurs de croissance dans le cancer du sein. Protéomique fonctionnelle », de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Pendant les trois premières années, un soutien à ces recherches a été apporté par une allocation du ministère de la recherche, puis par une aide individuelle de 4^{ème} année de thèse financée par l'Association de Recherche contre le Cancer (ARC).

Remerciements

Remerciements,

Je tiens à remercier tout d'abord Hubert Hondermarck pour m'avoir donnée l'opportunité de travailler au sein de son laboratoire dans un domaine de recherche si passionnant. Nos cinq années de collaboration, d'échange et de débats m'auront permis d'évoluer, de mûrir et d'assouvir ma curiosité scientifique. Vous m'avez toujours poussé à donner le meilleur de moi-même !

Eric, monsieur le professeur, un grand merci à mon meilleur allié de BM dans ce monde de « protéomiqueux », tu m'auras co-encadrée et soutenue avec enthousiasme, bonne humeur, humour et surtout beaucoup de post-it !

Je souhaite remercier vivement, pour l'honneur qu'ils me font, Messieurs les Docteurs Marc Bracke et Anthony Gonçalves, qui ont acceptés d'être les rapporteurs de cette thèse et Monsieur le Docteur Patrick Mehlen qui a accepté d'examiner mon travail.

Un remerciement spécial pour Monsieur le professeur Philippe Delannoy qui a accepté de présider ce jury et qui m'aura permis un accès permanent et non restreint à ses installations (MX4000, nanodrop et presque l'agilent...) et de faire pratiquement partie du C9.

Cette odyssée scientifique et humaine, restera à mes yeux particulièrement enrichissante grâce à tous ceux qui m'ont accompagnée, portée, soutenue, supportée, conseillée, critiquée, amusée, aidée, vannée ...

Notamment les membres de la SN3 team qui m'ont si facilement acceptée il y a 5 ans autour d'un thé et à qui les mots Wahagnies, sylvestre et 2012 diront forcément quelque chose : Un énorme merci à

- Samisam dit gadget, croquettes, vanneur, gaffeur, Imaging, vista, lucas, Red Hot, gastro, orly sud... et ami, tu es le dernier maillon de cette team et notre cagibi se souviendra longtemps de notre cohabitation sans accroc... Un grand merci pour tout (l'énumération serait trop longue), et un bisou à ta Nath pour toute ces corection! A votre tour maintenant !!

Remerciements

- Emma, mes débuts dans la recherche n'auront pas eu la même saveur sans toi, merci de m'avoir tant apportée au niveau professionnel et personnel. Tes conseils, ta vision de la recherche, ta capacité à relativiser et ton incroyable motivation sont une vraie bouffée d'oxygène.
- Nath, ton sourire, ta serviabilité, ta bonne humeur, ton autonomie, ton indépendance, ton sens de la communication, ton encadrement, ta patience... pour tout ça, tu es un exemple pour moi.
- Ginger, tes talons, ta voix aiguë (très très aiguë) et tes pissettes volantes, mais aussi ta culture scientifique qui m'a été très bénéfique et surtout ton enthousiasme et ta joie de vivre qui nous ont valu des soirées « crêpes », « sing star » ou « nouvelle star » inoubliables...
- Channichou, le rock n'a plus de secret pour nous ! Tu resteras le spécialiste de la bonne ambiance, des bonnes blagues et du mot qui reconforte surtout en cas d'attaque incontrôlée de tableau. J'ai hâte de visiter LA !!!
- Alessandro pour ton esprit scientifique, ta « cruciverbicité » étonnante, ton incroyable gentillesse, ton sens de l'humour et ton tiroir magique parti trop tôt et bien sûr pour tous nos essais de salsa dans les labos, couloirs et bars.

Un grand merci à la relève de la team et nos pauses devenues « caféinées » et « houblonnées » :

- Yohann, nous les béliers on se comprend... surtout quand notre chef est ... bélier ! Ton évolution aura été spectaculaire durant ces 4 années, tu bois enfin de la Ename et de la Chouffe !
- Stef, je me souviendrais longtemps de nos discussions en salle de culture, de nos soirées si mémorables notamment autour d'un repas thaï... et de nos canapés marrons ! Bon courage à la dernière représentante féminine, ils n'ont qu'à bien se tenir ! ...
- Vaik ☺, mon meilleur élève de BM... en tout cas le plus souriant et le plus attentionné, tes « mmmm, salut toi » me manqueront, au fait n'oublie pas le soupçon de bio dans ta thèse ...
- Rodrigue, j'espère avoir contribué à ma manière à l'éclosion du nouveau Rod, plus confiant et plus sûr de lui, continue comme ça !
- les « p'tits jeunes », Cyril , et JP, l'avenir est devant vous, je vous souhaite la meilleure des thèses.

Remerciements

Et tous les membres de l'U908,

- Xuefen bien sûr, pour votre sympathie, votre soutien et votre esprit critique,
- le trio de minis chefs, Manue pour tes visions conceptuelles si utiles à ma construction scientifique, ton esprit décalé, ta générosité, ton aide et ton soutien, je suis heureuse de te compter dans mon « réseau », Tof' pour avoir si bien appréhendé l'évolution du labo... et pour ta gentillesse, Bob pour ta zen attitude... et ta disponibilité.

Je n'oublie pas Ikram qui m'a initiée à la culture des cellules, les 2 bénédictees ATER pour nos discussions sur l'avenir, Valérie C pour nos clones, Isa pour les litres de milieu de culture et les coupes, Mathilde pour ton aide en BM, Johann pour les commandes et les gels, Valérie pour avoir outrepassé notre mauvais départ et avoir passé mes milliers d'euros de commande et Véro pour donner tous les jours une nouvelle jeunesse au 3^{ème} étage!

Je tiens à remercier sincèrement les membres des autres laboratoires qui m'ont apportés leur aide toujours avec le sourire :

- Adeline, tu auras essayé de me faire aimer les trappes ioniques, les m/z, les pics, les spectres, les SIM-MS, les Tof et Tof-Tof... certes en vain mais tu resteras ma spectro-masseuse préférée !
- Les membres du C9, Aurélie, les Sylvain : Julien (je n'oublie pas tes questions rocambolesques et tes vanes au SN3) et Lehoux, Béatrice, Marie-Ange, Sophie... pour les millions de créneaux réservés toujours avec une grande sympathie !

Un merci particulier à ma famille et à tous ceux qui ne sont jamais loin, ils ont chacun et à leur manière contribué à la bonne réalisation de ce travail. Evidemment, mes parents pour leur amour et leur soutien sans faille et mes frères qui m'ont toujours poussé à me dépasser. Je n'oublie pas mamouche, marraine et mes grands-pères partis pendant ma thèse, je vous l'annonce ça y'est j'ai terminé mes examens ! Enfin, Brigitte et Patrick pour leur écoute et leur affection.

Je terminerai par Guillaume, bien sûr, sans qui tout serait tellement plus difficile...

Sommaire

SOMMAIRE	1
SOMMAIRE DES FIGURES	4
SOMMAIRE DES TABLES	5
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	9
I. LES NEUROTROPHINES ET LEURS RECEPTEURS	11
I. A. Les neurotrophines	11
I. A. 1. Découverte des neurotrophines (NT) de mammifères	11
I. A. 2. Structures : du gène aux protéines	12
I. A. 2. a) Les gènes des neurotrophines.....	12
I. A. 2. b) Les protéines des neurotrophines.....	13
I. A. 3. Dimérisation des neurotrophines	14
I. B. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (Trk)	16
I. B. 1. Découverte des Trk	16
I. B. 2. Les gènes des récepteurs tyrosine kinase	16
I. B. 3. Structure générale protéique des récepteurs tyrosine kinase.....	18
I. B. 4. Isoformes des récepteurs tyrosine kinase.....	19
I. B. 4. a) TrkA.....	20
I. B. 4. b) TrkB.....	21
• TrkB-T1	21
• TrkB-T-shc	24
I. B. 4. c) TrkC.....	24
I. B. 5. Intéraction des neurotrophines et de leur Trk.....	25
I. B. 6. Voies de signalisation des Trk.....	27
I. B. 6. a) Activation des Trk.....	27
I. B. 6. b) Voies de signalisation activées par les Trk.....	28
• La voie des MAP kinases	29
• La voie PI3K / AKT.....	29
• La voie PLCy / PKC	30
I. C. Le récepteur p75^{NTR}	31
I. C. 1. Découverte de p75 ^{NTR}	31
I. C. 2. Le gène de p75 ^{NTR}	31
I. C. 3. Structure protéique de p75 ^{NTR}	32
I. C. 4. Les différentes formes du récepteur p75 ^{NTR}	34
I. C. 5. Interaction des ligands au récepteur p75 ^{NTR}	35
I. C. 6. Voies de signalisation activées par p75 ^{NTR}	37
I. C. 6. a) Les voies apoptotiques	38
• Les adaptateurs impliqués dans l'apoptose.....	38
• La voie des céramides	40
I. C. 6. b) La voie de survie cellulaire.....	40
I. C. 6. c) La voie RhoA.....	41
I. C. 7. Les coRécepteurs de p75 ^{NTR}	42
I. C. 7. a) Les récepteurs tyrosine kinase	43

Sommaires

• Association p75 ^{NTR} -Trk	43
• Signalisation des complexes p75 ^{NTR} -Trk.....	44
I. C. 7. b) La sortiline	44
I. C. 7. c) Les récepteurs Nogo et LINGO-1.....	46
I. D. Rôles physiologiques et pathologiques des neurotrophines	47
I. D. 1. Les neurotrophines et le développement du système nerveux.....	47
I. D. 1. a) Les KO des neurotrophines	47
I. D. 1. b) Le contexte cellulaire	49
I. D. 2. Les neurotrophines et le cancer.....	50
I. D. 2. a) TrkA, NGF et cancers	50
• Effet pro-tumoral de TrkA.....	50
• Effet anti-tumoral de TrkA	51
I. D. 2. b) TrkB, BDNF et cancers	52
• Effet pro-tumoral de TrkB	52
• Effet anti-tumoral de TrkB	54
I. D. 2. c) TrkC, NT-3 et cancers.....	55
• Effet pro-tumoral de TrkC	55
• Effet anti-tumoral de TrkC	57
I. D. 2. d) P75 ^{NTR} et cancers.....	58
• Effet pro-tumoral de p75 ^{NTR}	58
• Effet anti-tumoral de p75 ^{NTR}	59
II. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCERISATION.....	61
II. A. La glande mammaire normale	61
II. A. 1. Structure de la glande mammaire.....	61
II. A. 2. Un développement sous contrôle des hormones	63
II. B. La cancérisation de la glande mammaire.....	65
II. B. 1. Généralités sur le cancer du sein	65
II. B. 2. La tumorigenèse mammaire	66
II. B. 2. a) Les stades de développement d'un cancer	66
II. B. 2. b) Les tumeurs mammaires	68
• Les types de cancer du sein.....	68
• Les métastases des cellules cancéreuses de sein.....	69
• La classification des cancers du sein	70
II. B. 2. c) Mécanismes de la tumorigenèse mammaire.....	72
• Les anomalies génétiques	72
• Concept des cellules souches cancéreuses	76
• Les facteurs régulateurs.....	79
III. OBJECTIFS DE LA THESE.....	82
III. A. Contexte de la thèse	82
III. B. Les objectifs de la thèse	83
CHAPITRE 2 : RÉSULTATS.....	85
ARTICLE 1: NERVE GROWTH FACTOR IS A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET IN BREAST CANCER.....	87
Travaux supplémentaires : Inhibition stable du Nerve Growth Factor par une stratégie de shRNA.....	89

Sommaires

ARTICLE 2 : BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR AND NEUROTROPHIN-4/5 ARE INVOLVED IN BREAST CANCER.	103
Travaux supplémentaires: Les isoformes de TrkB dans le cancer du sein	105
Travaux supplémentaires: Régulation transcriptionnelle des neurotrophines	111
Travaux supplémentaires : Etude de l'expression des neurotrophines dans le modèle de transformation de Weinberg.	116
 CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	119
 BIBLIOGRAPHIE	131
 CHAPITRE 4 : ANNEXES.....	165
 ARTICLE 3 : TRKA OVEREXPRESSION PROMOTES GROWTH AND METASTASIS OF BREAST CANCER CELLS.....	167
 VALORISATION DES COMPETENCES, LE NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE	169

Sommaire des figures

Figure 1. Illustration de l'apparition des gènes des neurotrophines des vertébrés.	12
Figure 2. Représentation schématique des 4 protéines de la famille des neurotrophines.	14
Figure 3. Structure du β -NGF.	15
Figure 4. Liaison des neurotrophines aux récepteurs tyrosine kinase.	16
Figure 5. Illustration de l'apparition des gènes des Trk des vertébrés.	17
Figure 6. Représentation schématique des récepteurs tyrosine kinase A, B et C (TrkA, TrkB, TrkC).	19
Figure 7. Isoformes de TrkA.	20
Figure 8. Isoformes majoritaires de TrkB.	21
Figure 9. Cristallographie des domaines de liaison des neurotrophines aux récepteurs TrkA, TrkB et TrkC. ..	25
Figure 10. Structure du complexe TrkB-d5 :NT-4/5.	26
Figure 11. Représentation schématique des voies de signalisation des Trk.	28
Figure 12. Représentation schématique du récepteur des neurotrophines $p75^{NTR}$	33
Figure 13. Les différentes formes du récepteur $p75^{NTR}$	34
Figure 14. Structure du complexe NGF- $p75^{NTR}$	36
Figure 15. Représentation schématique des voies de signalisation de $p75^{NTR}$	37
Figure 16. Représentation schématique des co-récepteurs de $p75^{NTR}$	42
Figure 17. Représentation d'un lobe glandulaire mammaire.	61
Figure 18. Histologie de la glande mammaire normale.	62
Figure 19. Développement de la glande mammaire.	64
Figure 20. Stades de la cancérisation dans le cas d'un cancer du sein canalaire.	67
Figure 21. Représentation des principaux types de cancer du sein.	69
Figure 22. Représentation schématique des concepts de l'initiation et de la progression du cancer.	77
Figure 23. Représentation schématique du modèle des cellules souches de cancer du sein.	78
Figure 24. Régulation de la croissance de la cellule mammaire cancéreuse.	79
Figure 25. Séquences des siRNA anti- NGF.	89
Figure 26. Comparaison de l'efficacité de dégradation des 4 séquences siRNA anti-NGF.	90
Figure 27. Carte du vecteur pGSU6-GFP.	91
Figure 28. Mécanisme d'inhibition du NGF par le plasmide pGSU6-GFP-shRNA NGF.	92
Figure 29. Validation du clonage du vecteur pGSU6-GFP par digestions enzymatiques.	93
Figure 30. Discrimination des clones sous exprimant le NGF par PCR en temps réel.	94
Figure 31. Mise en évidence d'un mélange de population cellulaire au sein d'un clone shRNA anti-NGF.	97
Figure 32. Tri des cellules MDA-MB-231 shRNA NGF GFP+.	97
Figure 33. Expression des isoformes de TrkB dans les SH-SY5Y, les MDA-MB-231 et les MCF-7.	106
Figure 34. Expression de TrkB-T1 dans les cellules cancéreuses de sein.	107
Figure 35. Expression de TrkB-T1 dans des biopsies tumorales de sein.	108
Figure 36. Effet de facteurs de croissance sur l'expression transcriptionnelle des neurotrophines dans les MDA-MB-231.	113
Figure 37. Effet de l'estradiol sur l'expression transcriptionnelle de $p75^{NTR}$ dans les MCF-7.	114
Figure 38. Expression des neurotrophines et de leurs récepteurs dans le modèle <i>in vitro</i> de Weinberg.	117
Figure 39. Expression et effets biologiques des neurotrophines dans les cellules de cancer du sein.	126

Sommaire des tables

Table 1. Caractéristiques géniques des neurotrophines.....	13
Table 2. Caractéristiques géniques des récepteurs tyrosine kinase humains.....	18
Table 3. Caractéristiques géniques du récepteur commun aux neurotrophines p75 ^{NTR}	32
Table 4. Effets pro et anti tumoraux des neurotrophines et de leurs récepteurs.....	60
Table 5. Classification des stades du cancer du sein.....	71
Table 6. Expression du NGF dans les clones shRNA.....	95
Table 7. Expression du NGF dans les 14 clones shRNA intéressants.....	96
Table 8. Expression du NGF dans les clones shRNA triés.....	98
Table 9. Marquage immunohistologique des formes de TrkB dans le cancer du sein.....	109

Sommaires

Avant-propos

Pourquoi le cancer

Maladie des populations à longévité croissante, le cancer est la deuxième cause de mortalité en France et touchera un homme sur deux et une femme sur trois au cours de leur vie. Considéré comme un problème de santé publique majeur, le cancer est une des pathologies les plus étudiées en terme de recherches fondamentale et clinique. Le traitement du cancer est devenu un enjeu mondial dans le domaine biomédical avec évidemment des intérêts économiques et commerciaux massifs. Et pourtant, le cancer du sein est le premier cancer féminin dans les pays occidentaux et le premier en terme de mortalité féminine par cancer malgré les avancées thérapeutiques.

La mise en évidence de marqueurs précoces d'apparition d'une tumeur est primordial lorsque l'on sait que seule la mammographie permet aux cliniciens de diagnostiquer l'émergence d'une tumeur mammaire déjà structurée de milliers de cellules. Par ailleurs, la nature complexe et hétérogène de la cancérogenèse mammaire tant au niveau cellulaire que moléculaire rend plus difficile la mise en place de « médicaments » universels du cancer du sein. Par exemple, seules 25% des tumeurs mammaires surexpriment le proto-oncogène Erb-B2 et peuvent être traitées par l'herceptine. De plus, les thérapies utilisées aujourd'hui sont encore très agressives et rarement ciblées au niveau de la tumeur (chimiothérapie, radiothérapie). Le défi futur résidera dans la possibilité de personnaliser la prescription des chimiothérapies sur des bases moléculaires validées et de ce fait tendra vers une individualisation du traitement systémique du cancer du sein.

Dans ce contexte, l'identification de nouvelles molécules capables de moduler la croissance des cellules mammaires ainsi que la connaissance de leurs mécanismes d'action, constituent un enjeu essentiel pour la compréhension de cette pathologie, la découverte de biomarqueurs diagnostiques fiables, et la conception de stratégies thérapeutiques innovantes. Ma thèse s'inscrit dans cette voie et a eu pour objectif de déterminer l'implication des neurotrophines et leur intérêt potentiel comme marqueur et/ou cible thérapeutique dans le cancer du sein.

Pourquoi les neurotrophines dans le cancer du sein

La cancérisation de l'épithélium mammaire est une succession de nombreux phénomènes complexes tels la transformation cellulaire, la croissance clonale, l'invasion stromale et l'apparition de métastases. L'émergence de cellules épithéliales ayant une capacité augmentée de réponse aux facteurs de croissance orchestre cette progression tumorale et donc

Avant-propos

la cancérisation via la stimulation de la survie, de la prolifération et de la migration des cellules transformées (Blagosklonny, 2002; Bourhis et al., 2000; Ethier, 1995).

Le premier facteur de croissance ayant été caractérisé est le Nerve Growth Factor (NGF). Cette découverte a engendré la mise en évidence de trois autres protéines de très grande homologie avec le NGF appelées le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), la neurotrophine 3 (NT-3) et la neurotrophine 4/5 (NT-4/5). Cette très forte similarité a réuni le NGF, le BDNF, la NT-3 et la NT-4/5 en une seule et même famille, les neurotrophines (NT). Biologiquement, les neurotrophines sont largement décrites pour leur rôle dans le développement du système nerveux, elles permettent, en effet, le maintien des fonctions neuronales en contrôlant la différenciation, la survie et la plasticité neuronale (Kaplan and Miller, 1997). Les NT agissent en se liant à 2 classes de récepteurs membranaires, le récepteur commun aux NT p75^{NTR} (Neurotrophin receptor) et les récepteurs à activité tyrosine kinase Trk (Tropomyosin related kinase). Le NGF se lie spécifiquement à TrkA, le BDNF et la NT-4/5 à TrkB et la NT-3 à TrkC.

Aujourd'hui, l'idée selon laquelle les neurotrophines auraient une action ciblée et spécifique en dehors du système nerveux constitue un concept original en cancérologie, où ces facteurs de croissance neurotrophiques seraient impliqués dans certains cancers non neuronaux. En effet, les NT sont capables d'accroître l'invasion tumorale, la croissance clonale et causent des changements morphologiques de nombreux types cellulaires non neuronaux comme les tumeurs de Wilm's, les mélanomes, les cancers du pancréas, de la prostate, de l'ovaire, du poumon et de la thyroïde (Dalal and Djakiew, 1997; Davidson et al., 2001; Donovan et al., 1994; Marchetti et al., 1996; McGregor et al., 1999; Miknyoczki et al., 1999).

Dans le cancer du sein, notre laboratoire a été le premier à démontrer que le facteur neurotrophique NGF est un puissant mitogène et protecteur pour les cellules cancéreuses mammaires alors qu'il est sans effet sur la croissance des cellules épithéliales normales de sein (Descamps et al., 1998; Descamps et al., 2001b; Dolle et al., 2003).

Alors que de nombreuses études indiquent que l'axe NGF-TrkA/p75^{NTR} semble déterminant pour la carcinogenèse mammaire, l'implication des autres neurotrophines (BDNF, NT-3, et NT-4/5) et de leurs récepteurs dans le cancer du sein restait inconnue et a constitué l'objectif principal de mes travaux de thèse.

Chapitre 1 : Introduction

Introduction

I. LES NEUROTROPHINES ET LEURS RECEPTEURS

I. A. Les neurotrophines

I. A. 1. Découverte des neurotrophines (NT) de mammifères

Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger et Stanley Cohen formulent, dans les années 50, une hypothèse neurotrophique basée sur une observation ; l'induction de la croissance de fibres nerveuses lors de l'implantation d'un sarcome de souris dans un embryon de poulet. Leurs résultats suggèrent l'existence d'un agent soluble libéré par la tumeur et favorisant son innervation. Ils montrent que pendant le développement, la survie des neurones dépend de substances sécrétées par leurs cibles et agissant de façon humorale. Ils appellent ces substances de survie : « nerve growth factors ». Le premier facteur de croissance identifié, le Nerve Growth Factor (NGF), est isolé en 1954 (Cohen et al., 1954) et vaudra à Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen le prix Nobel en 1986. En 1982, le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) est purifié à partir de tissu de cerveau et son clonage le décrit comme fortement homologue au NGF (Barde et al., 1982). La neurotrophine 3 (NT-3) est identifiée en 1990 grâce à des oligonucléotides dégénérés qui amplifient par PCR de nouveaux cDNA proches du NGF et du BDNF (Hohn et al., 1990; Jones and Reichardt, 1990; Maisonpierre et al., 1990; Rosenthal et al., 1990). A la même époque, les chercheurs découvrent un autre membre de la famille des neurotrophines chez le xénope, la neurotrophine 4 (Hallbook et al., 1991). Son orthologue est ensuite isolé chez l'homme et le rat en même temps qu'une neurotrophine 5 (Berkemeier et al., 1991; Ip et al., 1992). Ces deux molécules se révéleront identiques puisque la neurotrophine 4 ne représente qu'une variation de la neurotrophine 5 caractérisée chez les vertébrés supérieurs, c'est pourquoi le dernier membre des neurotrophines de mammifères est nommé neurotrophine 4/5 (NT-4/5).

I. A. 2. Structures : du gène aux protéines

I. A. 2. a) Les gènes des neurotrophines

Non seulement, les gènes des neurotrophines sont très conservés mais l'organisation des segments génomiques adjacents à ces gènes est aussi très similaire. Ces observations ont mis en évidence que les gènes des neurotrophines étaient apparus très tôt dans l'histoire des vertébrés lors des événements majeurs de duplications d'un gène ancestral. 2 duplications ont aboutit à la formation du Nerve Growth Factor, de la Neurotrophine 3, de la Neurotrophine 4/5 et du Brain Derived-Neurotrophic Factor. Le NGF et la NT-3 proviennent de la duplication d'un gène intermédiaire ancestral et la NT-4/5 et le BDNF de la duplication d'un deuxième gène intermédiaire (Figure 1). Ces duplications ont induit la génération de 4 neurotrophines chez l'homme où chacune d'entre elles possède des fonctions spécifiques, cette multiplicité de molécules est en corrélation avec la complexité accrue du système nerveux des vertébrés acquise au cours de l'évolution (Hallbook, 1999).

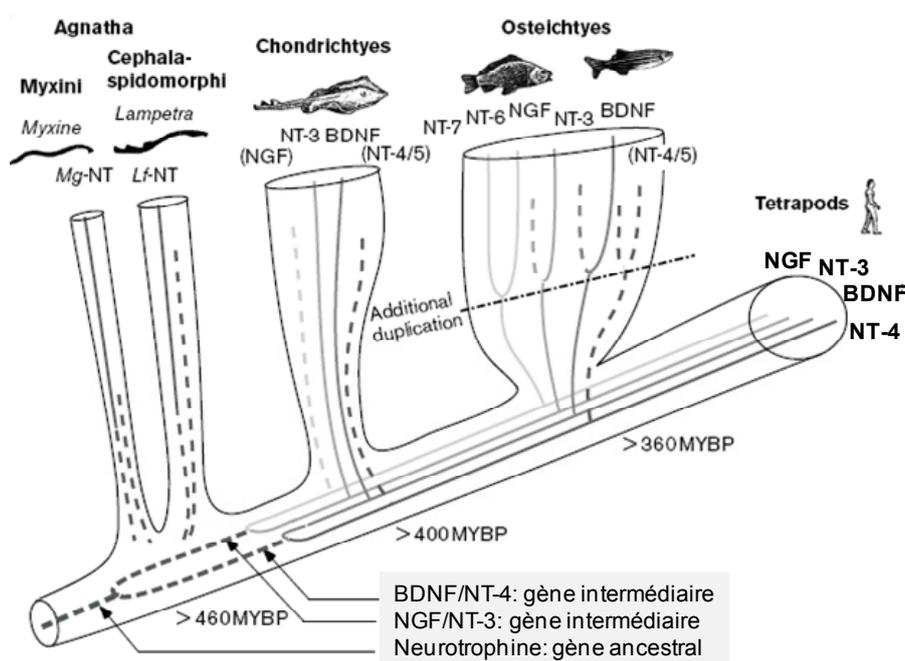


Figure 1. Illustration de l'apparition des gènes des neurotrophines des vertébrés.

Les gènes humains du NGF, de la NT-3, de la NT-4/5 et du BDNF sont issus de duplications successives d'un gène ancestral (Hallbook, 1999).

Introduction

Le NGF, le BDNF, la NT-3 et la NT-4/5 sont localisées sur les chromosomes 1, 11, 12 et 19 du génome humain et leur synthèse aboutit à des protéines de poids moléculaire très proches (Table 1).

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

Table 1. Caractéristiques géniques des neurotrophines.

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

I. A. 2. b) Les protéines des neurotrophines

Les neurotrophines sont synthétisées *via* le même processus de maturation. En effet, elles sont traduites, à partir d'un seul exon codant, en un précurseur protéique ou préproneurotrophine de 30 kDa approximativement, puis, sont séquentiellement clivées jusqu'à obtention d'une forme courte mature de 13,5 kDa (Figure 2). Les formes immatures préproneurotrophines sont séparées de leur peptide signal dans le réticulum endoplasmique puis les proneurotrophines sont clivées en un site d'acide aminé dibasique par des protéases intracellulaires telle la furine ou des proconvertases (Bresnahan et al., 1990; Seidah et al., 1996) ou des protéases extracellulaires après sécrétion comme la plasmine et certaines métalloprotéases MMP-3 et MMP-7 (Lee et al., 2001; Pang et al., 2004). La maturation protéolytique dépendrait du type même de la neurotrophine et de la disponibilité des protéases actives. Ainsi, alors que le NGF est souvent secrété sous sa forme mature, la proforme du BDNF semble être majoritairement excrétée par les neurones (Mowla et al., 1999). Cette succession de clivages aboutie à la libération des formes C-terminal matures, les neurotrophines (118-120 acides aminés).

Introduction

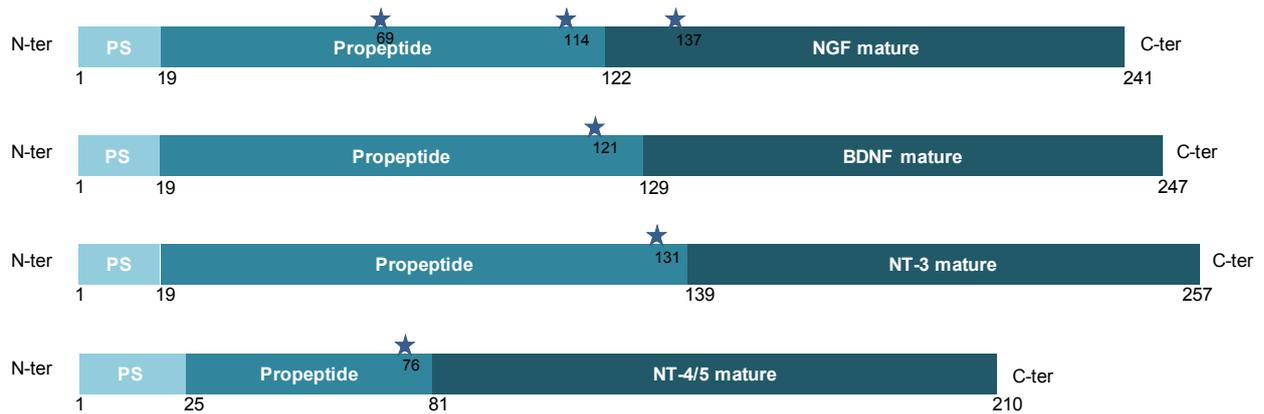


Figure 2. Représentation schématique des 4 protéines de la famille des neurotrophines.

Les ARNm des NT sont traduits en protéines immatures ou préproneurotrophines possédant un peptide signal (PS), un propeptide et la protéine mature. Le peptide signal (18 à 25 aa) est clivé après la séquestration de la protéine dans le réticulum endoplasmique. La protéine mature est obtenue suite au clivage du propeptide par des enzymes spécifiques (furine, convertase, metalloprotéases) dans les cellules ou dans les granules de sécrétion. Les étoiles représentent des sites potentiels de N-glycosylation.

Les neurotrophines sont des facteurs de croissance polypeptidiques hautement conservés phylogénétiquement (90% d'homologie entre la protéine NGF humaine et murine). L'alignement de leur séquence montre que deux régions semblent les plus conservées entre espèces : la région distale du prodomaine et la région mature des neurotrophines. Par exemple, la séquence du BDNF humain et du zebrafish est maintenue à plus de 90% dans ces 2 régions. Ces observations ont suggéré que tout comme les neurotrophines matures, les proneurotrophines avaient un rôle biologique (Lee et al., 2001) (§ I. C. 7. b).

I. A. 3. Dimérisation des neurotrophines

Les neurotrophines s'homodimérisent de façon non covalente en complexe de 28 kDa grâce à 6 résidus cystéines, conservés dans chaque neurotrophine, et formant trois ponts disulfures. La figure 3 indique la structure de la neurotrophine NGF, modèle utilisé pour décrire la structure de toutes les neurotrophines. Chaque sous-unité de NGF est composée de deux paires de feuillets β ($\beta 1$ - $\beta 4$) contribuant à donner la forme allongée à la molécule et connectées entre-elles par 3 boucles $\beta 1'$, $\beta 1''$, $\beta 1'''$. Les ponts disulfures et les résidus connectés constituent un nœud de cystéine (« cystine knot ») et fournissent la rigidité à la structure (McDonald and Hendrickson, 1993) (Figure 3A). La figure 3B représente un homodimère de NGF où deux protomères parallèles sont orientés en tête à tête autour d'un axe (Bradshaw et al., 1994).

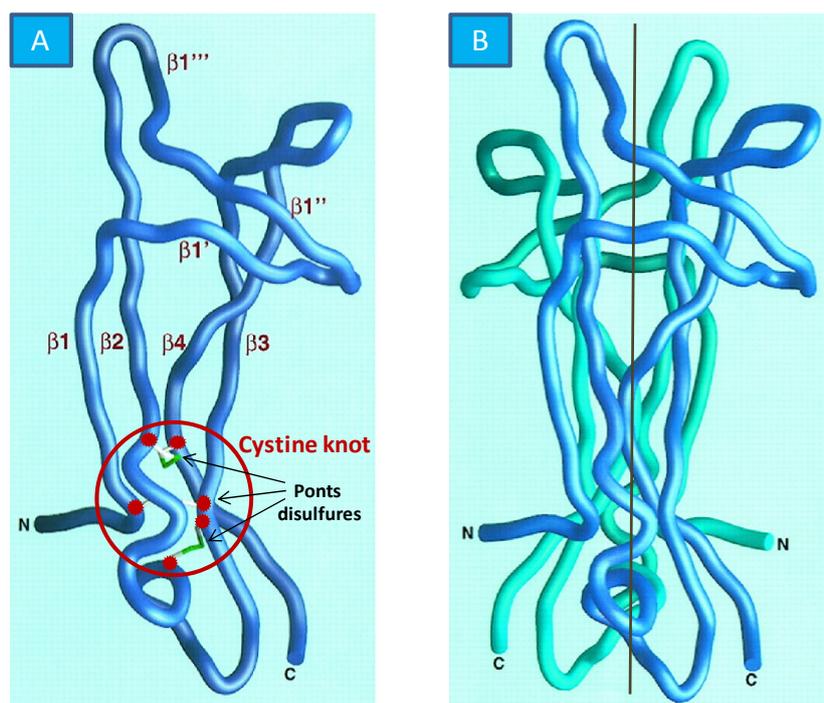


Figure 3. Structure du β -NGF.

A. Protomère de NGF, sont représentés en rouge les cystéines et en vert les 3 ponts disulfures qui composent le nœud de cystéine ou « cystine knot ». B. Dimère de NGF formé de 2 protomères (un bleu et un vert) orientés en tête à tête et de façon parallèle, la ligne verticale marron indique approximativement l'axe de direction des protomères. D'après Bradshaw et al., 1994 et McDonald et Chao, 1995.

Les motifs structuraux de la famille des neurotrophines, et notamment l'interface des dimères sont très conservés et peuvent former des hétérodimères *in vitro* (Arakawa et al., 1994; Jungbluth et al., 1994). NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 forment toutes des hétérodimères, cependant ceux impliquant le NGF tendent à être relativement instables et reversent vers leurs homodimères respectifs (Radziejewski and Robinson, 1993). Le rôle biologique *in vivo* des hétérodimères de neurotrophines reste incertain. Si ces hétérodimères sont reportés comme moins actifs que les homodimères parentaux, les hétérodimères de neurotrophines pourraient simplement refléter la promiscuité des neurotrophines et la séquestration d'une neurotrophine produite de façon mineure par une neurotrophine exprimée majoritairement (Robinson et al., 1999).

Les NT exercent leurs effets en interagissant avec deux types de récepteurs membranaires : $p75^{\text{NTR}}$ un récepteur de la famille des récepteurs au TNF et les récepteurs Trk à activité tyrosine kinase, les effets biologiques des neurotrophines seront donc traités dans les paragraphes dédiés aux récepteurs.

I. B. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (Trk)

I. B. 1. Découverte des Trk

En 1986, Trk est découvert lors du clonage d'un oncogène impliqué dans un cancer du colon, celui-ci contient les 7 premiers de 8 exons de la tropomyosine fusionnée avec les domaines transmembranaires et cytoplasmique d'une nouvelle tyrosine kinase (Martin-Zanca et al., 1986). Ce nouveau proto-oncogène fut logiquement nommé tropomyosin-related kinase (Trk). Juste avant l'identification du NGF comme ligand de Trk (TrkA) (Klein et al., 1991a), une kinase hautement similaire à TrkA nommée TrkB est purifiée en 1989 (Klein et al., 1989). En 1991, le ligand de TrkB est identifié comme étant le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Klein et al., 1991b; Squinto et al., 1991), la même année la neurotrophine 3 est attribuée au récepteur TrkC (Lamballe et al., 1991). En 1994, il est démontré que la NT-3 peut lier TrkA et TrkB mais avec une affinité réduite (Figure 4).

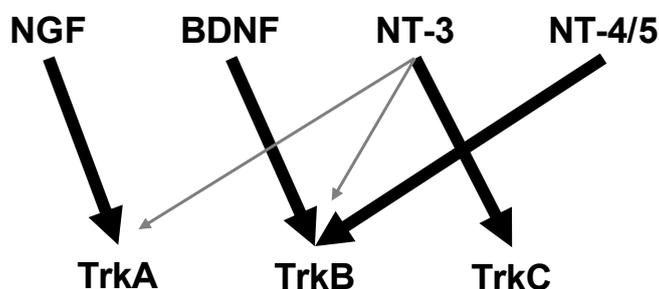


Figure 4. Liaison des neurotrophines aux récepteurs tyrosine kinase.

TrkA est le récepteur du NGF, TrkB de la NT-4/5 et du BDNF, TrkC de la NT-3 (flèches en gras). Notons que la NT-3 peut se fixer sur TrkA et TrkB mais sous certaines conditions de concentration (flèches fines).

I. B. 2. Les gènes des récepteurs tyrosine kinase

L'arbre phylogénétique des récepteurs tyrosine kinase et des neurotrophines sont semblables à bien des égards, suggérant que les gènes des Trk ont été formés lors d'événements similaires de ceux des neurotrophines. Selon ce modèle, les gènes intermédiaires TrkA/TrkC et TrkB ont

Introduction

été générés suite à la duplication d'un gène ancestral puis TrkA et TrkC sont apparus suite à la duplication du gène intermédiaire ancestral (Figure 5). Comme pour leurs ligands, les récepteurs tyrosine kinase sont donc issus du même gène ancestral expliquant leur très forte homologie de séquence et de structure.

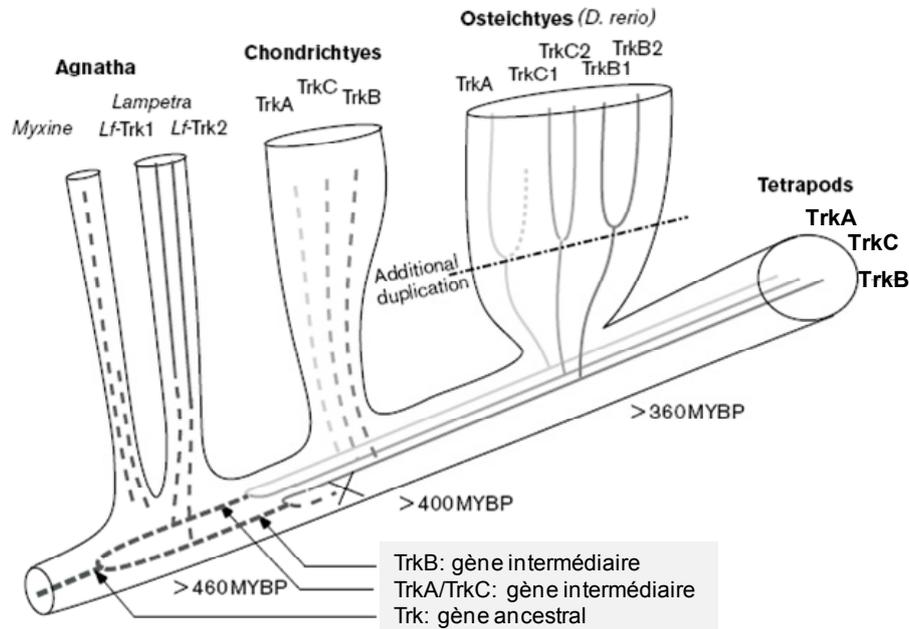


Figure 5. Illustration de l'apparition des gènes des Trk des vertébrés.

Les gènes TrkA, TrkB et TrkC sont issus de la duplication d'un gène ancestral puis d'un gène intermédiaire (Hallbook, 1999).

Le clonage des gènes humains TrkA (NTRK1) (Martin-Zanca et al., 1989), TrkB (NTRK2) (Nakagawara et al., 1995) et TrkC (NTRK3) (McGregor et al., 1994) a fini de démontrer leur forte homologie de séquence. La séquence protéique putative de NTRK2 établit lors du séquençage du gène serait homologue à celles de NTRK1 et de NTRK3 à 49% et 55%. Par la suite, il a été montré plus précisément que les domaines intracellulaires kinasiques de TrkB et de TrkA sont conservés à 88% et à 57% dans leurs domaines extracellulaires de liaison au ligand. Le séquençage a également amené la localisation chromosomique, le nombre d'exons ou encore la taille des transcrits, tous ces paramètres sont résumés dans la table 2 pour chaque gène des récepteurs tyrosine kinase NTRK. Par exemple, l'analyse de la structure génomique du gène NTRK1 humain a permis de lui dénombrer 17 exons situés sur 25 kb d'ADN. De plus, la séquence de son promoteur ne possède pas de boîte TATA en revanche elle est dotée de sites de liaison putatifs pour les facteurs de transcription Sp1, AP1, AP2, AP3, ATF et GCF (Greco et al., 1996).

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

Table 2. Caractéristiques géniques des récepteurs tyrosine kinase humains.

Récepteurs tyrosine kinase humains TrkA, TrkB, TrkC et leur localisation chromosomique, leur nombre d'exons, leur taille de transcrit, leur poids moléculaire protéique et leurs numéros d'accension dans les banques NCBI et swissprot.

I. B. 3. Structure générale protéique des récepteurs tyrosine kinase

Les récepteurs tyrosine kinase sont des protéines transmembranaires de type 1 hautement glycosylées comprenant environ 800 acides aminés. Leurs domaines extracellulaires (environ 400 aa) contiennent deux régions riches en cystéines (domaines I et III) encadrant un domaine riche en leucine (domaine II), suivis dans la région juxtamembranaire de deux domaines immunoglobuline (domaines IV et V). La partie extracellulaire des récepteurs Trk est très fortement glycosylée augmentant sensiblement leur poids moléculaire. Ces glycosylations permettent le bon adressage à la membrane et préviennent leur activation spontanée en absence de ligand (Watson et al., 1999). Le domaine intracellulaire est composé d'une large région tyrosine kinase dont la séquence conservée entre les espèces présente plus de 75% d'homologie avec celle des autres récepteurs à tyrosine kinase (Figure 6). De plus, 9 des 13 résidus cystéine, 4 des 12 sites de N-glycosylation du domaine extracellulaire et 10 des 13 résidus tyrosine du domaine intracellulaire sont conservés entre TrkA, TrkB et TrkC (Nakagawara et al., 1995).

Introduction

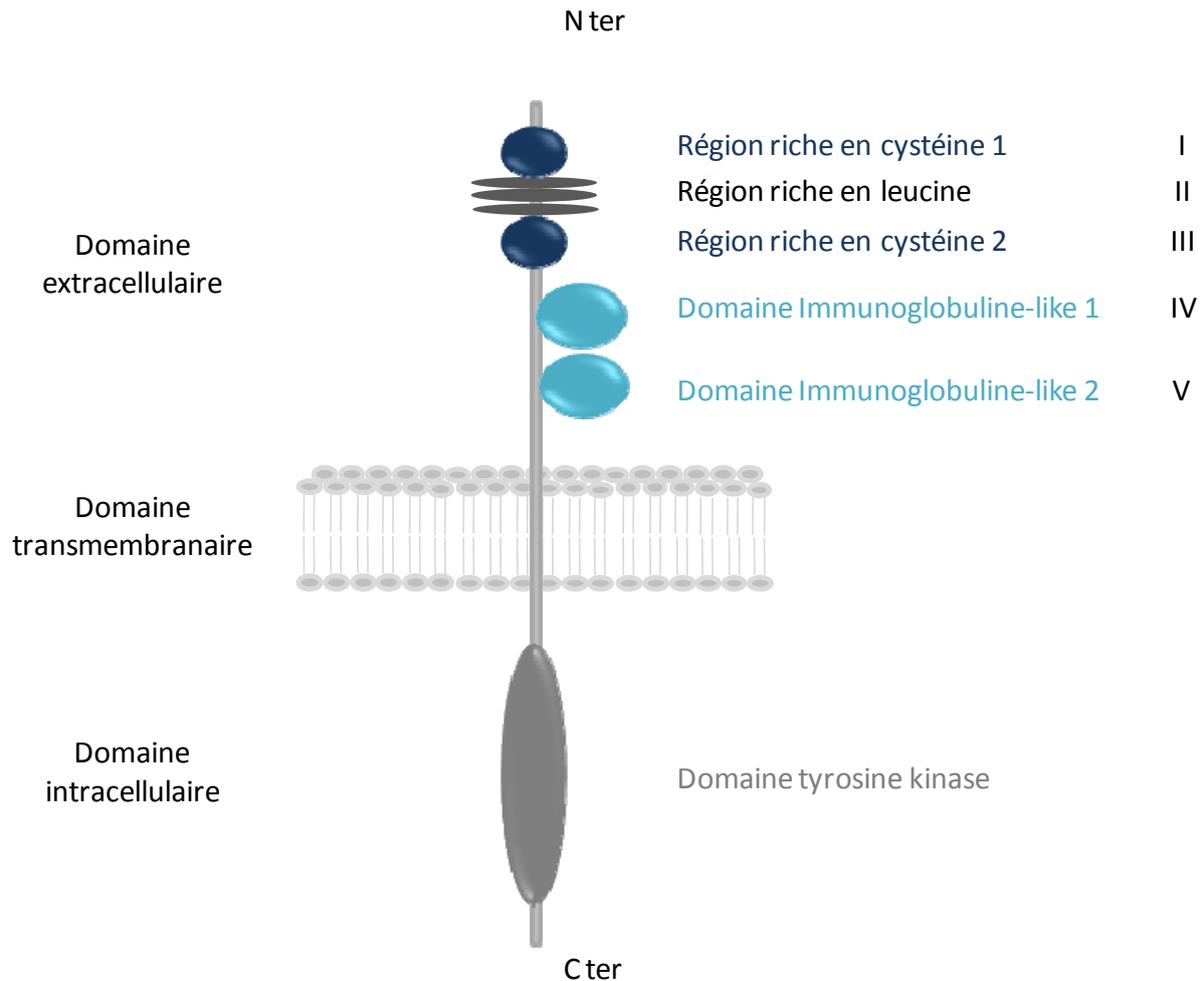


Figure 6. Représentation schématique des récepteurs tyrosine kinase A, B et C (TrkA, TrkB, TrkC).

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

I. B. 4. Isoformes des récepteurs tyrosine kinase

Lors de leur expression, les récepteurs tyrosine kinase sont soumis à un épissage alternatif qui conduit à de nombreux isoformes de fonctions biologiques diverses.

Il est par exemple reporté que la présence ou l'absence de petites séquences d'acides aminés dans les régions juxtamembranaires des Trk peuvent réguler la spécificité de réponse des récepteurs. TrkA et TrkB pourvus de cette région codée par un petit exon augmente la liaison des ligands non préférentiels. En effet, un isoforme de TrkB dépourvu de cet insert ne peut être activé que par le BDNF alors que TrkB le contenant peut être activé par la NT-4/5 et la NT-3 (Strohmaier et al., 1996). De plus, TrkB est différenciellement exprimé dans des populations

neuronales en fonction de la présence ou non de l'insert suggérant qu'une régulation basée sur l'épissage alternatif des Trk est importante pour leurs fonctions biologiques (Boeshore et al., 1999).

I. B. 4. a) TrkA

Il existe 3 isoformes de TrkA nommés TrkA-I, TrkA-II, TrkA-III. Barker a démontré que suite à un épissage alternatif de l'exon 9, les isoformes du récepteurs TrkA : TrkA-I et TrkA-II sont produits (Figure 7). TrkA-II qui contient la séquence codée par l'exon 9 présente un insert de 6 acides aminés dans le domaine extracellulaire. La présence de cet insert n'affecte ni l'affinité de liaison du ligand ni la transduction du signal (Barker et al., 1993). En revanche, elle participerait à la sélectivité du récepteur TrkA pour la NT-3, puisque la NT-3 ne se lie pas à la forme TrkA-I. Si ces 2 isoformes possèdent la même fonction biologique, leur distinction provient d'une expression différentielle : TrkA-I (originellement cloné comme TrkA) est exprimé de façon ubiquitaire, préférentiellement dans les tissus non-neuronaux alors que TrkA-II l'est dans les tissus neuronaux (Clary and Reichardt, 1994).

TrkA-III est quant à lui découvert en condition d'hypoxie comme un variant épissé des exons 6, 7 et 9 et ayant un pouvoir oncogénique. TrkA-III est, en effet, capable d'induire une signalisation indépendante du ligand NGF et de promouvoir un comportement tumorigène de cellules de neuroblastome (Tacconelli et al., 2004) (Figure 7).

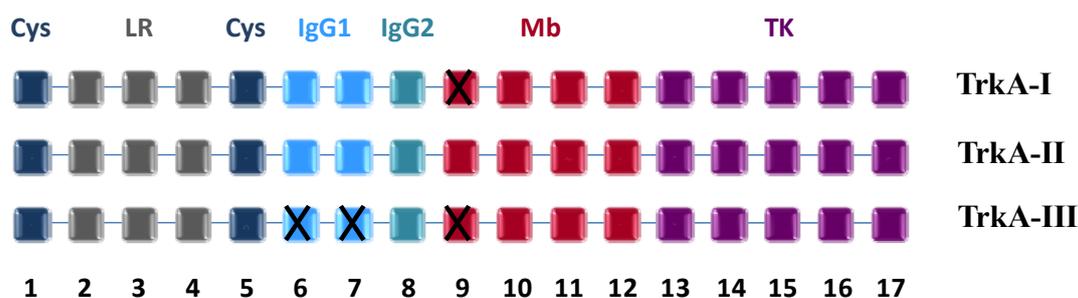


Figure 7. Isoformes de TrkA.

Les carrés représentent les 17 exons du gène de TrkA, ceux barrés étant alternativement épissés. TrkA-II est l'isoforme la plus longue, TrkA-I est épissé de l'exon 9 et TrkA-III est dépourvu des exons 6,7 et 9. Cys : région riche en cystéine (bleu foncé), LR : région riche en leucine (gris), IgG : domaine Immunoglobuline like 1 et 2, Mb : domaine transmembranaire et juxtamembranaire (Rouge), TK : domaine tyrosine kinase (violet).

I. B. 4. b) TrkB

La littérature décrit plus de 100 isoformes d'ARN de TrkB, 10 protéines sont codées dont 3 sont majoritaires et référencées chez l'homme. Ces 3 isoformes décrits dans la figure 8 sont issus des épissages alternatifs de l'ARNm du gène NTRK2 humain qui produisent des ARNm de longueurs distinctes et possédant des exons spécifiques :

- TrkB entier (Full Length, FL) est épissé des exons 16 et 19
- TrkB-T1 contient son codon stop dans l'exon 16
- TrkB-T-shc est épissé du 16 et terminé dans l'exon 19



Figure 8. Isoformes majoritaires de TrkB.

Les carrés représentent les 24 exons du gène de TrkB, ceux barrés étant alternativement épissés. TrkB-FL est l'isoforme le plus long, il est épissé des exons 16 et 19 et se termine dans l'exon 24, TrkB-T1 est l'isoforme le plus court dont le codon stop est situé dans l'exon 16, enfin TrkB-T-shc est épissé de l'exon 16 et se termine dans l'exon 19. Cys : région riche en cystéine (bleu foncé), LR : région riche en leucine (gris), IgG : domaine Immunoglobuline like 1 et 2, Mb : domaine transmembranaire et juxtamembranaire (Rouge), TK : domaine tyrosine kinase (violet).

• TrkB-T1

En 1991, David Middlemas et ses collègues criblent une banque d'ADNc de cerveau de rat adulte en vue de découvrir de nouvelles protéines tyrosine kinase (PTK). L'ADN d'une PTK putative fut cloné et sa séquence s'est révélée proche de l'oncogène humain Trk(A). Ce nouveau gène, TrkB, code en fait de multiples ARNm dont la taille varie entre 0,7 et 9 Kb. Ces transcrits codant notamment, en plus du récepteur entier, 2 récepteurs tronqués qu'ils appellent TrkB-T1 et TrkB-T2. Leurs séquences prédictives montrent qu'ils possèdent les domaines extracellulaire et transmembranaire entiers mais différents par leur courte queue cytoplasmique (Middlemas et al., 1991). TrkB-T1 possède une queue intracellulaire de 11

Introduction

acides aminés et TrkB-T2 de 9 acides aminés. Seul l'isoforme TrkB-T1 a été reporté chez les humains, et, est très conservé dans l'évolution puisque les rats et les poulets partagent la région intracellulaire (Biffo et al., 1995; Shelton et al., 1995).

L'expression de TrkB-T1 est ubiquitaire, il est présent de façon prédominante dans les tissus neuronaux notamment dans le système nerveux central des mammifères adultes mais aussi non neuronaux tels le cœur, les poumons, les reins, le pancréas ou la moelle osseuse (Labouyrie et al., 1999; Ricci et al., 2004; Stoilov et al., 2002). TrkB-T1 a la particularité d'être tronqué de toute la partie intracellulaire essentielle pour conduire une signalisation et une réponse cellulaire. Il est en revanche doté intégralement du domaine extracellulaire de liaison aux ligands et est donc capable de lier le BDNF et la NT-4/5 (Biffo et al., 1995). Il suscite un grand intérêt et bon nombre de controverses, est-il un dominant négatif du récepteur entier, TrkB Tyrosine Kinase + (TrkB TK+) ou possède-t'il un rôle distinct ? Trois hypothèses quant au rôle biologique de TrkB-T1 sont avancées :

- « Scavenger » récepteur

Tels le FGF et les héparanes sulfate, il est suggéré que TrkB-T1 pourrait retenir puis présenter aux récepteurs entiers les ligands et ainsi aider à la régénération des axones par exemple. Son rôle serait donc une régulation de la quantité des ligands à la surface cellulaire. Cependant cette hypothèse reste à ce jour invérifiée.

- Dominant négatif

Au moins 2 hypothèses sont retenues pour expliquer son rôle potentiel de dominant négatif. Comme précédemment, TrkB-T1 pourrait lier son ligand mais cette fois le piéger et non le présenter au récepteur entier et ainsi réduire sa disponibilité, ou, agir en tant que véritable dominant négatif c'est-à-dire en s'homodimérisant avec un récepteur pleine longueur et empêcher la phosphorylation de TrkB.

La littérature décrit TrkB-T1 comme un dominant négatif du récepteur entier par son implication dans l'inhibition des fonctions biologiques de TrkB TK+ telles que:

- La phosphorylation

C'est en 1994 que la première expérience évoquant le rôle potentiel de dominant négatif de TrkB-T1 est réalisée. Knüsel étudie la régulation de réponse aux neurotrophines lors du développement du rat par des expériences de phosphorylations des Trk. De manière intéressante, il démontre une phosphorylation différentielle de TrkB au cours du développement et émet l'hypothèse d'une régulation négative de TrkB TK+ par compétition

Introduction

avec les formes tronquées. Par ailleurs, leurs résultats montrent que le taux de récepteur tronqué comparativement au récepteur entier est élevé dans les stades de développement ayant une réponse diminuée aux ligands de TrkB (Knusel et al., 1994).

- L'entrée de calcium

L'injection de TrkB-T1 dans des ovocytes de xénope révèle son incapacité à transduire un signal (efflux de calcium) suite à la stimulation du BDNF contrairement au récepteur entier, et, leur coexpression abolit totalement la signalisation de TrkB TK+ (Eide et al., 1996).

- L'induction de neurites

L'expression de TrkB-T1 dans des fibroblastes (NIH3T3) inhibe l'induction de neurites par le BDNF de cellules de neuroblastomes (SH-SY5Y). Ces cocultures suggèrent que TrkB-T1 exerce son activité de dominant négatif via un processus de séquestration et d'internalisation du ligand atténuant l'activation de TrkB et la régénération des axones de neurones adjacents (Fryer et al., 1997).

- L'activité de survie cellulaire

Haapasalo a démontré ensuite que la transfection du récepteur tronqué inhibait l'effet de survie des cellules PC12 induit par le BDNF et TrkB TK+ et ce par un processus de dominant négatif plutôt que de séquestration du ligand. En effet, TrkB-T1 coimmunoprécipité à TrkB, inhibe son autophosphorylation et la survie cellulaire (Haapasalo et al., 2001).

- L'expression génique induite par le BDNF

Partant de l'hypothèse que TrkB-T1 fixe le BDNF, une étude des changements de l'expression génique induite par le BDNF et TrkB tronqué est réalisée par microarray. Il en résulte qu'aucune modification de l'expression des gènes de cellules 3T3 n'est observée contrairement au récepteur pleine longueur, en revanche les cellules exprimant TrkB-T1 présentent des modifications morphologiques suggérant un rôle propre de l'isoforme tronqué (Offenhauser et al., 2002).

- Récepteur induisant une signalisation

Pendant des années, les études montraient que ce récepteur tronqué n'avait pas de rôle direct, pourtant d'autres travaux fournissent des éléments de preuve en opposition à l'hypothèse de dominant négatif. D'abord TrkB-T1 subit une régulation de son expression lors d'évènements clés du développement du système nerveux des mammifères comme la synaptogenèse (Allendoerfer et al., 1994; Fryer et al., 1997; Ohira et al., 1999). De plus, l'alignement de séquence du domaine intracellulaire de TrkB-T1 est identique chez les humains, les souris et

Introduction

les rats suggérant un rôle unique (Middlemas et al., 1991; Shelton et al., 1995) et enfin TrkB-T1 est capable de lier le BDNF avec la même affinité que TrkB TK+ (Biffo et al., 1995).

Finalement, c'est au niveau physiologique que les démonstrations d'un rôle distinct du simple dominant négatif sont apparues. En effet, TrkB-T1 est impliqué dans l'élongation des dendrites distaux alors que TrkB TK+ augmentent les dendrites proximaux de neurones corticaux pyramidaux suggérant non pas un rôle régulateur de la croissance des dendrites mais plutôt un mode différent de leur croissance en fonction du récepteur (Yacoubian and Lo, 2000). De plus, Rose démontre dans Nature en 2003 une signalisation intracellulaire dans les astrocytes suite à la stimulation de TrkB-T1 par le BDNF aboutissant à une entrée de calcium (Rose et al., 2003). Finalement, la protéine Rho GDP Dissociation Inhibitor 1 (GDI1) est trouvée associée directement à TrkB-T1 dans les astrocytes et est indispensable à la régulation des Rho GTPases et par conséquent aux changements morphologiques de ces cellules (Ohira et al., 2005).

En conclusion, même si le rôle de TrkB-T1 n'est pas clair, il semble qu'il régule et module des effets biologiques. Afin de distinguer un effet propre d'un effet dominant négatif de TrkB-T1, il serait intéressant d'utiliser un modèle cellulaire où TrkB TK+ est invalidé.

- TrkB-T-shc

La cartographie du gène humain TrkB révèle en 2002 un nouvel isoforme tronqué d'une très grande partie de son domaine intracellulaire. Il est issu d'un nouvel épissage alternatif impliquant l'exon 19. Contrairement à l'isoforme TrkB-T1, son court domaine cytoplasmique possède encore le domaine de liaison aux protéines shc et par conséquent est nommé TrkB-T-shc. La protéine produite est membranaire et localisée exclusivement dans le cerveau. Il ne peut être phosphorylé par le récepteur entier suggérant un probable rôle inhibiteur mais son activité biologique est à explorer (Stoilov et al., 2002).

I. B. 4. c) TrkC

Tout comme les 2 autres récepteurs tyrosine kinase, TrkC se présente sous plusieurs isoformes. Le transcrit de TrkC humain subit divers épissages alternatifs aboutissant à 4 isoformes dépourvus ou non de séquence d'insertion. L'une de 14 aa située dans le domaine kinasique modifierait la spécificité de substrat de l'activité kinase de TrkC et pourrait altérer

Introduction

la réponse cellulaire (Guiton et al., 1995; Tsoulfas et al., 1996). L'autre de 9 aa est située dans le domaine transmembranaire à l'endroit exact de l'insert décrit par Barker pour TrkA soit après le second domaine immunoglobuline (McGregor et al., 1994; Shelton et al., 1995). Il a été finalement décrit une forme non-catalytique du récepteur TrkC humain dépourvue du domaine consensus tyrosine kinase mais dotée en lieu et place d'un domaine intracellulaire de 83 aa (Shelton et al., 1995). Des souris surexprimant ce TrkC tronqué présentent une perte de neurones sensoriels et des défauts cardiaques similaires à ce qu'il est possible d'observer chez des souris knock-out pour la NT-3 suggérant un effet inhibiteur type dominant négatif de ce récepteur (Palko et al., 1999).

I. B. 5. Interaction des neurotrophines et de leur Trk

Les études des récepteurs Trk basées sur des expériences de liaison et de délétion ont permis de mettre en évidence que le domaine 5 (IgG-like 2) des récepteurs est responsable de la liaison des ligands (Perez et al., 1995; Ultsch et al., 1999; Urfer et al., 1995). Les figures 6 et 9 présentent les différents domaines 5 des récepteurs Trk.

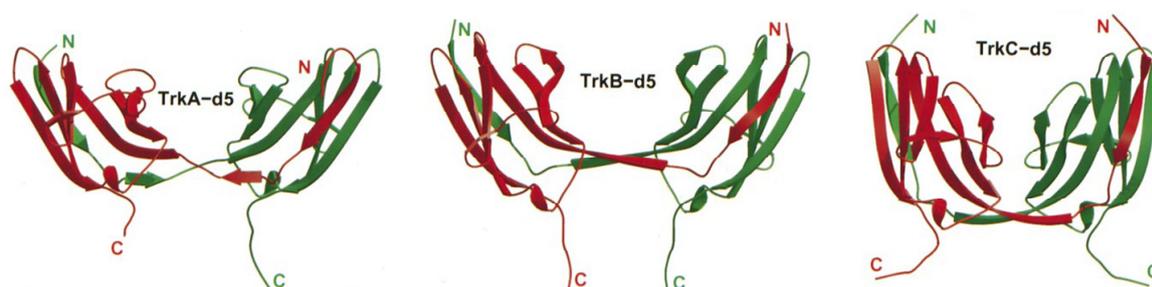


Figure 9. Cristallographie des domaines de liaison des neurotrophines aux récepteurs TrkA, TrkB et TrkC.

En rouge et en vert les 2 monomères des domaines 5 des récepteurs Trk (Ultsch et al., 1999).

L'interaction des neurotrophines et de leur récepteur se fait par l'intermédiaire de 2 régions fines. La première appelée « conserved patch » met en jeu la partie C-terminale des domaines 5 des Trk et la zone centrale des NT. Quatorze des 23 résidus impliqués dans ces liaisons sont conservés entre le NGF, le BDNF et la NT-3, et 8 des 15 résidus impliqués sont également conservés entre les différents récepteurs Trk d'où la dénomination de cette région (Wiesmann et al., 1999).

Introduction

La seconde région « specificity patch » est localisée en N-terminale des NT, elle est caractéristique de chaque neurotrophine et constitue certainement le premier déterminant à la spécificité de liaison. En effet, la cristallisation du NGF et de la NT-4/5 avec les domaines 5 de TrkA et TrkB respectivement, a mis en évidence que le domaine N-terminal non conservé et propre à chaque neurotrophine augmentait la spécificité de liaison à son récepteur Trk (Banfield et al., 2001; Ultsch et al., 1999; Wiesmann et al., 1999) (Figure 10). Cette étude a été confortée par les expériences préliminaires de Urfer où la région N-terminale de la NT-3 était remplacée par celle du NGF donnant une protéine pouvant se lier aux 2 récepteurs TrkA et TrkC avec une très grande affinité. En ce qui concerne la NT-4/5 et le BDNF, ils partagent 10 des 12 aa de la région conservée et 5 aa sur les 7 de la région spécifique impliqués dans la liaison au récepteur Trk expliquant leur affinité pour le même récepteur.

L'exemple de la NT-4/5 liée au récepteur TrkB en figure 10 illustre ces interactions NT-Trk.

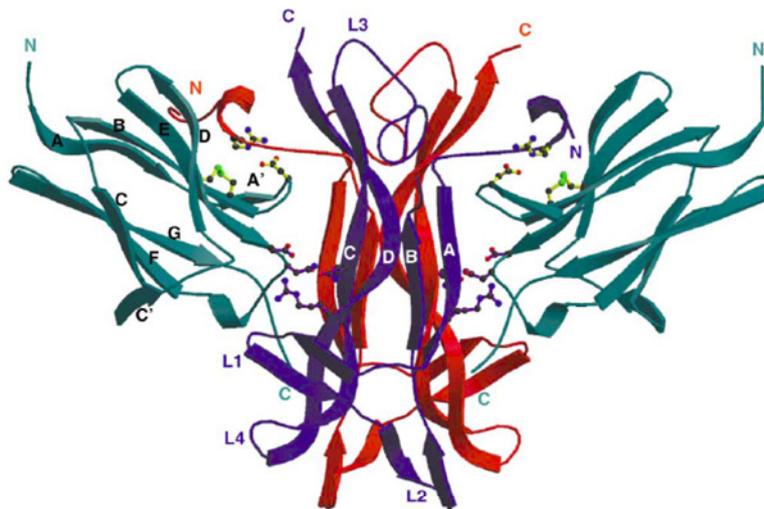


Figure 10. Structure du complexe TrkB-d5 :NT-4/5.

Un homodimère de NT-4/5 coloré en rouge (un monomère) et bleu (second monomère) lié à 2 monomères du domaine 5 de TrkB (TrkB-d5) en turquoise. En jaune, les sites d'interaction spécifiques entre le domaine N-ter de la NT-4/5 et TrkB, en violet les interactions conservées entre les différentes neurotrophines et leur Trk (Banfield et al., 2001).

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

I. B. 6. Voies de signalisation des Trk

Les voies de signalisation des récepteurs Trk ont particulièrement été étudiées dans le modèle cellulaire de phéochromocytome de rat (les PC12) et les cellules neuronales. Il résulte de ces travaux, la description des mécanismes d'activation des Trk et des cascades d'événements intracellulaires qu'ils entraînent.

I. B. 6. a) Activation des Trk

La fixation des neurotrophines en dimères sur les récepteurs Trks constitue la première étape d'activation et provoque la dimérisation des récepteurs puis leur autophosphorylation sur les tyrosines de la boucle d'activation du domaine kinasique. Les récepteurs Trk sont spécifiquement activés par les neurotrophines matures et non par leurs proformes (Lee et al., 2001). Par conséquent, les protéases qui contrôlent la maturation des NT, contrôlent la réponse des Trk. Les récepteurs tyrosine kinase des vertébrés comprennent une dizaine de tyrosines très conservées dans leur domaine cytoplasmique, trois d'entre elles sont situées dans la boucle autorégulatrice (Y670, Y674, Y675). Elles sont à l'origine de l'activité de la kinase des récepteurs Trk. La phosphorylation sur les autres résidus tyrosine crée des sites de liaison pour des protéines contenant des PTB (phosphotyrosine binding) ou des domaines SH2 (src-homology 2). La nomenclature des tyrosines utilisée par la suite est basée sur le récepteur TrkA :

- Y670, Y674, et Y675 situées dans la boucle d'activation du domaine kinasique, leur phosphorylation potentialise l'activité tyrosine kinase.
- Y490 située dans la partie juxtamembranaire constitue un site de fixation pour les protéines Shc ou FRS2 et permet l'activation de Ras et de la PI3 kinase.
- Y785 située à l'extrémité C-terminale de la protéine et constituant un site de fixation pour la PLC γ .
- Il existe dans le domaine cytoplasmique d'autres résidus tyrosine conservés entre les Trk, qui peuvent fixer d'autres protéines adaptatrices et constituent un lien potentiel vers les voies PI-3K et MAPK.

I. B. 6. b) Voies de signalisation activées par les Trk

Les 3 voies de signalisation majeures activées par les 3 récepteurs tyrosine kinase Trk sont la voie des MAP kinases, de la PI3 kinase et de la PLC γ et sont reportées dans la figure 11.

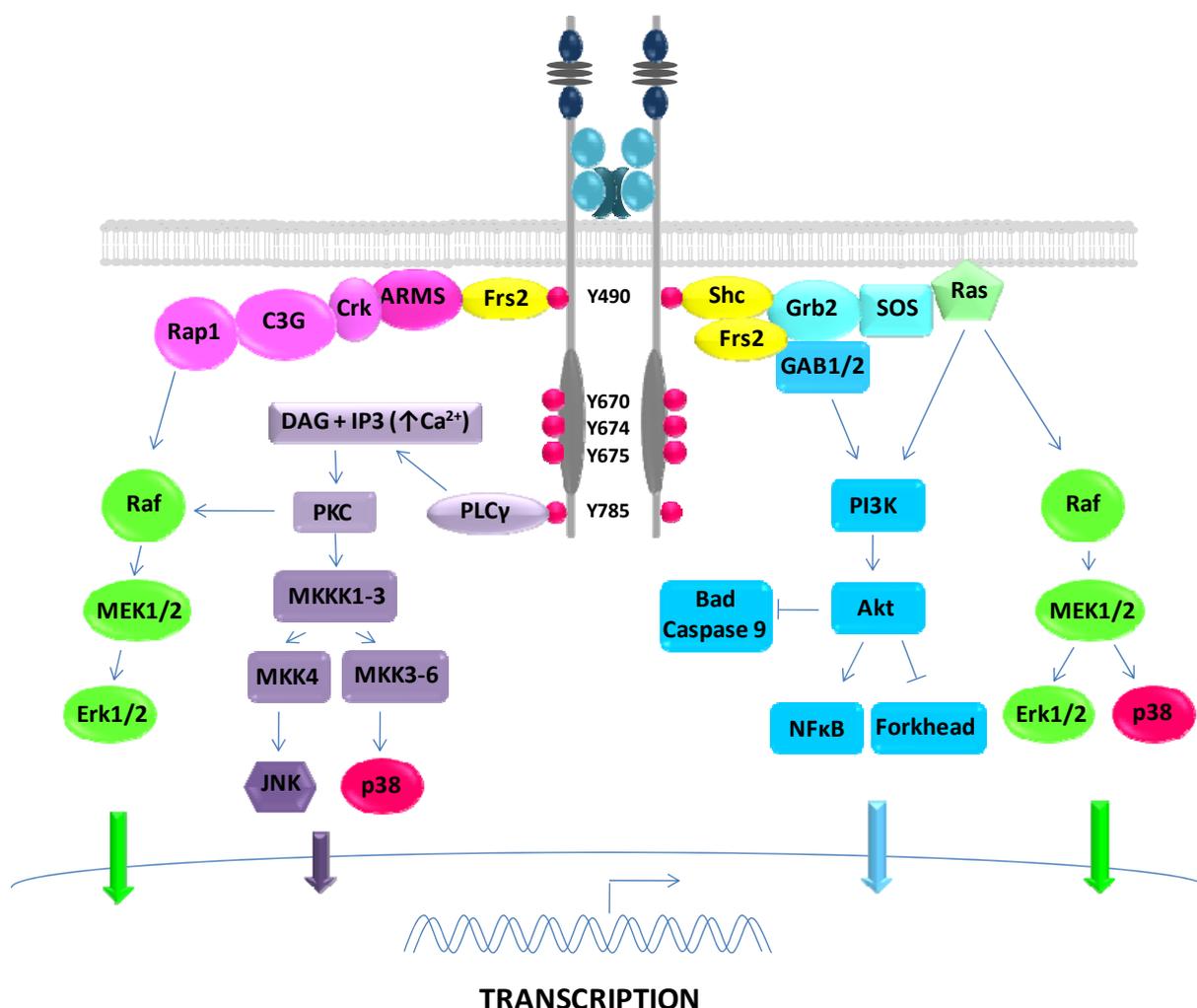


Figure 11. Représentation schématique des voies de signalisation des Trk.

La fixation des neurotrophines sur leur récepteur tyrosine kinase les active par dimérisations et phosphorylation des tyrosines Y490, Y670, Y674, Y675 et Y785 (nomenclature des tyrosines de TrkA). Les tyrosines phosphorylées, recrutent des adaptateurs et activent les voies de signalisation Ras / Raf / MAPK, PI3 kinase / AKT et PLC γ (Phospholipase C γ). MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ; Shc : Src homology-2 containing protein ; Grb-2 : Growth factor receptor-bound protein ; GAB 1/2 : GrB2 Associated Binding Protein 1/2 ; FRS2 : Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2 ; SOS : Son Of Sevenless ; Ras : Ras GTPase activating protein ; Raf : Raf kinase ; ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinase ; MEK : MAP ERK Kinase ; ARMS : Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning adaptor ; PKC : Protein Kinase C ; DAG : Diacylglycerol ; PI3K : Phosphatidyl Inositol Tri-Phosphate Kinase ; NF κ B : Nuclear Factor kappa B ; JNK : c-jun N-terminal Kinase ; P38 : P38 MAP Kinase ; MKKK : MAP-Kinase Kinase Kinase ; MKK : MAP-Kinase Kinase.

Introduction

- La voie des MAP kinases

La fixation de la protéine Shc *via* son domaine PTB sur la tyrosine 490 phosphorylée de Trk induit sa phosphorylation, puis, le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2 (Rozakis-Adcock et al., 1992). Les domaines SH3 (domaine d'homologie à Src) de Grb2 interagissent avec la protéine SOS, un facteur activateur de la petite protéine G Ras. En effet, l'échange de GDP en GTP par SOS active Ras qui à son tour active la kinase Raf (Moodie et al., 1993). La cascade de phosphorylation des MAPK peut alors avoir lieu, avec les phosphorylations de MEK1/2 puis Erk1/2 et de p38. De façon similaire à shc, la protéine FRS2 se fixe *via* son domaine SH2 à la Y490 et est phosphorylée par le Trk activé (Kao et al., 2001). FRS2 recrute les protéines adaptatrices Grb2 (puis la voie de signalisation SOS-Ras-MAPK décrite ci-dessus) ou Crk. Alternativement, Crk peut être recrutée par la protéine transmembranaire ARMS elle-même phosphorylée sur des tyrosines suite à l'activation du récepteur Trk par son ligand (Arevalo et al., 2004). Crk active alors Rap1 *via* C3G, Rap1 stimule la kinase Raf qui active la cascade de kinase Erk (Figure 11).

ERK1/2 phosphorylé conduit à l'activation et à la translocation dans le noyau de facteurs de transcription comme CREB (cAMP Response Element Binding) ou Elk-1 (membre de la famille ETS) qui activent la transcription de gènes essentiels pour la différenciation neuronale et par conséquent prolongent la vie des cellules neuronales (Janknecht et al., 1993; Reichardt, 2006; Riccio et al., 1999). Ainsi la voie des MAPK semble-t-elle principalement impliquée dans la différenciation neuronale mais aussi la prolifération cellulaire.

- La voie PI3K / AKT

La voie de la PI3K est engagée de façon dépendante de Ras ou de façon indépendante par l'intermédiaire des protéines GAB, elles même recrutées par le complexe protéique shc-Grb2 lié à Trk (Holgado-Madruga et al., 1997; Vaillant et al., 1999). Il est également décrit que l'activation de Trk par le BDNF permet la phosphorylation de IRS1 (Insulin-Receptor Substrate) et le recrutement ainsi que l'activation de la PI3K (Yamada et al., 1997). La PI3K induit la formation de phosphatidyl inositol 3,4-biphosphate qui activent en collaboration avec des PDK (phosphoinositide-dependent kinase) la protéine Akt. Akt est au coeur de la régulation par phosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans la survie cellulaire (Dudek et al., 1997) soit *via* la transcription de gènes soit *via* un effet direct sur des protéines de la cascade apoptotique. En effet, Akt entraîne la transcription de gènes décrit pour leur

Introduction

implication dans la survie cellulaire par l'intermédiaire notamment de NFκB (Figure 11). NFκB est séquestré dans le cytoplasme par IκB (Inhibitor kappaB) et la phosphorylation d'IκB par Akt provoque sa dégradation libérant NFκB qui peut alors agir sur la transcription génique. D'autres gènes de survie seraient activés par l'intermédiaire de la PKCζ atypique (Wooten et al., 1994). Akt peut également phosphoryler le facteur de transcription Forkhead qui est alors piégé dans le cytoplasme par les protéines 14-3-3 et ne peut activer des gènes proapoptotiques (Fas L) (Brunet et al., 2001) (Figure 11). Finalement, la survie est engagée grâce au contrôle de substrats directement impliqués dans la cascade des caspases tels que Bad (Bcl-2/Bcl-x-associated death promoter) ou encore la caspase 9 (Figure 11). Bad est un membre proapoptotique de la famille Bcl2 qui lorsqu'il est phosphorylé par Akt est séquestré par les protéines 14-3-3 empêchant son action proapoptotique.

- La voie PLCγ / PKC

La PLCγ se fixe sur le résidu phosphorylé Y785 de TrkA et sur les résidus correspondant de TrkB et de TrkC, et, devient active suite à sa phosphorylation par la kinase des Trk. La PLC activée hydrolyse ensuite le phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). L'IP3 en provoquant le relargage du calcium, augmente la concentration du calcium intracellulaire et active les enzymes dépendantes du calcium (calmodulin, PKC), et le DAG stimule les isoformes de la protéine kinase C (PKC) (Berninger et al., 1993). Ces voies conduisent à l'activation de la cascade Erk suite à la phosphorylation de Raf, et, des MAPK p38 et JNK par des cascades d'activation de MAPK (MKKK1-3 ; MKK4 et MKK3-6) (Figure 11) (Corbit et al., 1999; Micera et al., 2007). Cette voie est impliquée dans la plasticité synaptique et la croissance des neurites.

I. C. Le récepteur p75^{NTR}

I. C. 1. Découverte de p75^{NTR}

p75^{NTR} fut identifié en 1973 comme étant le récepteur de la neurotrophine nerve growth factor et appelé NGFR (NGF Receptor) (Herrup and Shooter, 1973). Il fut cloné en 1986 et des expériences de transfection ont révélé que le récepteur p75 liait le NGF avec une faible affinité, il fut alors nommé, récepteur de faible affinité du NGF (low affinity NGF receptor) (Chao et al., 1986; Johnson et al., 1986; Radeke et al., 1987). Avec la découverte des autres membres de la famille des neurotrophines, il est apparu que toutes liaient p75 avec la même affinité (10^{-9} M) dans tous les types cellulaires, d'où le nom p75^{NTR} pour Neurotrophin Receptor (Rodriguez-Tebar et al., 1990; Rodriguez-Tebar et al., 1992; Squinto et al., 1991).

I. C. 2. Le gène de p75^{NTR}

Le gène du récepteur commun aux neurotrophines contient 6 exons qui couvrent approximativement 23kb du chromosome 17 (Table 3). Le promoteur du gène ne possède pas de séquence consensus TATA ou CAAT (Sehgal et al., 1988) mais des séquences conservées riches en GC proches du site d'initiation de la transcription ont été identifiées et représentent un élément de réponse pour le facteur de transcription SP1. D'autres éléments de réponse, les E box, sont présents sur le promoteur de p75^{NTR}, elles lieraient les facteurs de transcription ME1 (répresseur d'activité), NeuroD ou bHLH (activateurs d'expression) (Chiaramello et al., 1995). Enfin des séquences impliquées dans la régulation par l'acide rétinoïque, la vitamine D3 et la testostérone ont été répertoriées dans le promoteur de p75^{NTR} (Metsis et al., 1992; Naveilhan et al., 1996).

Récepteur	Nom du gène	Localisation chromosomique	Nombre d'exons	Taille de l'ARNm (pb)	N° d'accension NCBI	PM (kDa)	N° d'accension swissprot
p75 ^{NTR}	NGFR	17q12-q22	6	3800	NM_002507	75	P08138

Table 3. Caractéristiques géniques du récepteur commun aux neurotrophines p75^{NTR}.

Localisation chromosomique, taille du transcrit, poids moléculaire protéique et numéro d'accension dans les banques NCBI et swissprot du récepteur commun aux neurotrophines p75^{NTR}.

I. C. 3. Structure protéique de p75^{NTR}

La protéine du récepteur aux neurotrophines est constituée, après clivage de son peptide signal (28 aa), de 399 aa répartis dans le domaine extracellulaire (222 aa), le domaine transmembranaire (22 aa), et le domaine intracellulaire (155 aa) (Figure 12).

p75^{NTR} appartient à une superfamille de récepteurs dont le Tumor Necrosis Factor (TNF) est le prototype (Smith et al., 1994). Elle est définie sur la base de la présence de domaines riches en cystéine (CRD) chargés négativement et situés dans le domaine extracellulaire, en l'occurrence p75^{NTR} en possède 4 (6 cystéines par répétition). Son domaine extracellulaire possède des sites de N- et O-glycosylations notamment dans le domaine juxtamembranaire faisant passer sa masse moléculaire de 45 à 75 kDa.

Son domaine intracellulaire, unique et non catalytique, très conservé entre les espèces, possède un site de palmitoylation à la cystéine 279 (Barker et al., 1994) et est phosphorylable sur des résidus sérine et thréonine (Grob et al., 1985; Taniuchi et al., 1986). La fonction de ces modifications post-traductionnelles n'est pas totalement élucidée : interaction protéine-protéine, maturation et localisation de la protéine à la membrane dans les rafts lipidiques, endocytose, transport vésiculaire, régulation de la signalisation de p75^{NTR} (Bronfman and Fainzilber, 2004; Underwood et al., 2008).

Le sous groupe de la famille des récepteurs au TNF dont fait partie p75^{NTR} contient dans son domaine cytoplasmique un domaine de mort « Death Domain (DD) » de 80 aa de type II. L'analyse des séquences protéiques de différents DD a révélé que le domaine de mort de p75^{NTR} était davantage lié à celui de protéines comme l'ankyrine plutôt qu'au DD de type I des autres membres de la famille des TNFR (Roux and Barker, 2002). Comme illustré dans la

Introduction

figure 12, le domaine de mort est une structure compacte et globulaire constitué de 2 modules contenant chacun 3 hélices α . Les hélices 2 à 6 sont globalement toutes orientées de la même manière dans les récepteurs FAS et $p75^{\text{NTR}}$ alors que l'orientation de la 1^{ère} hélice diffère de près de 90° permettant à $p75^{\text{NTR}}$ de recruter des protéines spécifiques et l'empêchant de multimériser en solution (Liepinsh et al., 1997; Roux and Barker, 2002; Wang et al., 2001). La dernière région du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ à avoir été identifiée est un petit domaine de 29 aa localisé dans la partie intracellulaire juxtamembranaire. Coulson démontre qu'il est nécessaire et suffisant pour initier la mort cellulaire et le baptise chopper du nom d'un célèbre criminel australien. Chopper présente 95% d'homologie de séquence entre l'homme, le rat et la souris mais n'est cependant pas conservé dans les autres membres de la famille des TNFR. (Coulson et al., 2000; Coulson et al., 1999).

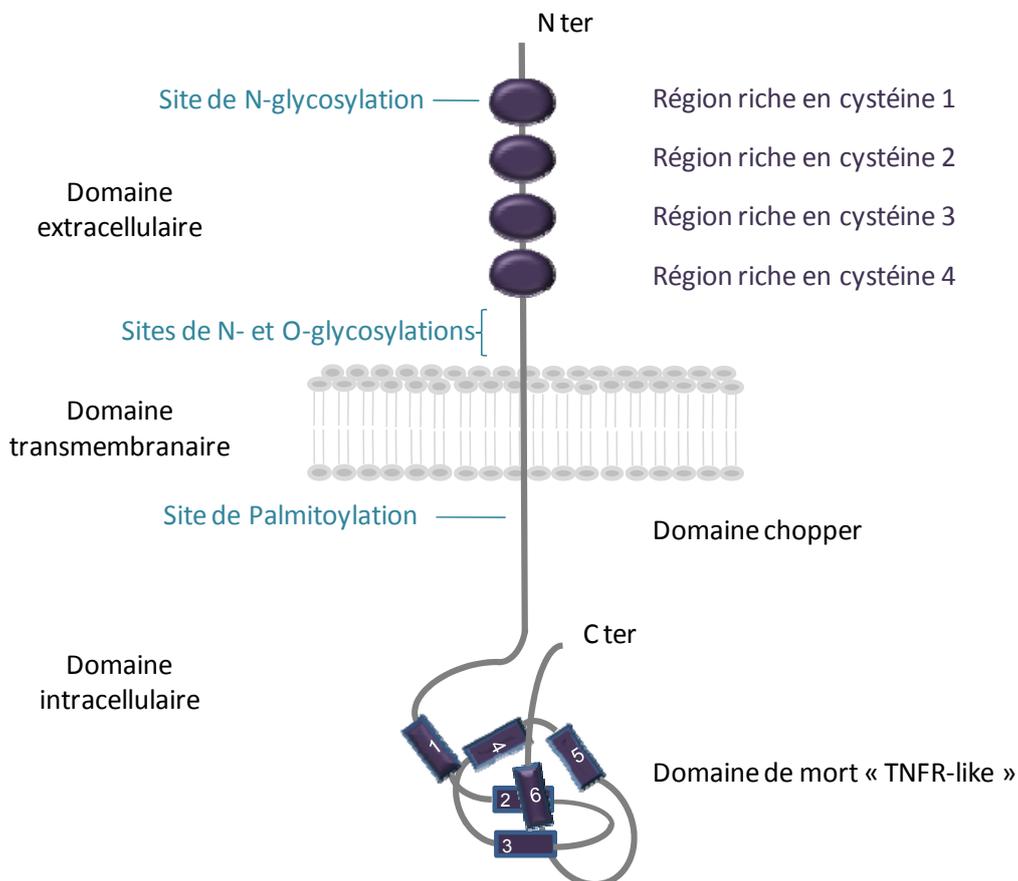


Figure 12. Représentation schématique du récepteur des neurotrophines $p75^{\text{NTR}}$.

Le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ est constitué dans son domaine extracellulaire de 4 régions riches en cystéine, d'un domaine transmembranaire unique, et d'un domaine intracellulaire, dont 29 acides aminés juxtamembranaires délimitent le domaine chopper et 6 boucles alpha le domaine de mort.

I. C. 4. Les différentes formes du récepteur p75^{NTR}

Des formes tronquées de p75^{NTR} sont produites à la fois par épissage alternatif et par protéolyse, elles sont décrites dans la figure 13.

- Le 3^{ème} exon du gène de p75^{NTR} peut subir un épissage alternatif générant un isoforme dépourvu des régions riches en cystéines 2, 3, 4 de son ectodomaine et ne pouvant fixer les neurotrophines (Dechant and Barde, 1997). Ses domaines intracellulaires et transmembranaires sont par contre intacts et sa fonction biologique n'est pas connue.

- Le récepteur p75^{NTR} entier est clivé dans un premier temps par une protéase extracellulaire (ADAM 10 et 17) qui libère un fragment extracellulaire composé des 4 régions riches en cystéines (p75-ECD) toujours capable de lier les neurotrophines, et produit un fragment C-terminal (p75-CTF). Ce premier clivage est un pré-requis à un second réalisé sur le CTF par un complexe γ sécrétase intracellulaire (« presenilin dependent γ secretase »), elle génère un fragment intracellulaire (p75-ICD) ayant des capacités de signalisation (§ I. C. 6. a) (Bronfman, 2007).

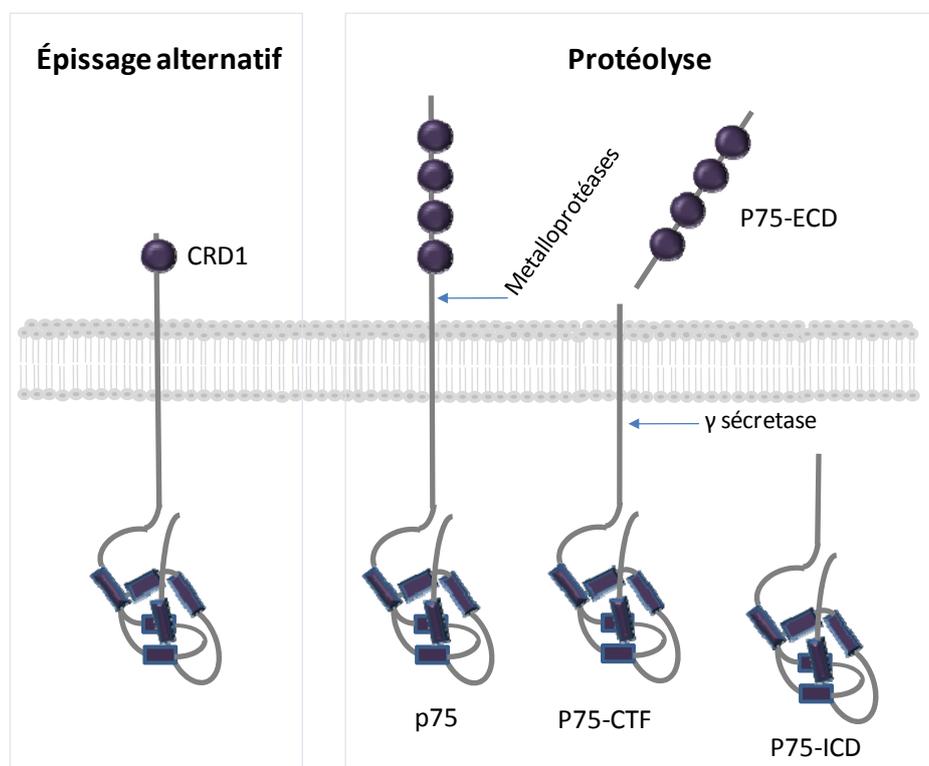


Figure 13. Les différentes formes du récepteur p75^{NTR}.

Les formes de p75^{NTR} sont générées par épissage alternatif ou protéolyse. p75-ECD (Extracellular Domain), p75-CTF (C Terminal Fragment), p75-ICD (Intracellular Domain).

I. C. 5. Interaction des ligands au récepteur p75^{NTR}

Il n'y a pas de similarité de séquence entre les récepteurs Trk et p75^{NTR} que ce soit dans les domaines de liaison du ligand ou les domaines cytoplasmiques pourtant ces 2 types de récepteurs lient les mêmes protéines.

Contrairement aux autres membres de la superfamille des récepteurs au TNF qui lient des ligands trimériques, p75^{NTR} fixe les neurotrophines en dimère suggérant un mécanisme de reconnaissance ligand-récepteur différent. He et Garcia détermine par cristallographie la structure du complexe NGF-p75^{NTR} et propose un rapport asymétrique 2 :1 c'est-à-dire 2 molécules de NGF s'associent à une molécule p75^{NTR} (He and Garcia, 2004). Pour exclure un artefact de cristallisation, ils confirment leur modèle à l'aide de 3 autres méthodes indépendantes où p75^{NTR} est mis en solution avec le NGF, la NT-3 et la NT-4/5. Dans ce modèle, le NGF est reconnu par p75^{NTR} grâce à deux sites situés sur un monomère de NGF, néanmoins la contribution des 2 monomères est indispensable à l'interaction. Le site 1 du NGF s'associe aux CRD1 et CRD2 de p75^{NTR}, le site 2 interagit avec la jonction CRD3-CRD4 comme illustré dans la figure 14A. Par ailleurs, le dimère de NGF est symétrique et chaque molécule est compétente pour engager la liaison à p75^{NTR}. A ce titre, les sites putatifs de liaison à p75^{NTR} du deuxième monomère de NGF sont nommés pseudosite 1 et pseudosite 2.

La cristallographie de p75^{NTR} réalisée par He et Garcia a nécessité l'ajout de tunicamycine dans leur préparation empêchant les N-Glycosylations. Bien que réalisée sur la protéine entière de rat, ils ont en fait travaillé sur le protomère de p75^{NTR}. C'est pourquoi une deuxième équipe a réalisé la purification du domaine extracellulaire de p75^{NTR} humain et N-Glycosylé pour étudier son interaction à un dimère de NGF (Aurikko et al., 2005). Leurs résultats de spectrométrie de masse et d'ultracentrifugation mettent clairement en exergue un ratio 2 : 2 du complexe p75^{NTR}-NGF dans leurs conditions expérimentales. Ils expliquent les différences obtenues avec He et Garcia par leur préparation de p75^{NTR} qui est non glycosylée et de rat. Malgré ces différences stœchiométriques, les 2 équipes montrent le même mode de liaison du NGF à p75^{NTR}.

p75^{NTR} a la particularité d'être partagé par les 4 neurotrophines. La cartographie des résidus situés dans les sites I et II du complexe NGF-p75^{NTR} a donc été soumise à l'alignement de séquences des 4 neurotrophines et montre que les acides aminés en contact avec p75^{NTR} y sont

Introduction

très conservés (Figure 14B). Il est bon de noter que $p75^{NTR}$ reconnaît des acides aminés situés dans les neurotrophines matures et que la liaison des proneurotrophines, également ligands de $p75^{NTR}$, se fait aussi par leur domaine « mature » (se reporter au § I. C. 7. b).

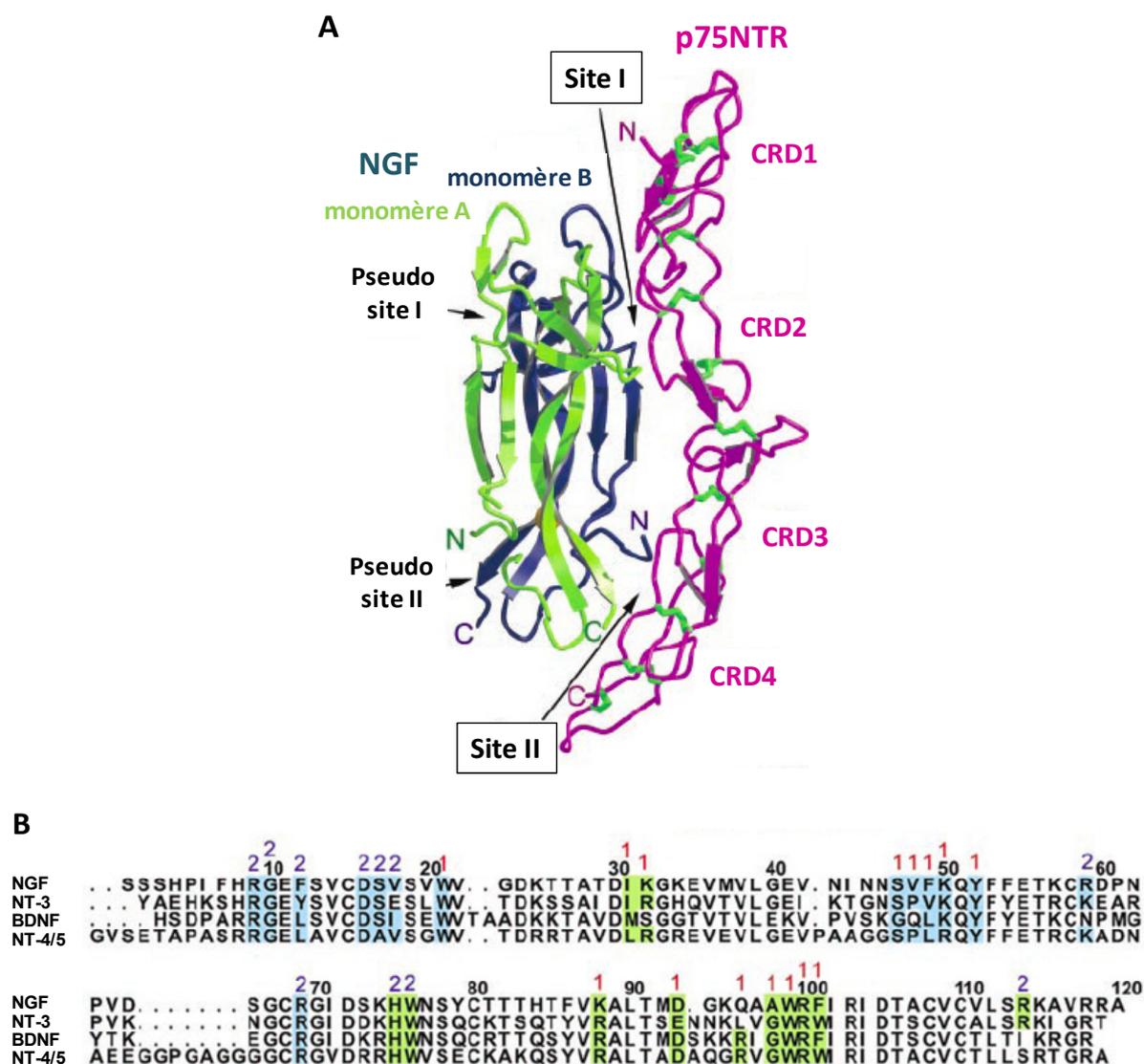


Figure 14. Structure du complexe NGF- $p75^{NTR}$.

A. Modèle de liaison d'un dimère de NGF à une molécule $p75^{NTR}$ (rapport 2 : 1). $p75^{NTR}$ (en violet) reconnaît des sites spécifiques (site I et site 2) d'un monomère A (vert) de NGF. Le site I interagit avec les CRD1 et 2 et le site 2 avec la jonction CRD3-CRD4 de $p75^{NTR}$. Les sites potentiels d'interaction du monomère B (bleu) de NGF et de $p75^{NTR}$ sont appelés pseudosites 1 et 2. B. Alignement des séquences des 4 neurotrophines montrant que les résidus en contact avec $p75^{NTR}$ sont très conservés. En vert : résidus des monomères A ; en bleu : résidus des monomères B ; 1 : site I ; 2 : site II. (He and Garcia, 2004).

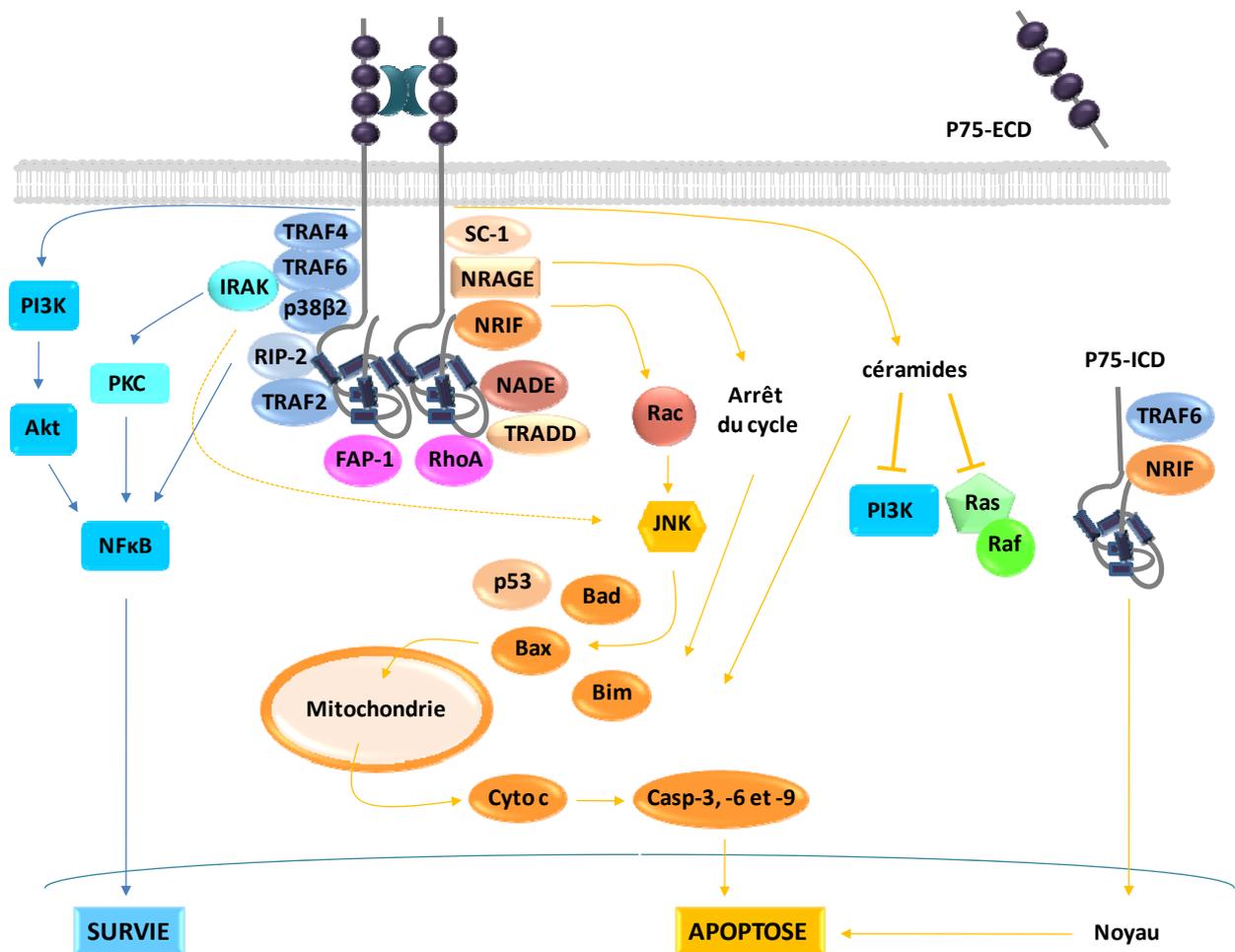
I. C. 6. Voies de signalisation activées par p75^{NTR}

Figure 15. Représentation schématique des voies de signalisation de p75^{NTR}.

La fixation des neurotrophines à p75^{NTR} entraîne le recrutement de protéines adaptatrices sur les domaines intracellulaires du récepteur. Elles initient des voies de signalisation de survie via NFκB ou de mort via JNK, un arrêt du cycle cellulaire ou les céramides et la voie mitochondriale apoptotique. RhoA initie une voie plus mineure de neuritogenèse. Le clivage de p75^{NTR} libère un domaine extracellulaire (p75-ECD) et un domaine intracellulaire (p75-ICD) capable de se transloquer dans le noyau et d'induire l'apoptose. TRAFs : Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor; IRAK : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase ; p38β2: MAP Kinase p38β2 ; RIP-2 : Receptor-Interacting Protein 2 ; PKC : Protein Kinase C ; PI3K : Phosphatidyl Inositol Tri-Phosphate Kinase ; NRIF : Neurotrophin Receptor Interacting Factor ; Sc-1 : Schwann cell factor-1 ; NADE : Neurotrophin receptor Associating Death Effector ; NRAGE : Neurotrophin Receptor-interacting MAGE homolog ; JNK : c-jun N-terminal Kinase ; Bad : Bcl-2/Bcl-x-associated death promoter ; Bax : Bcl-2-associated X protein ; Bim : Bcl2-interacting protein ; cyto c : cytochrome c ; Ras : Ras GTPase activating protein ; Raf : Raf kinase ; FAP-1 Fas-Associated Protein-1; TRADD : Tumor Necrosis Factor Associated Death Domain ; Rho membre de la famille des GTPases.

Introduction

Le récepteur p75^{NTR}, tout comme les membres de la famille des récepteurs au TNF, ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque et sa signalisation est effective grâce à des protéines adaptatrices intracellulaires. Elles induisent majoritairement 2 voies de signalisation antagonistes selon le contexte cellulaire: la survie et la mort cellulaire (Figure 15). De façon similaire aux récepteurs Trk, l'étude et l'analyse des voies de signalisation du récepteur p75^{NTR} ont été réalisées dans le modèle cellulaire de phéochromocytome de rat (PC12) et dans les cellules neuronales.

1. C. 6. a) Les voies apoptotiques

La mort cellulaire induite par p75^{NTR} dépendrait à la fois du domaine chopper mais aussi du domaine de mort puisque des preuves de l'implication de chacun d'entre eux ont été apportées (Coulson et al., 2000; Coulson et al., 1999) (Mukai et al., 2000; Wang et al., 2001). Il est très probable que chacun des domaines signale indépendamment d'une manière tissu et même population cellulaire spécifique.

Les événements apoptotiques liés à l'activation de p75^{NTR} impliquent dans la grande majorité des cas la kinase JNK. Elle phosphoryle c-jun, active p53 et la voie apoptotique mitochondriale en activant les membres de la famille « BH3-domain only » Bad et Bim, la translocation mitochondriale de Bax, et la libération de cytochrome c qui stimule à son tour les caspases 9, 6 et 3 (Nykjaer et al., 2005). En amont, la petite protéine G Rac est un activateur établi de JNK, cependant elle ne peut se lier directement au récepteur p75^{NTR} et requiert des adaptateurs cytosoliques. Le lien entre les adaptateurs directs de la queue intracellulaire de p75^{NTR} et de Rac reste à démontrer, néanmoins certains des adaptateurs ont été montrés pour initier la mort cellulaire. NRIF, NADE, NRAGE, Sc-1 et les TRAFs ont, seuls ou en combinaison, été décrits pour initier l'apoptose dépendante de p75^{NTR}. Une voie annexe impliquant les céramides a également été décrites pour son action dans l'apoptose dépendante de p75^{NTR}.

- Les adaptateurs impliqués dans l'apoptose

- NRIF est une protéine à doigt de zinc, elle est nucléaire et s'accumule dans le cytosol en présence du récepteur p75^{NTR} sur lequel elle se fixe dans la région juxtamembranaire ou sur son domaine de mort (Casademunt et al., 1999). L'inactivation du gène de NRIF dans des

Introduction

neurones sympathiques inhibe l'apoptose induite par JNK et p75^{NTR} suggérant un rôle en amont de cette kinase. L'activation de JNK nécessite la coexpression de TRAF6 et de NRIF (Gentry et al., 2004; Linggi et al., 2005; Yeiser et al., 2004). De plus, leur complexe permet à TRAF6 de conduire l'ubiquitination de NRIF nécessaire à sa translocation dans le noyau (grâce à sa séquence NLS) où il y agit comme répresseur transcriptionnel et bloque le cycle cellulaire (Geetha et al., 2005). Le transport de NRIF dans le noyau est notamment réalisé après le clivage de p75^{NTR} et la libération dans le cytosol de son domaine intracellulaire (p75-ICD) avec lequel il se complexe (Kenchappa et al., 2006). Ainsi la protéine NRIF a-t-elle des effets pleiotropiques (activation de JNK, répresseur transcriptionnel) tous impliqués dans l'apoptose dépendante de p75^{NTR}.

- NRAGE et NADE ont été découvertes lors du criblage des protéines associées à p75^{NTR} par double hybride (Mukai et al., 2000; Salehi et al., 2000). NRAGE fait partie des protéines MAGE dont le domaine du même nom permet son association au domaine juxtamembranaire de p75^{NTR}. La transfection de NRAGE dans des cellules PC12 provoque une forte induction de la kinase JNK, une accumulation de cytochrome c dans le cytoplasme et une activation de la voie des caspases (Salehi et al., 2002). Par ailleurs, NRAGE contribue un peu plus aux effets proapoptotiques de p75^{NTR} par le blocage du cycle cellulaire de PC12 (Wen et al., 2004). NADE se lie quant à elle au domaine de mort de p75^{NTR}. Il est apparu que NADE induisait l'apoptose suite à l'activation exclusive du récepteur par le NGF alors que la NT-3, la NT-4/5 et le BDNF ne permettent pas son recrutement dans des cellules 293T, PC12, nnr5 et des oligodendrocytes (Mukai et al., 2000).

- Sc-1 est, comme NRIF, une protéine à doigt de zinc et possède un domaine appelé PR pour « positive regulation » commun à d'autres facteurs de transcription agissant comme répresseurs transcriptionnels (Chittka and Chao, 1999). De façon similaire à NRIF, la liaison du NGF au récepteur p75^{NTR} induit à la fois le recrutement de Sc-1 par le domaine juxtamembranaire et sa translocation nucléaire (Kendall et al., 2003). De plus comme NRAGE, Sc-1 provoque un arrêt du cycle cellulaire par la répression transcriptionnelle du gène promototique de la cycline E de cellules NIH3T3 et de PC12 (Chittka et al., 2004) suggérant un mécanisme d'action semblable de ces protéines dans l'effet de p75^{NTR}.

Introduction

- La voie des céramides

La liaison des neurotrophines à p75^{NTR} stimule des sphingomyélinases et l'hydrolyse des sphingomyélines conduit à l'accumulation de céramides (Dobrowsky et al., 1994). Les céramides sont des éléments structuraux de la membrane plasmique et peuvent agir comme second messenger afin d'induire des effets apoptotiques ou trophique en fonction de leur niveau intracellulaire (Blochl and Blochl, 2007). Le traitement de neurones de l'hippocampe par du NGF induit un effet trophique de cellules fraîchement adhérentes et un effet apoptotique sur des cellules de passage plus avancé. L'observation de l'apoptose est corrélée à une augmentation de l'expression de p75^{NTR}, de la synthèse de céramides, eux-mêmes phosphorylant la kinase JNK (Brann et al., 2002). D'autre part, les céramides contribueraient à l'apoptose dépendante de p75^{NTR} en inhibant des protéines impliquées dans la survie cellulaire. Il a été montré que les céramides liaient Raf et pouvaient induire la formation d'un complexe Ras-Raf inactif inhibant la signalisation de Erk (Muller et al., 1998) et qu'ils inhibaient la PI3 kinase directement et indirectement (Zhou et al., 1998; Zundel et al., 2000). Cependant ces événements n'ont à ce jour pas été directement liés au récepteur p75^{NTR}. Finalement, un rapport montre que des concentrations variables de céramides entraînent des effets opposés dans le même type cellulaire PC12. En effet, des concentrations élevées inhibent la PKC zeta et induisent la mort alors que de faibles concentrations de céramides initient la survie cellulaire par l'intermédiaire de NFκB (Wang et al., 1999).

1. C. 6. b) La voie de survie cellulaire

La liaison des neurotrophines au récepteur p75^{NTR} induit l'activation du facteur NFκB et la survie neuronale (Hamanoue et al., 1999) grâce au recrutement de divers adaptateurs ou directement de la PI3 kinase.

- TRAF6 est recruté par le domaine juxtamembranaire du récepteur suite à l'activation de p75^{NTR} par les neurotrophines (Khursigara et al., 1999). Puis IRAK se lie à ce complexe avec une PKC atypique (iota) et la protéine p62 (PKC-interacting protein p62) (Mamidipudi et al., 2002; Mamidipudi et al., 2004). IκB Kinase-β (IKK-β), substrat de la PKC, est alors recrutée et activée par le complexe. Finalement, IKK-β phosphoryle IκB qui libère le facteur de transcription NFκB activateur de gènes impliqués dans la survie cellulaire. Notons que p62 et l'activité kinasique de IRAK semblent essentielles à l'activation de NFκB (Wooten et al.,

Introduction

2001). p75^{NTR} est capable de fixer les autres TRAFs (1-6), mais outre le rôle de TRAF4 connu pour l'inhibition de la voie NFκB (Ye et al., 1999), leur fonction n'est pas élucidée.

- RIP-2 est une protéine adaptatrice possédant un domaine sérine/thréonine kinase et un domaine de recrutement des caspases (CARD). Elle se fixe sur le domaine de mort de p75^{NTR} grâce à son domaine CARD (Khursigara et al., 2001) et active la voie de survie de NFκB. Par ailleurs, la surexpression de la protéine Bex-1 (brain-expressed X-linked 1) dans les cellules PC12 inhibe l'induction de NFκB en réponse au NGF. Le mécanisme serait que Bex-1 entre en compétition avec RIP-2 pour la liaison à p75^{NTR} (Vilar et al., 2006).

- FAP-1 se compose de 6 domaines PDZ et est donc recrutée par le domaine d'interaction PDZ de la queue carboxyl terminale de p75^{NTR}. Le rôle précis de FAP-1 dans la signalisation de p75^{NTR} n'est pas clarifié cependant sa liaison à p75^{NTR} dans les cellules 293T est corrélée à une modeste augmentation de la survie induite par NFκB et un p75^{NTR} mutant dépourvu du site d'interaction de FAP-1 augmente la sensibilité de ces cellules à la mort induite par le tamoxifen (Irie et al., 1999).

- La voie de signalisation de la PI3-K/Akt joue un rôle majeur dans la voie de survie régulée par les récepteurs tyrosine kinase (voire § I. B. 6. b) et des travaux montrent que cette même voie de survie cellulaire est engagée par le récepteur commun aux neurotrophines (Roux et al., 2001). Ces travaux ont montré que l'activation d'Akt était dépendante de p75^{NTR}, nécessitait une PI3K active et était associée à une phosphorylation accrue de p85 et de shc. L'hypothèse la plus évoquée est que Akt phosphoryle IκB Kinase 1 (IKK1) qui active ensuite NFκB.

I. C. 6. c) La voie RhoA

La liaison des neurotrophines à p75^{NTR} engage une voie annexe, celle de la famille des Rho GTPases. Des cellules transfectées avec p75^{NTR} activent RhoA alors que cette activation est abolie par la liaison des neurotrophines. De plus l'inhibition des protéines Rho dans des neurones en culture mime l'effet des neurotrophines en induisant l'élongation des neurites. Ainsi les neurotrophines inhibent l'activité des protéines Rho et permettent l'élongation des neurites alors que p75^{NTR} seul initie l'activité des Rho et inhibe l'élongation des neurites. p75^{NTR} facilite la libération de RhoA par RhoGDI (Rho GDP dissociation inhibitor) *via* une

interaction directe avec cette dernière conduisant à l'inhibition de la croissance des neurites (Yamashita and Tohyama, 2003; Yamashita et al., 1999).

I. C. 7. Les coRécepteurs de p75^{NTR}

p75^{NTR} est d'abord décrit tel un membre de la famille des récepteurs au TNF comme un récepteur de mort puis apparaît suivant le contexte cellulaire comme un récepteur de survie. Cette nature « Jekyll et Hyde » se complique progressivement avec l'identification d'une association en complexe des Trk avec p75^{NTR}, et devient encore plus complexe avec la découverte des proneurotrophines également ligands de p75^{NTR}. Les différents effets biologiques induits par p75^{NTR} sont en partie dus à des complexes multimériques et à son interaction avec des co-récepteurs illustrés dans la figure 16.

Récepteurs	p75 ^{NTR}	p75 ^{NTR} /Trk	p75 ^{NTR} /sortiline	NogoR/p75 ^{NTR} /LINGO-1
Ligands	NT	NT	proNT	Nogo MAG OMGP
Affinité	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹¹ M	10 ⁻¹⁰ M	
Réponse cellulaire	Apoptose Survie	Survie	Apoptose	Inhibition de la croissance des neurites

Figure 16. Représentation schématique des co-récepteurs de p75^{NTR}.

p75^{NTR} est un récepteur sans activité catalytique intrinsèque mais il coopère avec différents partenaires protéiques pour former des complexes multimériques de récepteurs et induire des réponses cellulaires différentes. p75^{NTR} interagit physiquement avec les récepteurs Trk, les complexes p75^{NTR}-Trk sont activés par les neurotrophines matures, accentuent la liaison préférentielle des ligands au Trk et produisent un effet de survie.

Introduction

Le second complexe p75^{NTR}-sortiline induit la mort cellulaire suite à la liaison des proneurotrophines notamment le proBDNF et le proNGF. Finalement, p75^{NTR} peut former un complexe tripartite avec les récepteurs Nogo et LINGO-1, il est stimulé par les ligands Nogo, MAG et OMGP et inhibe la croissance des neurites. NT : Neurotrophines ; ProNT : Proneurotrophines ; MAG : myelin-associated glycoprotein ; OMGP : oligodendrocyte myelin glycoprotein. Adapté de (Barker, 2004; Lu et al., 2005; Schweigreiter, 2006)

I. C. 7. a) Les récepteurs tyrosine kinase

- Association p75^{NTR}-Trk

Les récepteurs Trk ont longtemps été référencés comme les récepteurs de haute affinité des neurotrophines mais aujourd'hui leur affinité pour les neurotrophines est décrite comme étant similaire à celle de p75^{NTR} ($K_d \approx 10^{-9}M$) lorsque les récepteurs sont exprimés séparément. Lorsqu'ils sont coexprimés, p75^{NTR} améliore l'affinité ($K_d \approx 10^{-11}M$) et la sélectivité des ligands aux Trk et en conséquence permet une meilleure réponse des récepteurs Trk aux neurotrophines (Hempstead et al., 1991). En effet, le complexe TrkA-p75^{NTR} est activé par le NGF et non par la NT-3, et de façon semblable, TrkB-p75^{NTR} répond au BDNF mais moins à la NT-4/5 et peu à la NT-3.

Il est établi depuis le début des années 1990 que les récepteurs des neurotrophines p75^{NTR} et Trk sont capables de coopérer. Néanmoins, il existe encore aujourd'hui une controverse quant à une association physique des récepteurs. Certains groupes de recherche ont montré notamment par des expériences de co-immunoprécipitation des interactions directes entre les récepteurs TrkA, TrkB, TrkC et p75^{NTR} (Bibel et al., 1999; Huber and Chao, 1995; Lad et al., 2003). De plus, ce seraient les domaines transmembranaire et cytoplasmique de TrkA et de p75^{NTR} qui seraient responsables de la formation des sites de haute affinité, p75^{NTR} serait en effet capable d'altérer la conformation de TrkA afin de générer un site de haute affinité pour le NGF (Esposito et al., 2001). De récents travaux discutés dans la revue de Barker proposent, quant à eux, un modèle de passage de ligand entre p75^{NTR} et TrkA où un dimère de NGF se fixerait rapidement à un dimère de p75^{NTR} laissant disponible une interface d'interaction pour TrkA. Le NGF est ensuite présenté à un monomère de TrkA puis se fixe à un deuxième récepteur TrkA conduisant à un dimère TrkA actif (Barker, 2007; Wehrman et al., 2007). Aussi Wehrman et ses collaborateurs proposent une communication et une convergence des voies de signalisation des 2 récepteurs plutôt que des interactions directes de leurs domaines extracellulaires.

Introduction

Dans un autre schéma, l'association p75^{NTR}-Trk serait impliquée dans l'ubiquitination des Trk. L'ubiquitine ligase E2 est recrutée au complexe par TRAF6 qui possède également une activité de ligase et permet l'ubiquitination du résidu K485 de TrkA et des résidus correspondant de TrkB et TrkC, ce qui jouerait sur leur internalisation (Arevalo et al., 2006; Geetha et al., 2005; Makkerh et al., 2005).

- Signalisation des complexes p75^{NTR}-Trk

Dans bon nombre de cellules neuronales et non neuronales, l'activation de p75^{NTR} par ses ligands peut initier l'apoptose quand celui-ci est exprimé indépendamment des Trk. Par contre, lorsque p75^{NTR} et les Trk sont exprimés dans les mêmes cellules, la voie de signalisation déclenchée par les neurotrophines matures entraîne la survie des cellules. Cela est dû à la hausse d'affinité des neurotrophines pour les Trk ainsi qu'à l'habileté de la protéine Akt à supprimer le signal apoptotique initié par la liaison des neurotrophines à p75^{NTR} (Teng and Hempstead, 2004).

Des protéines ont été répertoriées pour lier à la fois p75^{NTR} et Trk lors de leur association physique. Il s'agit de la protéine ARMS (Arevalo et al., 2004; Chang et al., 2004; Roux and Barker, 2002), de la cavéoline qui est impliquée dans la formation d'invaginations de la membrane plasmique (les caveolae) servant de plateforme de signalisation (Bilderback et al., 1999; Bilderback et al., 1997; Okamoto et al., 1998) ou de FAIM (Fas Apoptosis Inhibitor Molecule) qui permet la croissance des neurites dépendante du NGF. Le mécanisme d'action de FAIM dans ce contexte n'est pas clair, cependant cette croissance des neurites implique l'activation à la fois de NFκB et de la voie Ras-MAPK (Sole et al., 2004). Enfin la protéine p62 du complexe p62-Traf6-IRAK est essentielle pour l'association des 2 récepteurs, TRAF6 assurant la liaison à p75^{NTR} et p62 à TrkA (Wooten et al., 2001).

I. C. 7. b) La sortiline

Les effets biologiques ambivalents engendrés par les neurotrophines ne peuvent seulement être expliqués par l'expression de Trk, de p75^{NTR} ou de leur complexe, il faut également compter sur leurs précurseurs. Les neurotrophines matures ont longtemps été considérées comme les seules formes biologiques actives, or les proneurotrophines forment tout comme les neurotrophines des homodimères stables en solution (Kolbeck et al., 1994). Lee et al ont été les premiers à mettre en évidence des niveaux élevés de proNGF et de proBDNF dans

Introduction

différents extraits cellulaires et surnageants. Ils ont supposé que les régions des prodomaines des différentes NT, étant très conservées entre espèces, pouvaient posséder une activité biologique (Lee et al., 2001). Par ailleurs, Egan et collaborateurs reportent en 2003 un polymorphisme dans le gène du BDNF d'un acide nucléique. Met⁶⁶-BDNF est créé par la substitution d'une valine par une méthionine en position 66 du prodomaine du BDNF. Il résulte de cette mutation des désordres neuronaux et un défaut de sortie du BDNF suggérant un rôle du proBDNF dans la maturation du BDNF par les neurones (Egan et al., 2003).

L'action des neurotrophines sur la survie et la croissance requiert leur association physique aux 2 types de récepteurs Trk et p75^{NTR}. Le problème est que la mise en jeu de p75^{NTR} semble aussi responsable de la mort de nombreux types cellulaires. Nykjaer et collaborateurs résolvent en 2004 une partie de l'énigme de dualité des neurotrophines en prouvant que le proNGF induit l'apoptose sélectivement par p75^{NTR} et non par TrkA puisqu'il ne peut s'y fixer. Cependant toutes les cellules exprimant p75^{NTR} ne répondent pas au proNGF suggérant qu'une protéine membranaire additionnelle est requise pour déclencher la mort cellulaire. Ils démontrent clairement que la sortiline est le co-récepteur de p75^{NTR} pour l'action proapoptotique activée par le proNGF alors que l'association du NGF au complexe p75^{NTR}-TrkA conduit à la survie cellulaire (Nykjaer et al., 2004) (Figure 16). Dans ce contexte, la présence ou l'absence de la sortiline détermine si p75^{NTR} agit comme un récepteur de mort ou non. Ces études ont par la suite été étendues à la deuxième proneurotrophine découverte comme ayant un rôle biologique, le proBDNF capable également d'induire la mort de neurones sympathiques par un complexe proBDNF-sortiline-p75^{NTR} (Teng et al., 2005). Ces découvertes ont été confirmées dans un modèle physiologique de souris KO pour la sortiline, les auteurs y démontrent l'implication du complexe proNT-p75^{NTR}-sortiline dans la régulation de la viabilité neuronale (Jansen et al., 2007).

La sortiline est une protéine qui possède un seul domaine transmembranaire et une courte queue C-terminale cytoplasmique lui interdisant toute transmission de signal intracellulaire. Elle fixe spécifiquement la région du prodomaine du NGF (clivée lors de la maturation) alors que p75^{NTR} fixe des régions du NGF mature. A ce jour, il n'est pas déterminé si la sortiline est un simple co-récepteur de p75^{NTR} facilitant la liaison des proNT sur celui-ci ou si elle est capable d'induire sa propre cascade de signalisation.

I. C. 7. c) Les récepteurs Nogo et LINGO-1

$p75^{\text{NTR}}$ est impliqué dans la régulation de l'élongation des neurites par les neurotrophines mais aussi par les myélines via une modulation de l'activité de Rho (§ I. C. 6. c.). La fixation de ligands dérivés des myélines Nogo, MAG et OMgp à $p75^{\text{NTR}}$ active RhoA via l'amplification de l'interaction directe de Rho-GDI (Rho GDP dissociation inhibitor) à $p75^{\text{NTR}}$ (Yamashita and Tohyama, 2003) et inhibe l'élongation des neurites. De plus, cette inhibition par $p75^{\text{NTR}}$ nécessite l'association de $p75^{\text{NTR}}$ à Nogo-R (glycolipid-anchored Nogo Receptor) et à la protéine transmembranaire LINGO-1 (Mi et al., 2004; Wang et al., 2002).

$p75^{\text{NTR}}$ peut donc s'associer aux récepteurs Trk, à la sortiline ou encore au complexe Nogo-LINGO-1. Dans l'organisme, les choses sont certainement plus complexes et le choix de la voie de signalisation à déclencher en cas de coexpression des récepteurs n'est pas simple. On peut cependant penser que la sortiline agit comme un co-récepteur essentiel et un interrupteur moléculaire permettant aux cellules coexprimant Trk et $p75^{\text{NTR}}$ de répondre aux proNT en induisant l'apoptose plutôt que la survie. En absence de sortiline, la proNT peut être clivée par des protéases extracellulaires et stimuler le récepteur à tyrosine kinase (Nykjaer et al., 2005). Ibanez confirme cette idée en proposant une balance survie/apoptose basée sur les ratios des ligands NT/proNT et des complexes de récepteurs $p75^{\text{NTR}}$ /sortiline/TrK présents dans un modèle cellulaire et à un moment donné (Ibanez, 2002).

I. D. Rôles physiologiques et pathologiques des neurotrophines

Les paragraphes précédents mettent en relief un système complexe organisé par 4 facteurs de croissance neurotrophiques hautement conservés et leurs récepteurs. En effet, les récepteurs peuvent souvent lier, certes avec des affinités variables, plusieurs neurotrophines et même (pour p75^{NTR}) leurs précurseurs mais ils peuvent également se combiner pour créer des sites de haute affinité (Trk-p75^{NTR}) ou compliquer un peu plus la situation lorsqu'ils sont tronqués. De plus, les neurotrophines induisent des réponses biologiques aussi variées voire antagonistes que la mort cellulaire, la survie cellulaire, la différenciation, la plasticité synaptique. Alors comment des molécules autant similaires pouvant se fixer au même récepteur p75^{NTR} ainsi qu'à des récepteurs tyrosine kinase conduisent-elles des réponses aussi fines lors du développement du système nerveux et comment peuvent elles être dérégulées au point d'être aujourd'hui associées à des pathologies cancéreuses ?

I. D. 1. Les neurotrophines et le développement du système nerveux

I. D. 1. a) Les KO des neurotrophines

Les souris knock-out (KO) homozygotes pour les différents gènes des neurotrophines et de leurs récepteurs ont permis de discriminer le rôle et la sensibilité des populations neuronales aux différentes neurotrophines. En l'occurrence, l'inactivation des gènes Trk entraîne des effets dramatiques sur le développement du système nerveux avec des pertes entières de populations neuronales. Ces résultats montrent que la famille des récepteurs Trk induit la plupart des fonctions biologiques comme la survie neuronale ou la croissance axonale. Le phénotype des souris KO pour p75^{NTR} est moins sévère que pour les récepteurs Trk, on y observe une diminution de l'innervation sensorielle, une perte de fonctions neurales associée à une perte neuronale. Ces expériences ont permis d'impliquer p75^{NTR} dans la régulation de la survie et de l'apoptose (Snider, 1994).

Introduction

Souris KO pour TrkA (Smeyne et al., 1994):

Les souris n'exprimant pas le gène TrkA sont viables à la naissance mais plus petites que les sauvages. Par contre, elles meurent dans le premier mois de leur vie car les racines dorsales des ganglions et des neurones trijumeaux sont très réduites à la naissance, et après 10 jours, les ganglions sympathiques ont totalement disparu. L'axe NGF-TrkA est donc essentiel au développement du système nerveux central et périphérique.

Souris KO pour TrkB (Klein et al., 1993):

Les souris KO pour TrkB et dont les ligands BDNF et NT-4/5 sont abolis meurent dans les 48h due à de nombreux déficits neuronaux. En effet, l'inhibition de TrkB a pour conséquence des pertes neuronales dans les ganglions sensoriels incluant les racines dorsales des ganglions et les neurones trijumeaux, et des déficits des motoneurones. De plus elles ont des déficits morphologiques et électrophysiologiques pouvant refléter les rôles du BDNF dans la survie neuronale comme la synaptogenèse et la synthèse des neurotransmetteurs.

Souris KO pour la NT-4/5 et le BDNF :

L'abolition de la NT-4/5 et du BDNF a permis de montrer une dépendance dans certaines populations neuronales des ganglions sensoriels comme les neurones trijumeaux et vestibulaires sensoriels mais pas les motoneurones (Ernfors et al., 1994a; Jones et al., 1994). Par ailleurs le KO de la NT-4/5 provoque des déficits cellulaires mineurs et un développement adulte normal et les souris dont le gène de la NT-4/5 est muté sont morphologiquement normales, capables de se reproduire et possèdent des déficits dans les ganglions sensoriels géniculaires (Conover et al., 1995; Liu et al., 1995).

Souris KO pour l'axe TrkC/NT-3

Les KO de la NT-3 et de TrkC provoquent des déficiences dans le système nerveux périphérique et des pertes de proprio-récepteurs (Ernfors et al., 1994b; Klein et al., 1994). L'axe NT-3/TrkC régule la survie et la prolifération des précurseurs neuronaux et les branchements collatéraux des axones avec leurs cibles (DiCicco-Bloom et al., 1993; Schnell et al., 1994).

Il ressort de ces études que les neurotrophines et leurs récepteurs sont différenciellement exprimés dans les populations neuronales et leurs effets sont spécifiques.

Introduction

I. D. 1. b) Le contexte cellulaire

Pour comprendre les effets spécifiques des interactions neurotrophiques d'une cellule donnée, il faut connaître son contexte cellulaire c'est-à-dire:

- la nature des neurotrophines localement disponibles
- la combinaison des récepteurs dont dispose la cellule
- les voies de signalisation exprimées.

Le contexte cellulaire n'est évidemment pas figé et évolue. Dans le cas du système nerveux par exemple, les 3 paramètres cités changent en fonction des stades embryonnaires jusqu'à l'état adulte.

Un premier exemple prouve que 2 neurotrophines différentes activant le même récepteur ont des conséquences différentes sur la physiologie cellulaire. En effet, le phénotype de souris mutée sur la tyrosine Y490 de TrkB ressemble à celui des souris déficientes pour la NT-4/5 avec la perte de populations de neurones ganglionnaires spécifiques mais avec un effet modeste sur les neurones dépendant du BDNF. De plus, en culture la signalisation en réponse à la NT-4/5 de cellules mutées sur TrkB Y490 est très réduite alors que celle du BDNF n'est pas affectée. Ces résultats montrent que la spécificité de signalisation d'un récepteur peut être contrôlée par des interactions avec différents ligands (Minichiello et al., 1998).

Deuxièmement, lors du développement neuronal la NT-3 et le NGF activent séquentiellement TrkA et ce de façon dépendante du récepteur $p75^{\text{NTR}}$. L'induction de $p75^{\text{NTR}}$ permet aux neurones sympathiques matures de perdre leur sensibilité à la NT-3 au profit du NGF, et ainsi réduire la croissance axonale (dépendante de la NT-3) pour activer la différenciation et la survie des neurones via le NGF (Kuruvilla et al., 2004).

Le dernier exemple concerne le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ qui induit la survie ou la mort dans des populations neuronales définies et grâce à des ligands spécifiques (Teng and Hempstead, 2004). Par exemple, la survie dépendante de $p75^{\text{NTR}}$ (et indépendante de Trk) implique le BDNF et la NT-3 dans les neurones néocorticaux et le NGF dans les neurones sensoriels et les cellules de Schwann. En ce qui concerne l'apoptose dépendante de $p75^{\text{NTR}}$, elle est induite dans les oligodendrocytes par le NGF et le proNGF, dans les cellules ganglionnaires de la rétine par le NGF, dans les neurones sympathiques par le BDNF et le proNGF et enfin dans les neurones de l'hippocampe par toutes les neurotrophines et le proNGF.

I. D. 2. Les neurotrophines et le cancer

Les neurotrophines sont désormais décrites pour leur implication dans la cancérogenèse *via* des expressions dérégulées ou *de novo* dans les tissus neuronaux mais aussi en dehors du système nerveux après le développement embryonnaire. Elles augmentent alors l'invasion tumorale, la croissance clonale et causent des changements dans la morphologie de nombreux types cellulaires. Les effets sur la croissance tumorale des neurotrophines et de leurs récepteurs sont détaillés dans le texte et résumés ensuite dans la table 4.

I. D. 2. a) TrkA, NGF et cancers

- Effet pro-tumoral de TrkA

- Surexpression et activation de l'axe NGF/TrkA

TrkA seul ou en association avec le NGF est trouvé surexprimé dans les tissus hyperplasiques et les carcinomes médullaires thyroïdiens (McGregor et al., 1999), dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (non-SLC) (Ricci et al., 2005; Ricci et al., 2001), dans les lymphômes et leucémies (Koch et al., 2008; Renne et al., 2008; Renne et al., 2005), dans les carcinomes pancréatiques (Friess et al., 1999; Miknyoczki et al., 1999; Schneider et al., 2001; Zhu et al., 1999) et prostatiques puisque l'expression de TrkA augmente avec la progression tumorale prostatique (Dalal and Djakiew, 1997; Papatsoris et al., 2007). Dans les carcinomes ovariens, Davidson et al ont mis en évidence que le NGF et son récepteur TrkA sont exprimés dans les effusions de cellules cancéreuses et que le récepteur TrkA activé c'est-à-dire phosphorylé (phospho-TrkA) est exprimé dans les stades avancés de cancérisation et est par conséquent corrélé à un mauvais pronostic (Davidson et al., 2003; Odegaard et al., 2007).

Les conséquences phénotypiques de la surexpression NGF/TrkA sont *in vitro* la stimulation de la croissance sans ancrage de cellules tumorales pulmonaires (Oelmann et al., 1995), de la croissance et de la migration de cellules pancréatiques (Okada et al., 2004; Sakamoto et al., 2001; Zhu et al., 2001) et prostatiques cancéreuses (Festuccia et al., 2007b; Weeraratna et al., 2000). Pour assoir les phénotypes observés en culture de cellules, les chercheurs ont inhibé l'axe NGF/TrkA et démontré l'induction de l'apoptose de cellules A549 issues d'adénocarcinomes pulmonaires (Perez-Pinera et al., 2007) et la réduction de la croissance

Introduction

tumorale prostatique en modèle animal (Miknyoczki et al., 2002). De plus, dans les études *in vivo* le couple NGF/TrkA augmente la tumorigenèse de cellules pancréatiques cancéreuses en souris nude et est associé à la progression, l'innervation et la douleur du patient atteint de ce cancer (Dang et al., 2006; Zhu et al., 1999; Zhu et al., 2002), enfin il contribue à l'angiogenèse des tumeurs de l'ovaire et du pancréas (Campos et al., 2007; Davidson et al., 2003).

○ Isoforme de TrkA

L'isoforme TrkA-III décrit dans le paragraphe I. B. 4. a est associé à une agressivité tumorale des neuroblastomes. Le pouvoir oncogénique de cet isoforme dépourvu des exons 6, 7 et 9 réside dans sa capacité à s'autoactiver mais aussi à antagoniser, de manière NGF indépendante, la signalisation des isoformes TrkA-I et TrkA-II. En conséquence, l'expression de TrkA-III favorise la survie cellulaire (par PI3K/AKT/NFκB), la tumorigenèse et l'angiogenèse en culture de cellules et modèle animal (Tacconelli et al., 2004; Tacconelli et al., 2005a; Tacconelli et al., 2005b).

● Effet anti-tumoral de TrkA

Les neuroblastomes sont des tumeurs solides communes de l'enfant, ils sont issus de cellules primitives du système nerveux sympathique. Les patients atteints de neuroblastomes sont divisés en 2 groupes principaux, les tumeurs dites à « risque faible » de bon pronostic pouvant régresser spontanément et les tumeurs à « risque élevé » de mauvais pronostic et associées à un comportement agressif c'est-à-dire à la formation de métastases.

Comme cité ci-dessus, l'isoforme TrkA-III est associé à un mauvais pronostic pour les neuroblastomes à risque élevé alors que la surexpression de TrkA pleine longueur est corrélée à un bon pronostic (Kogner et al., 1993). L'activation de TrkA par le NGF induit une cascade de signalisation aboutissant *in vitro* à la différenciation neuronale et la surexpression de TrkA dans des cellules de neuroblastomes régule négativement l'expression de gènes proapoptotiques et angiogéniques conduisant à une réduction de l'angiogenèse tumorale *in vivo* (Eggert et al., 2002; Eggert et al., 2000; Schulte et al., 2005).

Il est finalement reporté dans les cancers pulmonaires à petites cellules (SCLC) une inhibition de la prolifération, de la croissance sans ancrage et de la migration cellulaire *in vitro* et une réduction de la croissance tumorale *in vivo* suite à un traitement par le NGF (Missale et al., 1998).

I. D. 2. b) TrkB, BDNF et cancers

- Effet pro-tumoral de TrkB

TrkB est décrit pour son action pro-tumorale dans les neuroblastomes, les tumeurs de Wilm's, les adénocarcinomes de la prostate et du pancréas, les myélomes et les lymphomes hodgkiniens. La dérégulation de son expression engage la progression tumorale en stimulant la prolifération et la survie cellulaire des cellules cancéreuses primaires puis agit sur leur dissémination en augmentant l'invasion et en inhibant l'anoïkis et finalement induit l'angiogenèse.

- Surexpression de TrkB et/ou du BDNF dans les tumeurs primaires

Les premières études concernant l'implication du récepteur TrkB dans les cancers ont été réalisées sur le neuroblastome. TrkB est souvent surexprimé dans le neuroblastome (35% des cas) en particulier dans les tumeurs précoces et immatures et est fréquemment associé à une amplification du locus MYCN un marqueur néfaste de l'évolution de la maladie (Edsjo et al., 2003; Nakagawara et al., 1994). Généralement dans ces cellules le BDNF y est aussi surexprimé et affecte de manière autocrine et paracrine, la croissance et la différenciation *via* l'activation des voies PI3K et PLC γ (Aoyama et al., 2001; Matsumoto et al., 1995). De plus, TrkB contribue au phénotype métastatique des neuroblastomes de mauvais pronostiques en promouvant leur potentiel invasif et la dissémination des cellules (Matsumoto et al., 1995; Schulte et al., 2005). Une dernière observation accentue encore le rôle défavorable de TrkB puisque sa surexpression protège les cellules neuroblastiques en culture des agents anticancéreux apoptotiques (Ho et al., 2002; Li et al., 2005; Li et al., 2007b).

La surexpression de TrkB est également observée dans les cancers non neuronaux. Par exemple, dans les tumeurs de Wilm's, la surexpression de TrkB est corrélée à une augmentation du risque de mortalité (Eggert et al., 2001). Dans les adénocarcinomes de prostate, 22/32 tumeurs primaires et 6/10 métastases osseuses le surexpriment (Dionne et al., 1998) et une étude récente montre la présence du BDNF dans des biopsies de cancer de la prostate suggérant un rôle possible de l'axe TrkB/BDNF (Bronzetti et al., 2008). De la même façon, les niveaux de TrkB sont plus élevés dans les tissus cancéreux du pancréas (adénocarcinome canalaire) comparativement au tissu normal adjacent et des métastases au foie apparaissent d'autant plus précocement que les tumeurs sont TrkB positives (Miknyoczki

Introduction

et al., 1999; Sclabas et al., 2005). Dans les myélomes multiples, Pearse et collaborateurs mettent en évidence des niveaux élevés de TrkB et de BDNF et l'activation du complexe stimule la survie cellulaire par l'intermédiaire des MAPK et de la PI3K. De plus, ils insistent sur le rôle de l'axe BDNF/TrkB dans la progression tumorale *via* les interactions des cellules cancéreuses avec les cellules adjacentes normales exprimant le BDNF et TrkB (ostéoblastes, cellules du stroma, cellules endothéliales) (Pearse et al., 2005). Enfin, la surexpression de TrkB est observée dans les lymphomes hodgkiniens (Renne et al., 2005).

Récemment, une étude descriptive basée sur l'utilisation de techniques de protéomiques globales a démontré une corrélation entre l'augmentation de la quantité d'une protéine de 27 kDa dans le sérum de rat et la progression tumorale d'un hépatocarcinome cellulaire, cette protéine est identifiée comme étant le BDNF. L'identification est validée par immunohistochimie et RT-PCR puisque le BDNF est exprimé uniquement dans le tissu tumoral et non dans le tissu normal adjacent. Les tests biologiques réalisés ensuite démontrent que le BDNF active TrkB et la prolifération des cellules cancéreuses hépatiques de façon dépendante de l'Hsp90 (Yang et al., 2005). De plus, l'axe BDNF/TrkB interviendrait dans la formation de métastases issues d'un carcinome hépatocellulaire (Xiao et al., 2006).

○ TrkB/BDNF et angiogénèse

La surexpression de TrkB est donc souvent associée à une augmentation de son potentiel métastatique (dans le neuroblastome, les adénocarcinomes du pancréas ou les carcinomes hépatocellulaires). De façon intéressante, le BDNF peut lui aussi contribuer aux phénotypes de mauvais pronostiques en aidant le recrutement de facteurs proangiogéniques (Kermani and Hempstead, 2007). Ainsi, l'axe TrkB/BDNF est impliqué dans la formation de cancers primaires et secondaires par des modulations de la croissance cellulaire mais aussi par un processus de néovascularisation.

○ Résistance à l'anoïkis et dissémination

L'anoïkis joue un rôle critique dans l'homéostasie tissulaire des épithélium par un contrôle physiologique de la dissémination des cellules dans l'organisme. En effet, les cellules épithéliales perdant leur contact à la matrice extracellulaire sont induites en apoptose et cette mort cellulaire particulière est appelée anoïkis. Logiquement, les gènes responsables de la suppression de l'anoïkis confèrent aux cellules une capacité augmentée à la formation de métastases. Dans ce contexte, l'équipe de Peeper établit un modèle cellulaire (cellules

Introduction

épithéliales intestinales de rat) non tumoral mimant l'anoïkis. Les cellules non adhérentes à la boîte de Petri meurent *in vitro*, et, sont incapables de former des tumeurs en souris immunodéficientes. Grâce à ce modèle, ils sélectionnent un clone issu de la transfection d'une banque d'ADNc capable de former de larges agrégats cellulaires en suspension et identifient dans l'insert d'ADN le récepteur TrkB (Douma et al., 2004). Ils confirment leurs résultats préliminaires grâce à des lignées stablement transfectées où *in vitro* la surexpression de TrkB induit la suppression de la mort cellulaire et la prolifération des cellules en suspension, et ceci d'autant plus si le BDNF est coexprimé à son récepteur, et *in vivo* rend les cellules très tumorigènes. La protection de TrkB contre l'anoïkis nécessiterait le domaine kinasique du récepteur et résulterait de l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt (Douma et al., 2004; Geiger and Peeper, 2007). La résistance à l'anoïkis induite par TrkB a récemment été suggérée dans le cancer des ovaires par l'intermédiaire de cette même voie PI3K/Akt (Yu et al., 2008).

L'observation que l'activation de TrkB dans les cellules épithéliales stimule à la fois la tumorigenèse et la formation de métastases soulève la possibilité d'une intervention précoce de TrkB dans la cancérogenèse en dotant les cellules primaires d'un large spectre de capacités pro-tumorales.

- Mutations du gène de TrkB

Contrairement aux récepteurs TrkA et TrkC qui peuvent être activés dans les cancers par l'intermédiaire de protéines chimériques ou issues d'épissages alternatifs aberrants, l'activation de TrkB par ces mécanismes n'y est pas décrite. Néanmoins, l'analyse de la séquence du kinome des tyrosines dans des cancers colorectaux a révélé 2 mutations dans le gène NTRK2, toutes deux situées dans le domaine kinasique (Bardelli et al., 2003). A l'heure actuelle, l'impact fonctionnel de ces mutations n'est pas déterminé mais augure la possibilité d'une existence d'autres mutants dans les cancers.

- Effet anti-tumoral de TrkB

- Surexpression de TrkB

Malgré les preuves irréfutables du rôle joué par les surexpressions de TrkB dans les comportements tumoraux agressifs, il existe un cancer où elle est associée à une réduction de la progression tumorale. Lors de la progression du carcinome médullaire de la thyroïde, la

Introduction

surexpression de TrkB dans les cellules hyperplasiques C inhibe la néoangiogenèse et en conséquence limite la croissance tumorale (McGregor et al., 1999).

○ Rôle de TrkB tronqué

Eggert et al décrivent en 2001 une corrélation positive entre l'expression du récepteur TrkB tronqué de son domaine intracellulaire kinasique (TK-) et une meilleure survie à 5 ans de patients atteints de tumeur de Wilm's alors que ceux exprimant TrkB pleine longueur ont un pronostic défavorable (Eggert et al., 2001). Ils supposent que cela est dû à un effet dominant négatif de TrkB tronqué sur le récepteur entier.

Cette même fonction est également suggérée dans les neuroblastomes où TrkB tronqué semble être préférentiellement exprimé dans les cancers différenciés de meilleur pronostic (Nakagawara et al., 1994).

Une seule étude décrit le rôle potentiel de TrkB tronqué dans la cancérisation, celui-ci est en effet fortement exprimé dans les cellules de cancer du foie et non dans les cellules normales contrairement au récepteur entier. Ainsi, les auteurs suggèrent que TrkB tronqué permet de sélectionner une signalisation conduisant à la stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses de foie, cependant cette signalisation n'est pas décrite (Yang et al., 2005).

1. D. 2. c) TrkC, NT-3 et cancers

• Effet pro-tumoral de TrkC

○ Surexpression de TrkC

Nous avons vu que les carcinomes médullaires de la thyroïde étaient stimulés par TrkA et réprimés par TrkB. En ce qui concerne TrkC, son expression est augmentée dans les stades tardifs de ce cancer et il est suggéré que le remplacement du récepteur TrkB par TrkC est nécessaire à la progression tumorale (McGregor et al., 1999).

○ Protéine de fusion oncogénique ETV6-NTRK3

De façon comparable aux protéines chimériques impliquant le récepteur TrkA et décrites comme étant oncogéniques dans les tumeurs thyroïdiennes papillaires (Pierotti and Greco, 2006), le récepteur TrkC peut former une protéine chimérique avec ETV6. La fusion des gènes ETV6-NTRK3 est initialement décrite lors du clonage de la translocation chromosomique t(12 ;15)(p13 ;q25) dans les fibrosarcomes congénitaux (ou infantiles), des

Introduction

tumeurs mésenchymateuses du jeune enfant (Knezevich et al., 1998). ETV6 (ou TEL Translocation ETS Leukemia) est un membre de la famille des gènes de facteur de transcription ETS, il subit fréquemment des réarrangements chromosomiques impliqués dans des pathologies malignes humaines. Le réarrangement chromosomique ETV6-NTRK3 fusionne le domaine N-terminal SAM (sterile alpha motif) de ETV6 au domaine C-terminal kinasique de TrkC.

La protéine chimérique obtenue est non seulement décrite dans les fibrosarcomes infantiles mais aussi dans un autre type de tumeur infantile les nephroma mésoblastiques congénitaux (Argani et al., 2000; Knezevich et al., 1998), dans un cas de leucémie aiguë myéloïde (Eguchi et al., 1999) et dans un type de cancer du sein canalaire particulier, le SBC pour secretory breast carcinoma (Li et al., 2007a; Tognon et al., 2002). Notons que les auteurs trouvent cette translocation exprimée spécifiquement dans 92% des SBC et jamais dans les cancers du sein canaux non SBC.

ETV6-NTRK3 possède de fait de puissantes capacités de transformation observées dans de multiples lignées comme les fibroblastes (Wai et al., 2000), les cellules hématopoïétiques (Liu et al., 2000) et les cellules épithéliales mammaires (Tognon et al., 2002). Son caractère oncogénique est dû à son aptitude à s'homodimériser indépendamment de ligand et à activer constitutivement la kinase de TrkC. Les adaptateurs intracellulaires IRS-1 et src se fixeraient alors aux tyrosines phosphorylées de TrkC, stimuleraient les voies de signalisation des MAPK et de PI3K/Akt et entraîneraient la survie et la progression du cycle cellulaire (Jin et al., 2007c; Lannon et al., 2004; Morrison et al., 2002; Tognon et al., 2001).

- TrkC tronqué

Une étude intéressante sur la fonction biologique de miRNA dans le neuroblastome démontre une modulation spécifique de l'expression du récepteur TrkC tronqué (sans domaine kinasique) par ces ARN. La régulation négative de l'expression de TrkC (TK-) est d'ailleurs corrélée à une répression de la croissance cellulaire. Ainsi, alors que TrkC entier est exprimé dans les cellules de neuroblastome induites en différenciation, TrkC (TK-) est exprimé dans les cellules neuroblastiques en prolifération (Laneve et al., 2007).

- Mutations de TrkC

L'analyse de séquences géniques de protéines kinases dans des cancers a mis en évidence quelques mutations dans le gène NTRK3, notamment dans des tumeurs de sein (Stephens et

Introduction

al., 2005), des cancers colorectaux (Bardelli et al., 2003), des cancers du poumon (Davies et al., 2005) et des cancers du pancréas (Wood et al., 2006) dont la fonction n'est pas décrite.

- Effet anti-tumoral de TrkC

- Le concept de récepteur à dépendance

TrkC est impliqué dans les médulloblastomes de l'enfance car l'élévation de son expression est associée à un bon pronostic. De plus, il a été proposé que son action anti-tumorale passait par une induction de l'apoptose des cellules cancéreuses puisque sa surexpression bloque la croissance de cellules de médulloblastome en souris nude et que l'expression spécifique de TrkC est corrélée avec l'apoptose au sein de biopsies de médulloblastome primaire (Grotzer et al., 2000; Kim et al., 1999). Or, les résultats publiés récemment par l'équipe de Mehlen ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'effet des récepteurs tyrosine kinase dans la cancérogenèse et par extension le traitement du cancer. En effet, l'article de Servane Tauszig-Delamasure et al démontre que TrkC est un récepteur à dépendance (Tauszig-Delamasure et al., 2007). Ce concept de récepteur à dépendance est basé sur la capacité d'un récepteur à transduire deux signalisations différentes en fonction de la disponibilité du ligand. En présence du ligand, ils stimulent une voie de signalisation classique comme la prolifération ou la différenciation et en absence de ligand, ces récepteurs ne sont pas inactifs bien au contraire, et ils provoquent la mort des cellules. La signalisation et donc la cellule exprimant le récepteur sont sous la dépendance du ligand.

TrkC est ainsi capable, en absence de NT-3, d'induire l'apoptose de cellules de neuroblastes immortalisées suite à son clivage protéolytique et à l'activation des caspases. En conséquence, les auteurs suggèrent que TrkC en tant que récepteur à dépendance pourrait être impliqué dans l'inhibition de la progression tumorale notamment du médulloblastome (Tauszig-Delamasure et al., 2007).

Ce concept présente des similitudes avec celui d' « oncogene dependence » (appelé aussi « oncogene addiction ») décrit ces dernières années (Weinstein, 2002). Il a en effet été montré que dans une cellule cancéreuse présentant de nombreuses activations d'oncogènes, l'inhibition de l'un d'entre eux se traduisait non pas par une baisse de la tumorigénicité mais par une apoptose massive. Cela est dû au fait qu'un oncogène active des signaux protumoraux (prolifération, survie, angiogenèse, inhibition de la différenciation..) contrecarrant les signaux antitumoraux (apoptose, arrêt du cycle) induits par ce même oncogène. L'inhibition de l'oncogène va entraîner une inhibition rapide des signaux protumoraux et plus tardive des

Introduction

signaux antitumoraux conduisant à l'apoptose (Sharma et al., 2006; Sharma and Settleman, 2007). Si l'on considère qu'un récepteur induisant la prolifération, stimulé en permanence par son ligand est un oncogène activé, alors la déplétion du ligand entraînera une induction de l'apoptose similaire à celle induite lors de l'« oncogene dependence ». Dans ce cadre, les concepts de récepteur à dépendance et de dépendance à un oncogène sont voisins et non mutuellement exclusifs.

1. D. 2. d) P75^{NTR} et cancers

- Effet pro-tumoral de p75^{NTR}

Le mélanome est une tumeur très agressive qui prend son origine dans l'épiderme et les mélanocytes. Le postulat de départ des recherches sur l'implication des neurotrophines dans la cancérisation des mélanocytes est que ce sont des cellules de peau originaires du neuréctoderme pour lequel les neurotrophines et leurs récepteurs orchestrent le développement. Dès 1984 le récepteur p75^{NTR} fut identifié dans des mélanomes de stade avancé par immunohistochimie puis dans des cellules en culture issues des tumeurs (Herlyn et al., 1985; Ross et al., 1984). Durant la progression tumorale, les cellules de mélanome augmentent leur production de p75^{NTR} et son activation par le NGF est associée à l'invasion des cellules cancéreuses grâce à la stimulation de la sécrétion de métalloprotéases et ce de façon indépendante à TrkA (Herrmann et al., 1993; Marchetti et al., 1993). En effet, les mélanocytes originaires de la crête neurale devenus cancéreux colonisent le cerveau grâce à la stimulation par p75^{NTR} de la production d'héparanase (une enzyme dégradant la matrice extracellulaire) puis le récepteur du NGF agit dans les métastases du cerveau comme un récepteur de survie (Marchetti et al., 2004; Menter et al., 1994; Walch et al., 1999). Récemment, un article met en relief le rôle joué par p75^{NTR} associé à la sortiline mais aussi des neurotrophines, proneurotrophines et récepteurs dans le développement du mélanome (Truzzi et al., 2008). Là, les auteurs prouvent que les cellules de mélanomes expriment la sortiline et son récepteur associé p75^{NTR} et que le proNGF induit la migration des cellules cancéreuses. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés en 2003 par Shonukan et al (Shonukan et al., 2003). Ils ajoutent que les cellules normales et cancéreuses expriment et sécrètent toutes les neurotrophines et qu'elles sont impliquées dans la croissance et l'invasion tumorales par des stimulations autocrine et paracrine (Truzzi et al., 2008).

Introduction

- Effet anti-tumoral de p75^{NTR}

L'effet anti-tumoral de p75^{NTR} est démontré dans le cancer de la prostate, le cancer gastrique et l'hépatocarcinome par des mécanismes apoptotiques et d'arrêt du cycle cellulaire.

Dans le cas de la prostate, p75^{NTR} est exprimé dans les cellules normales puis il subit une perte de son expression associée à la progression tumorale comme l'ont démontré des études par immunohistochimie. De plus, des lignées métastatiques type TSU-pr1 et DU-145 n'expriment pas le récepteur et il existe une corrélation inverse entre l'expression de p75^{NTR} dans les cellules épithéliales de prostate et le marqueur du cancer de la prostate PSA (Pflug et al., 1992). Des observations supplémentaires ont ensuite amené à définir p75^{NTR} comme un gène suppresseur de tumeur dans la prostate. La perte d'expression de p75^{NTR} est corrélée de façon dose-dépendante à la progression tumorale et par ailleurs une équipe avait identifié un gène suppresseur de tumeur dans le cancer de la prostate situé dans la région chromosomique 17q, p75^{NTR} étant localisé en 17q12-q22 (Krygier and Djakiew, 2002; Murakami et al., 1995). Cette perte d'expression de p75^{NTR} semble contribuer à la carcinogenèse par l'inhibition de l'apoptose, la stimulation de la prolifération, et la favorisation des métastases. En effet, les cellules prostatiques possédant le récepteur p75^{NTR} sont à la fois induites en apoptose par la voie mitochondriale et l'activation des caspases 7 et 9 mais aussi retardées dans leur cycle cellulaire par une accumulation en phase G0-G1 (Khwaja et al., 2006; Pflug and Djakiew, 1998). De plus, les molécules impliquées dans l'invasion et par extension dans la formation des métastases comme les métalloprotéases MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ou l'activateur de plasminogène uPA sont régulées négativement par p75^{NTR} (Nalbandian and Djakiew, 2006). En conclusion, la carcinogenèse prostatique est excessivement complexe puisque les récepteurs du NGF ont un effet contradictoire, p75^{NTR} joue un rôle de suppresseur de tumeur alors que TrkA associé au NGF ont un effet oncogénique (Papatsoris et al., 2007).

p75^{NTR} est identifié comme un potentiel suppresseur de tumeur dans deux autres cancers, l'hépatocarcinome et le cancer gastrique. En effet, l'expression du récepteur p75^{NTR} est sensiblement diminuée voire absente dans 212 cas de cancer gastrique et 158 cas de cancer hépatique comparativement au tissu normal adjacent mais aussi dans des lignées cellulaires. De plus, la surexpression de p75^{NTR} dans des cellules cancéreuses gastriques ou hépatiques inhibe la croissance tumorales *in vitro* et *in vivo* en induisant un arrêt du cycle cellulaire grâce à la régulation des molécules du cycle cellulaire notamment les cyclines (Jin et al., 2007b;

Introduction

Yuanlong et al., 2008). De façon comparable au cancer de la prostate, p75^{NTR} inhiberait l'invasion et la formation de métastases du cancer gastrique (Jin et al., 2007a).

Organes cancéreux/ cellules malignes	TrkA	TrkB	TrkC	P75^{NTR}
Cerveau (neuroblastome)	- (+ TrkA III)	+ (- TrkB T1)	- (+ TrkC TK-)	
Peau	+	+	+	+ (avec la sortiline)
Prostate	+	+		-
Pancréas	+	+		
Thyroïde	+ (+ protéines chimériques)	-	+	
- Ovaires - Poumons (non SCLC) - Cellules du sang (lymphômes et leucémies)	+			
Poumons (SLCL)	-			
Rein (tumeur de Wilm's)		+ (- TrkB T1)		
- Plasmocytes (myélome) - Cellules lymphoïdes (Lymphomes hodgkiniens)		+		
Foie		+		-
Estomac				-
- Mésenchyme (Fibrosarcome congénital) - Cellules myéloïdes (leucémie aiguë myéloïde) - Sein (cancer du sein SBC)			+ Protéine ETV6- NTRK3	
Cerveau (Médulloblastome)			- Récepteur à dépendance ?	
Sein	+			+

Table 4. Effets pro et anti tumoraux des neurotrophines et de leurs récepteurs.

Les + indiquent un effet pro-tumoral et les – un effet anti-tumoral des récepteurs Trk et p75^{NTR} dans les cancers.

II. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCERISATION

II. A. La glande mammaire normale

Le sein est une glande exocrine qui se développe au cours de la vie de la femme dont la fonction est la sécrétion lactée suite à la parturition.

II. A. 1. Structure de la glande mammaire

La glande mammaire est entièrement incluse dans le tissu adipeux sous cutanée et rattachée à la peau par ses seuls canaux excréteurs. Elle est formée de 15 à 20 unités glandulaires indépendantes, les lobes mammaires chacun drainé par un canal galactophore principal débouchant dans le mamelon (Figures 17 et 20). Chaque lobe est constitué de 20 à 40 lobules qui s'organisent autour du canal excréteur galactophore. Les lobules et les canaux lobulaires eux mêmes débouchant sur les 10 à 100 acini ou alvéoles mammaires (Figure 17).

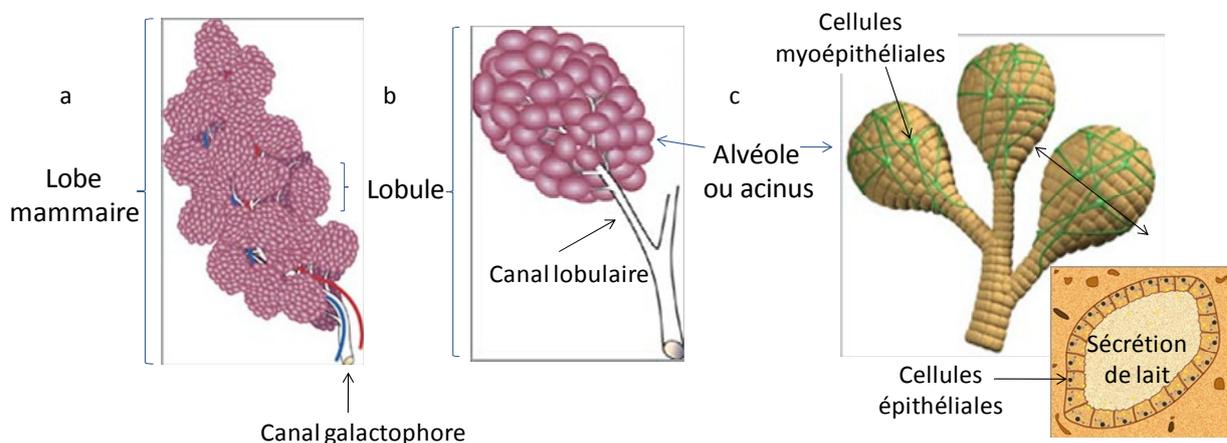


Figure 17. Représentation d'un lobe glandulaire mammaire.

Représentation schématique d'un lobe mammaire. Le lobe mammaire (a) est constitué de dizaines de lobules (b) eux même formés par les alvéoles (c). Les alvéoles sont composées d'un épithélium sécrétoire qui éjectent le lait dans les canaux alvéolaires jusqu'au canal galactophore grâce à la contraction des cellules myoépithéliales, elles mêmes réagissant au stimulus de succion. (<http://www.santeallaitementmaternel.com>).

Introduction

La glande mammaire est composée de plusieurs types histologiques distincts. Le système alvéolo-lobulo-canaulaire est formé d'une assise continue de cellules épithéliales cubiques sécrétrices de lait, doublée d'une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales fusiformes contractiles. Ces deux couches cellulaires reposent sur une lame basale et baignent dans le stroma, ou tissu palléal, formé de la matrice extracellulaire (notamment les fibres de collagène), des cellules fibroblastiques, les adipocytes, les vaisseaux sanguins nécessaires au développement de l'épithélium mammaire (Figure 18). En réponse au stimulus de succion, les cellules myoépithéliales se contractent et permettent l'éjection du produit de sécrétion, le lait, dans les canaux alvéolaires, lobulaires et galactophores.

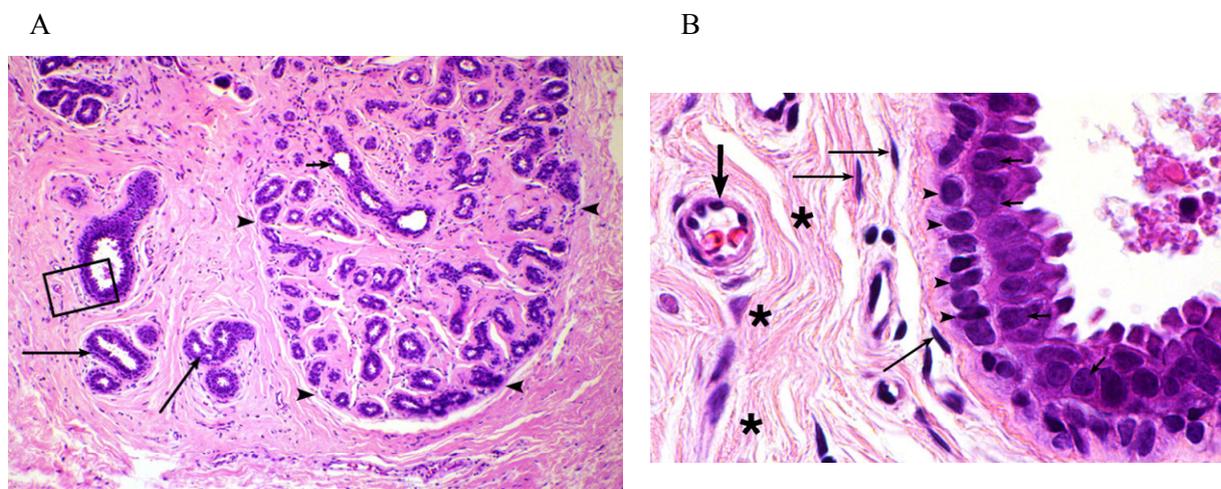


Figure 18. Histologie de la glande mammaire normale.

A. Lobule mammaire post-pubertaire, les têtes des flèches délimitent le lobule, le canal terminal alvéolaire (petite flèche) mène au réseau canalaire (grosses flèches), les fibres roses de la matrice extracellulaire (surtout du collagène) s'enroulent concentriquement autour des lobules et canaux formant un véritable tissu de soutien. B. Agrandissement de la coupe A (rectangle noir), les têtes des flèches indiquent les cellules myoépithéliales du canal, les petites flèches fines montrent les cellules épithéliales du canal, les flèches allongées indiquent les fibroblastes péri-canaux dont l'orientation est parallèle à la lame basale, les astérisques représentent les fibres de collagène et la flèche large une artériole. (Biology of the mammary gland: <http://mammary.nih.gov>).

Comme nous l'avons vu précédemment, les neurotrophines sont essentielles au développement de l'innervation. Il est donc intéressant, dans le cadre de nos travaux sur les effets de ces facteurs de croissance dans la cancérisation de la glande mammaire, de connaître l'innervation du sein.

Introduction

Le sein est innervé par trois groupes de nerfs qui convergent vers la plaque aréolo-mamelonnaire.

- Le groupe antérieur comprend les branches cutanées antérieures des 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} nerfs intercostaux. Il se divise en une grosse branche externe à destinée mammaire et une branche interne, petite pour la peau présternale. Ces branches cheminent devant la glande.
- Le groupe latéral provient des rameaux cutanés latéraux des 4^{ème} et 5^{ème} nerfs intercostaux. Les nerfs de ce groupe se divisent en une branche antérieure à « destinée mammaire » et une branche postérieure à « destinée thoracique ». Ces branches abordent la glande par sa face postérieure, suivent les travées conjonctives interlobaires puis entre les galactophores, et innervent la peau péri-aréolaire.
- Le groupe supérieur provient de la branche sus-claviculaire du plexus cervical superficiel.

II. A. 2. Un développement sous contrôle des hormones

L'architecture de la glande mammaire se construit tout au long de la vie, du stade fœtal à la puberté, la gestation et la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance (Figure 19). La période de fonctionnement de la glande se déroule lors de la gestation puis de la lactation au cours desquelles la différenciation de la glande est maximale.

Le développement de la glande mammaire est transitoire et par conséquent hautement contrôlé. La croissance de la glande mammaire est sous le contrôle d'hormones, les œstrogènes et la progestérone, qui agissent de manière endocrine sur les cellules cibles participant ainsi à l'homéostasie tissulaire du sein. L'action des hormones se fait à la fois de manière directe par l'action sur les cellules épithéliales et indirecte par l'action sur les cellules mésenchymateuses qui sécrètent alors des facteurs de croissance EGF (Epithelial Growth Factor), TGF- α , TGF- β (Transforming Growth Factor α et β), IGF (Insulin-like Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) ou MDGF-1 (Mammary-Derived Growth Factor 1). Ils sont des régulateurs de la prolifération et de la différenciation normale de l'épithélium mammaire, sauf le TGF- β qui est un facteur inhibiteur de la croissance cellulaire. Les œstrogènes ont également une action indirecte sur la prolifération des cellules en stimulant la synthèse de protéases (uPA, MMP2, 3, 14, ADAM 17) qui, en dégradant localement la

Introduction

matrice extracellulaire contribuent à la migration et la prolifération des cellules épithéliales (Sternlicht, 2006; Sternlicht et al., 2006).

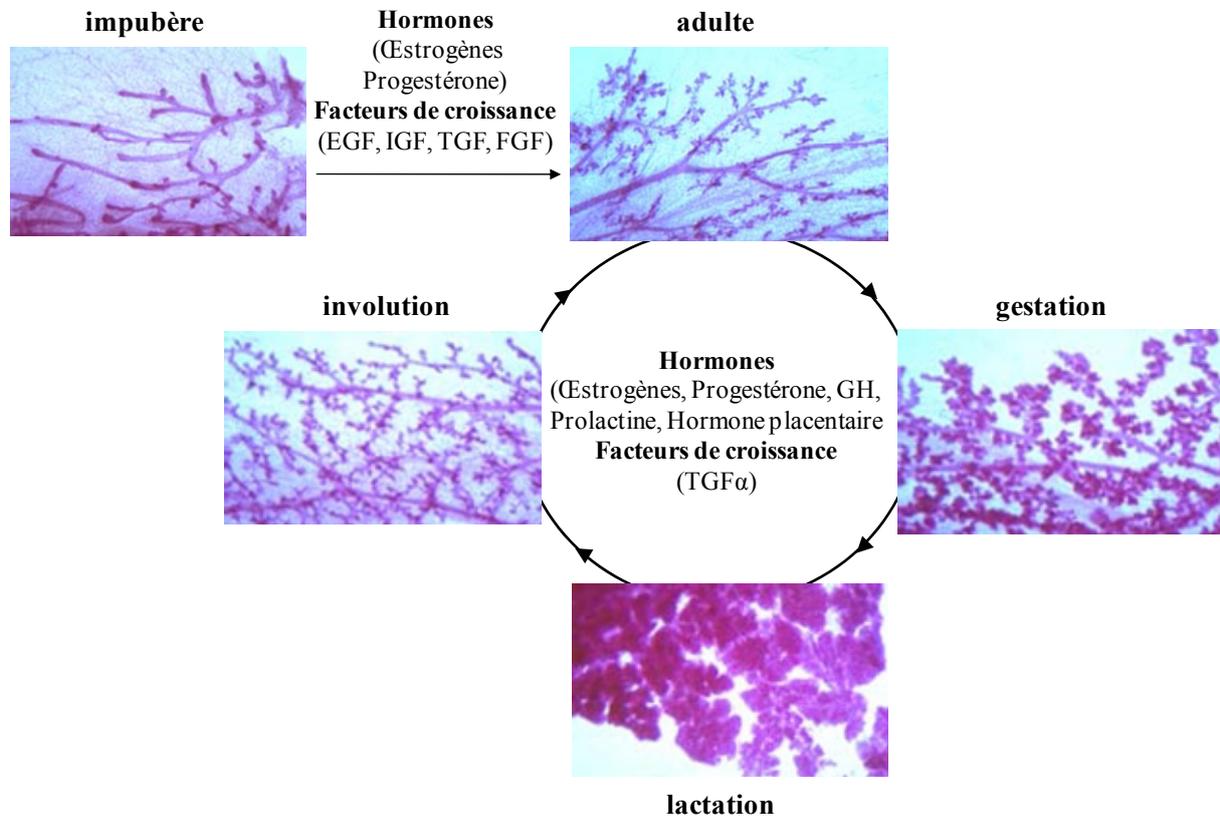


Figure 19. Développement de la glande mammaire.

Sous l'effet des hormones ovariennes et de facteurs de croissance, la glande mammaire développe son arborescence à la puberté. Les œstrogènes stimulent la croissance et les ramifications du système canalaire, et simultanément, la prolifération du tissu conjonctif péri-canalaire. La progestérone provoque la dilatation des canaux et une différenciation des cellules épithéliales en cellules sécrétoires. Lors d'une grossesse, les hormones œstrogènes/progestérone et des facteurs de croissance tels que le TGF- α stimulent le développement de nombreux tubulo-alvéoles glandulaires. Les hormones lactogènes (la prolactine, les glucocorticoïdes, la GH et l'hormone placentaire lactogène) induisent la différenciation des cellules épithéliales des acini productrices de lait. Lors du sevrage, l'accumulation du produit de sécrétion provoque la dislocation de l'épithélium mammaire et des enzymes protéolytiques (gélatinases) sont activées. La matrice extracellulaire est démantelée et les cellules épithéliales s'engagent dans un processus d'apoptose. L'arrivée massive de macrophages termine la dégradation du tissu sécréteur. Les photos sont issues de *Biology of the mammary gland* (<http://mammary.nih.gov>) (glande mammaire murine).

II. B. La cancérisation de la glande mammaire

II. B. 1. Généralités sur le cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme (moins de 1% des cas chez l'homme) et est la première cause de mortalité par cancer chez la femme. On compte près de 850 000 nouveaux cas par an dans le monde avec plus de 340 000 décès par an. L'incidence est 4 à 5 fois plus haute dans les pays occidentaux (États-Unis et Europe du nord principalement) en comparaison avec l'Asie et avec l'Afrique. En 2005, 49 814 nouveaux cas ont été dénombrés en France soit 1/3 des cancers féminins et 11 201 décès lui sont attribués représentant 20% des décès féminins par cancer. Statistiquement, une femme sur 9 sera concernée par le cancer du sein au cours de sa vie (chiffres : Institut National du Cancer).

Pendant près de 30 ans, l'incidence des cancers du sein n'a cessé de croître jusqu'à forcer les spécialistes à parler « d'épidémie », avec une augmentation de 60 % du taux standardisé pour 100 000 personnes-années entre 1980 et 2000 (55,5 et 88,9 cas respectivement) et un nombre total des cancers qui a pratiquement doublé (21 211 et 44 845 respectivement). Enfin, pour la première fois, les chiffres de l'incidence du cancer du sein en France publiés dans la revue bulletin du cancer de janvier 2008 sont favorables. Les auteurs révèlent que le taux d'incidence a baissé de 4,3% entre 2004 et 2005 et de 3,3% entre 2005 et 2006 (Allemand et al., 2008). Un phénomène identique se produit aux Etats-Unis avec une baisse de douze pour cent en 2003. Toutes les femmes ne profitent pas de cette réduction, seules les femmes âgées de plus de cinquante ans contribuent à l'amélioration des chiffres avec une chute de 6% du nombre de cancers contre seulement 0,5% pour celles âgées de moins de 50 ans. Les médecins expliquent ces progrès par l'arrêt de l'utilisation des traitements hormonaux substitutifs (THS). Cette tendance à la diminution de l'incidence est d'autant plus réjouissante que le dépistage du cancer du sein s'est accentué (augmentation de l'examen par mammographie de plus de 300% en France entre 2000 et 2006).

Le cancer du sein est une pathologie à évolution lente, il faut compter 6 à 8 ans pour qu'à partir d'une seule cellule apparaisse une tumeur de volume de 1cm^3 . L'amélioration des techniques d'imagerie et la campagne de dépistage intensive pour les femmes de 50 ans et plus en France a incontestablement amélioré la prise en charge précoce des patientes atteintes d'un cancer du sein. En effet, sous l'effet du dépistage par mammographie, une réduction

Introduction

d'environ 30 % de la mortalité par cancer du sein est clairement démontrée et acceptée sans controverse chez les femmes âgées de 50 à 69 ans inclus (Cochin et al., 2008). La recherche sur le cancer du sein n'a, à l'heure actuelle, pas permis de découvrir de marqueurs biologiques moléculaires utilisables pour un dépistage précoce et fiable du cancer du sein primaire alors que les résultats du dépistage systématique par imagerie sont avérés.

Le cancer du sein est caractérisé par l'apparition fréquente de métastases pulmonaires, hépatiques, cérébrales et osseuses. Au vue de l'amélioration de la détection des cancers primaires par imagerie, le challenge actuel des chercheurs est de déterminer des marqueurs biologiques de dissémination et d'implantation des cancers secondaires agressifs et de faible pronostique. En parallèle, comme nous allons le voir dans ce chapitre, le cancer du sein est un terme générique englobant de nombreux types de cancers du sein différents qu'il est nécessaire de caractériser moléculairement afin de définir des cibles thérapeutiques claires et d'adapter et personnaliser le traitement à chaque pathologie.

II. B. 2. La tumorigenèse mammaire

II. B. 2. a) Les stades de développement d'un cancer

Un cancer se déclare en plusieurs étapes, d'abord la transformation cancéreuse d'une cellule puis son expansion clonale et sa croissance en une masse tumorale ou cancer primaire. Par la suite, les cellules cancéreuses envahissent progressivement les tissus adjacents au niveau local puis disséminent dans l'organisme pour former des métastases ou cancers secondaires.

La figure 20 décrit les différents stades de la cancérisation d'un tissu normal avec comme exemple la cancérisation de l'épithélium canalaire mammaire. L'évolution du tissu normal en cancer passe par les stades suivants :

- l'hyperplasie : lors de l'initiation, une cellule est génétiquement modifiée, elle reste normale mais se multiplie trop vite,
- la dysplasie : les cellules vont se différencier. Les cellules continuent à proliférer de manière anarchique et présentent en plus des modifications structurales et fonctionnelles. Ce stade n'existe qu'au niveau épithélial (dysplasie et hyperplasie sont notées comme des lésions précancéreuses),

Introduction

- le cancer *in situ* : les cellules épithéliales prolifèrent uniquement au niveau local. Par exemple, lors d'un carcinome, les cellules épithéliales prolifèrent au niveau de l'épithélium, mais ne franchissent pas la membrane basale,
- le cancer invasif : les cellules vont dépasser le niveau local. Les cellules tumorales envahissent le tissu conjonctif selon un processus actif et complexe lié à l'acquisition de nouvelles propriétés biologiques,
- les métastases : les cellules néoplasiques essaient à partir de la tumeur primaire par les voies lymphatiques ou sanguines et colonisent un nouvel organe pour former un cancer secondaire.

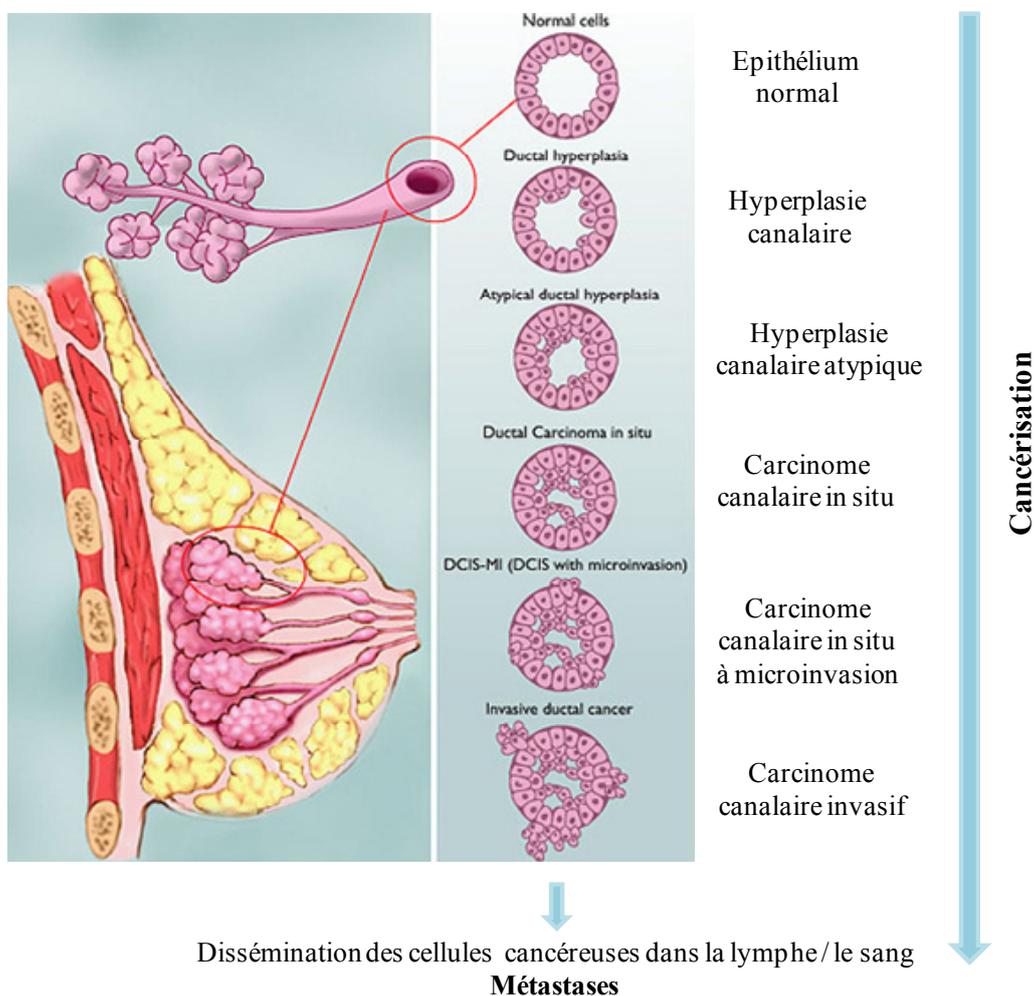


Figure 20. Stades de la cancérisation dans le cas d'un cancer du sein canalaire.

A partir d'un tube épithélial, les cellules épithéliales sous l'influence de divers signaux vont proliférer de façon anarchique jusqu'au stade de l'hyperplasie atypique. Les cellules se différencient, acquièrent des modifications structurales et prolifèrent au niveau local pour donner un carcinome in situ. Les cellules vont ensuite, grâce aux modifications phénotypiques, pouvoir passer la membrane basale pour donner un cancer invasif et métastatique. Image: site internet BC Cancer Agency <http://www.bccancer.bc.ca/default.htm>.

II. B. 2. b) Les tumeurs mammaires

- Les types de cancer du sein

Les tumeurs de sein sont dans un premier temps classées en tumeurs bénignes et malignes.

- Les tumeurs **bénignes** sont bien limitées et encapsulées, ont une croissance lente et locale et ne récidivent pas après exérèse. Parmi elles, il existe les fibroadénomes et la tumeur phyllode.

- Les tumeurs **malignes** sont quant à elles mal limitées et non encapsulées, les cellules sont irrégulières à croissance rapide et tendent à infiltrer et détruire les tissus adjacents.

La très grande majorité des tumeurs malignes (plus de 95%) sont des **adénocarcinomes** c'est-à-dire un cancer développé à partir de l'épithélium glandulaire, soit à partir des cellules des canaux (cancer canalaire) ou soit à partir des cellules des lobules glandulaires (cancer lobulaire).

Les adénocarcinomes peuvent eux-mêmes être subdivisés selon leurs caractéristiques d'infiltration du tissu avoisinant (Figure 21). On distingue alors les carcinomes *in situ* non invasif des carcinomes infiltrants ou invasifs :

- **Les carcinomes *in situ* (non infiltrants):**

Les carcinomes de sein *in situ* sont localisés soit dans les canaux et sont dits canaux (CCIS) ou dans les lobules et sont dits lobulaires (CLIS). La prolifération épithéliale maligne est dans la lumière soit du canal galactophorique (carcinome canalaire), soit des acini situés dans les lobules (carcinome lobulaire). Dans tous les cas, les membranes basales restent intactes. Les carcinomes mammaires *in situ* sont rares, les CCIS sont de bon pronostic et les CLIS sont souvent bilatéraux et évoluent dans 20 à 50% des cas vers une forme infiltrante.

- **Les carcinomes infiltrants :**

Les carcinomes sont infiltrants lorsque les cellules ont détruit la membrane basale et infiltrent le tissu adjacent. Ils représentent 98% des cancers du sein, sont le plus souvent canaux (75%), ou lobulaires (4 à 11%). Il existe d'autres formes de carcinomes infiltrants : la maladie de Paget du mamelon ; les carcinomes tubuleux, mucineux, kystique, cribriforme de bon

Introduction

pronostic ou les carcinomes apocrine, médullaire ou neuroendocrine, eux extrêmement rares (<http://www.cancer-sein.net/front/accueil.php>).

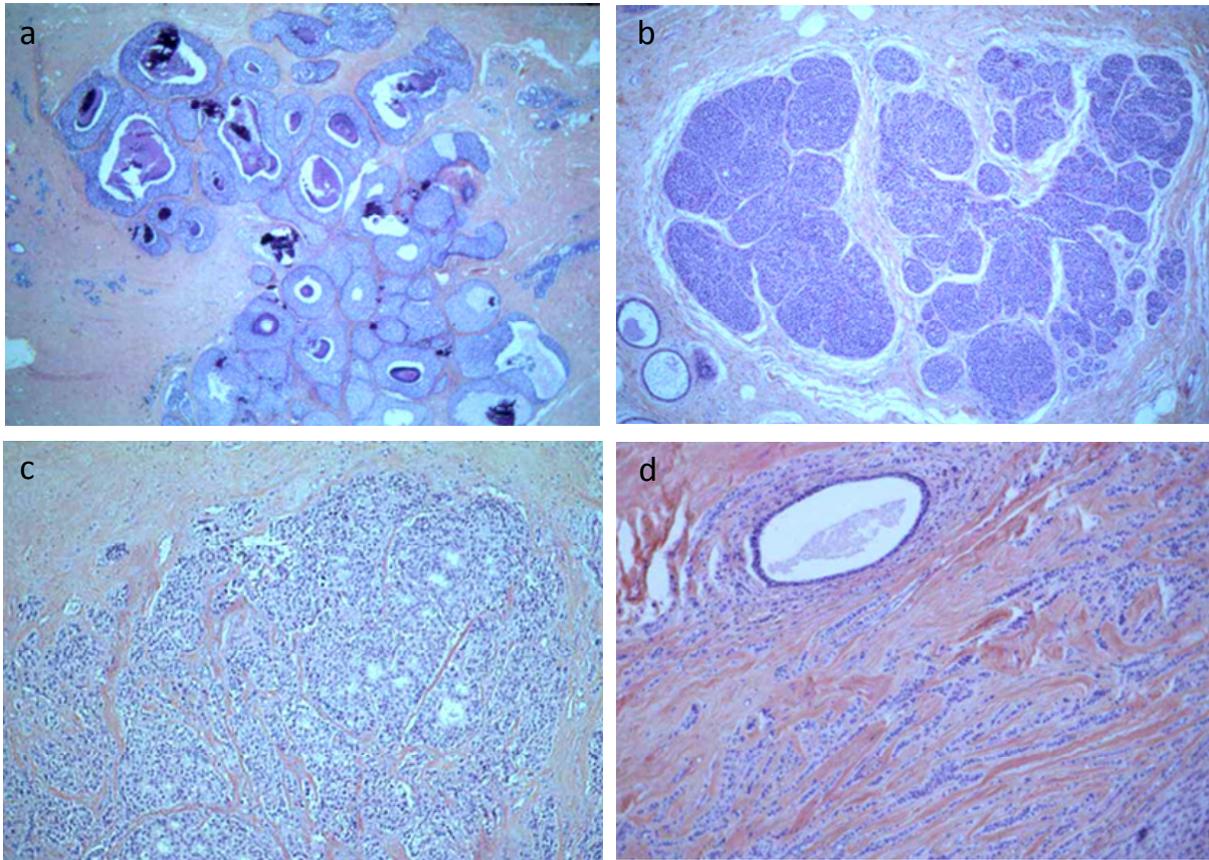


Figure 21. Représentation des principaux types de cancer du sein.

Les carcinomes in situ sont : (a) CCIS et (b) CLIS, les carcinomes invasifs : (c) CC invasif et (d) CL invasif où la membrane basale est dégradée et les cellules épithéliales cancéreuses ont envahi le stroma

(<http://www.med.univ-rennes1.fr/resped/s/gyneco/kcsein/cancersein.htm>).

- Les métastases des cellules cancéreuses de sein

Les cellules néoplasiques des cancers du sein invasifs envahissent le tissu mammaire environnant et peuvent disséminer à partir de la tumeur primaire, le plus souvent par le réseau lymphatique mais aussi les vaisseaux sanguins. C'est ainsi que les premiers relais ganglionnaires sont colonisés notamment les ganglions sentinelles ou axillaires puis les ganglions des chaînes mammaires internes et sus-claviculaires. Ainsi, si les ganglions sentinelles sont métastasés et laissés en place, ils 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 (voir le

Introduction

paragraphe suivant). L'envahissement des ganglions lymphatiques est le prémice du développement de métastases secondaires localisées dans le cas du cancer du sein au niveau des os, du foie, des poumons, de la plèvre, de la peau et du cerveau.

- La classification des cancers du sein

La classification des cancers du sein est en constante évolution, elle est passée d'une classification (TNM) tenant compte de la morphologie de la tumeur vers une description moléculaire associée à l'expression de marqueurs protéiques.

- La classification TNM

Le système de classification TNM de l'Union internationale contre le cancer (UICC) date de 1987 (fondée dès 1943 par Pierre Denoix) et est communément utilisé par les cliniciens afin de leur permettre de cerner les facteurs pronostiques du cancer et ses implications thérapeutiques. Le facteur pronostique le plus essentiel est l'extension tumorale à la fois loco-régionale (T0-T4), ganglionnaire (N0-N3) et métastatique (M0-M1). Ainsi, les chiffres associés à chaque critère augmentent en fonction de la gravité du cancer.

Pour un organe donné, un grand nombre de possibilités TNM existent c'est pourquoi sur la base de la 1^{ère} classification, une deuxième classification est créée définissant des stades de cancers du sein, elle est proche des stratégies thérapeutiques mais est moins universelle que la TNM. Lors de nos études, nous avons utilisé des tissus cancéreux mammaires classés suivant les stades, j'ai donc choisi de présenter cette classification en table 5.

	T0	T1	T2	T3	T4	M1
N0	0	I	II A	II B	III B	IV
N1	II A	II A	II B	III A	III B	IV
N2	III A	III A	III A	III A	III B	IV
N3	III B	IV				
M1	IV	IV	IV	IV	IV	

Introduction

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

Table 5. Classification des stades du cancer du sein.

La partie supérieure du tableau définit les stades 0, I, II, III et IV des cancers du sein en fonction de la classification TNM, la partie inférieure décrit chaque stade.

- La classification moléculaire

A cette caractérisation « classique » basée sur des données pronostiques des cancers du sein est venue s'ajouter une classification moléculaire, grâce à l'émergence des techniques d'analyse génomique à large échelle dont les puces à ADN (microarrays). Ces techniques ont d'abord été utilisées pour décrire les différences d'expression génique entre le tissu tumoral mammaire invasif et le tissu mammaire normal, puis, à partir des profils d'expression de plusieurs centaines de gènes, elles ont servi à classer, corrélérer et prédire l'évolution des cancers du sein (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Sotiriou et al., 2003). Les 5 sous-types observés et cités ci-dessous ont été montrés pour être des entités biologiques différentes les unes des autres (Hu et al., 2006; Sorlie et al., 2006), ils permettraient ainsi d'affiner la classification des cancers du sein et d'adopter des stratégies thérapeutiques spécifiques (Charafe-Jauffret et al., 2005; Mullan and Millikan, 2007). Cependant, le modèle d'apparition de ces cellules n'est à ce jour pas défini (Polyak, 2007).

- Luminal : il est le sous-type le plus représenté correspondant à des cancers généralement de bas grade et exprimant les récepteurs hormonaux et les cytokératines (CK) 8/18. Il est subdivisé en 2 groupes :

- A, de bon pronostic et de faible grade
- B, C de grade plus élevé et de pronostic moins favorable expliquant les différences de réponse aux traitements hormonaux.

- Basal-like : les tumeurs de ce sous-type n'expriment ni les récepteurs hormonaux ni Her2 (ErbB2) mais possèdent une forte expression des gènes de prolifération et des CK 5/6 et 17 et

Introduction

une mutation de p53 dans 82% des cas. Généralement c'est dans ce groupe que l'on retrouve la mutation de BRCA1. Ils sont de grade III et de mauvais pronostic.

- HER2 (ErbB2) : Ces cancers possèdent une forte expression de ErbB2, ne possèdent pas les récepteurs hormonaux et p53 est mutée dans 71% des cas. Ils sont de grade III.

- normal breast-like : ils expriment des gènes connus pour être exprimés par des cellules non épithéliales, ce dernier sous-type reste assez mal défini.

II. B. 2. c) Mécanismes de la tumorigenèse mammaire

La cancérogenèse mammaire est un phénomène multifactoriel où la succession d'altérations géniques confèrent aux cellules des avantages sélectifs menant à la progressive transformation des cellules normales en cellules tumorales. Six altérations essentielles dans la physiologie de la cellule citées par Hanahan et Weinberg permettent aux cellules transformées de prendre l'ascendant sur les autres cellules : indépendance vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire ou du cycle cellulaire, perte de la sensibilité vis-à-vis des signaux anti-prolifératifs, échappement à l'apoptose, potentiel répliatif illimité, conversion angiogénique, invasion et métastase (Hahn and Weinberg, 2002; Hanahan and Weinberg, 2000).

Dans le développement du cancer du sein, les altérations génétiques initiatrices provoquent une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs par mutations ou délétions et une activation d'oncogènes notamment par amplification génique (Thompson and Easton, 2004).

• Les anomalies génétiques

○ Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs agissent à différents niveaux de la vie de la cellule. Communément, on les subdivise en 3 groupes, les garants de la stabilité du génome (caretakers), les inhibiteurs de la croissance cellulaire au sens large (gate-keepers) et les modulateurs du microenvironnement cellulaire (landscapers). Selon le modèle de Knudson, il est nécessaire que les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur soient altérés pour que la fonction de régulation négative de la prolifération cellulaire soit perdue (Knudson, 1993). Dans la plupart des cas, ce modèle est confirmé par les observations expérimentales. Les

Introduction

tumeurs ne contiennent plus qu'un seul allèle muté, le second allèle ayant été perdu lors d'un remaniement génétique qui a conduit à la délétion d'une partie plus ou moins importante du chromosome (perte d'hétérozygotie).

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

- p53, considérée comme la gardienne du génome est mutée dans 25% des cancers du sein (IARC TP53 database, Octobre 2007) et ses mutations sont associées à un mauvais pronostic (Olivier et al., 2006). p53 est responsable de l'arrêt temporaire du cycle cellulaire permettant la réparation des lésions moléculaires ou l'induction de la mort cellulaire programmée des cellules endommagées. L'inhibition de p53 augmente le pool de cellules en prolifération et la probabilité de leur transformation maligne par déficience de l'induction de l'apoptose.

- rb, premier gène suppresseur de tumeur à avoir été étudié, son expression est aberrante dans pratiquement la moitié des cancers du sein à cause d'une perte d'hétérozygotie ou une perte totale de son expression (Bosco and Knudsen, 2007). La protéine Rb intervient dans le contrôle du cycle cellulaire via des mécanismes de phosphorylations et déphosphorylations par les complexes cycline-cdk permettant la libération du facteur de transcription E2F. En conséquence, la perte de fonction de pRb compromet les points clés (checkpoints) du cycle cellulaire, contribue à la prolifération anarchique et donc à l'agressivité des tumeurs mammaires (Bosco and Knudsen, 2007; Caldon et al., 2006).

- BRCA1 et BRCA2 (Breast Cancer susceptibility 1 et 2), ils sont des gènes suppresseurs de tumeur dont la mutation prédispose aux cancers du sein (mais aussi celui de l'ovaire, du pancréas et de la prostate), ils sont associés aux formes familiales et par conséquent utilisés dans la prévention du cancer du sein héréditaire (Futreal et al., 1994; Lancaster et al., 1996; Metcalfe et al., 2008). Les protéines BRCA sont impliquées dans la réparation de l'ADN, l'activation transcriptionnelle d'autres suppresseurs et le contrôle du cycle cellulaire grâce à leur interaction avec rad51 (enzyme de réparation de l'ADN), p53 et l'ARN polymérase II (Buck, 2008; Wiwanitkit, 2007; Yoshida and Miki, 2004).

Puisque les mutations des gènes dits de haute susceptibilité au cancer, y compris les gènes BRCA1, BRCA2, TP53, ne représentent que 25% des risques familiaux liés au cancer du sein, des études se sont penchées sur la détermination d'autres loci impliqués dans le cancer du sein. Ainsi, de récentes études ont-elles identifié des polymorphismes dans différents loci : fibroblast growth receptor 2 (FGFR2), trinucleotide repeat containing 9 (TNRC9), mitogen-activated protein kinase 3 K1 (MAP3K1), 8q24 lymphocyte-specific protein 1 (LSP1),

Introduction

caspase 8 et TGF β 1 associés à une augmentation du risque de cancer du sein (Antoniou et al., 2008; Cox et al., 2007; Easton et al., 2007; Stacey et al., 2007).

- Activation d'oncogènes

Dans le cancer du sein, des oncogènes sont majoritairement activés par amplification génique alors que les mutations ponctuelles, les insertions ou les réarrangements géniques sont moins observés (Bieche and Lidereau, 1997). Les oncogènes stimulent la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. Ils sont des facteurs de croissance (PDGF), des récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR, Met), des adaptateurs de voies de signalisation (Ras, Src), des acteurs de la survie cellulaire (Akt, bcl2), des régulateurs du cycle cellulaire (cyclines) ou des facteurs de transcription (c-myc). Dans le cancer du sein, les proto-oncogènes *c-erbB2*, *c-myc* et *ccdn1* sont les plus fréquemment mutés.

- *c-erbB2* (HER2), localisé en 17q21-22 est l'homologue humain du gène *neu* isolé de cellules de neuroblastomes de rat et est le 3^{ème} gène le plus fréquemment amplifié dans les tumeurs mammaires (Slamon et al., 1987). Il fait partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase de type I à laquelle appartient l'EGFR (récepteur de l'epithelial growth factor ou ErbB1). HER2 est surexprimé dans 25 à 30 % des cancers du sein, induit la tumorigenèse, est associé à des phénotypes invasifs, à un mauvais pronostic, à une résistance à l'hormonothérapie et à une diminution de l'efficacité des chimiothérapies (Moasser, 2007a). De plus, l'excellente corrélation entre l'amplification génique de ErbB2 et la surexpression de sa protéine a permis de mettre en place un traitement ciblé basé sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti Her2, le trastuzumab (ou herceptine) (Vogel et al., 2001). Prochainement, une nouvelle génération d'agents ciblant plus spécifiquement Her2 et notamment sa tyrosine kinase vont entrer en phase clinique (Moasser, 2007b).

Le locus 17q12-q21, dont fait partie *c-erbB2*, contient aussi le gène de la topoisomérase II alpha, et il s'avère qu'il est amplifié dans une grande majorité des tumeurs mammaires primaires HER2+. Ainsi, la topoisomérase 2 pourrait servir de marqueur du cancer du sein et de nouvelles approches thérapeutiques plus efficaces pourraient naître grâce à la combinaison d'inhibiteurs de HER2 et de la TOPA2 (Faratian and Bartlett, 2008; Jarvinen and Liu, 2006).

- *c-myc*, il est localisé en 8q24 et code un facteur de transcription impliqué dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Sa fréquence d'amplification est plus importante

Introduction

dans les tumeurs envahissant les ganglions axillaires et les tumeurs de grade histopronostique élevé (Blancato et al., 2004).

- *ccdn1* (11q13), il code la cycline D1 qui régule le passage G1/S et G2/M et son amplification est retrouvée dans 15 % des carcinomes mammaires (Arnold and Papanikolaou, 2005). Cependant, la cycline D1 est surexprimée au niveau transcriptionnel et protéique dans 50 % des cancers du sein en présence ou en absence d'amplification génique (Roy and Thompson, 2006). Comme *c-myc*, la surexpression de la cycline D1 seule n'a pas de pouvoir oncogénique suffisant et nécessite des événements additionnels.

○ Phénomènes épigénétiques

La cancérisation d'un épithélium normal est causée en premier lieu par une série de sélection clonale de changements génétiques de gènes suppresseurs de tumeur et d'oncogènes. Cependant, il est maintenant établi que des modifications épigénétiques sont importantes et caractérisées dans la carcinogenèse. Ces altérations incluent des modifications globales telles que l'hypométhylation de l'ADN et l'hypoacétylation de la chromatine, des hypométhylations et hyperméthylations spécifiques de gènes et la perte de l'empreinte (Feinberg and Tycko, 2004). Ces modifications épigénétiques conduisent à une instabilité chromosomique c'est-à-dire à une perte chromosomique et des réarrangements responsables de la progression tumorale notamment du cancer du sein (Szyf et al., 2004; Tlsty et al., 2004), elles touchent des gènes comme *p16*, la cycline D2, *BRCA1* ou *14-3-3*. De plus, les modifications épigénétiques semblent importantes dans la régulation de petits ARN non codants, les miRNA (microRNA) pouvant eux-mêmes contribuer au développement cancéreux (Lehmann et al., 2008; Yang et al., 2008). Enfin, ces études sur la contribution des altérations épigénétiques dans la progression tumorale amènent l'idée selon laquelle elles pourraient servir de marqueur moléculaire diagnostic, être intégrées dans la classification des tumeurs pour une meilleure réponse aux traitements et servir de nouvelles cibles thérapeutiques (Mulero-Navarro and Esteller, 2008). Dans le cancer du sein, la corrélation entre 4 altérations épigénétiques trouvées dans les tumeurs primaires et dans le plasma suggère que celles-ci pourraient être utilisées comme marqueur tumoral (Hoque et al., 2006).

Introduction

- Concept des cellules souches cancéreuses

Depuis quelques années, un concept en cancérologie original définit une nouvelle classe de cellules ayant des propriétés de renouvellement illimité et un potentiel tumorigène présent *a priori* dans toutes les tumeurs, il s'agit des cellules souches cancéreuses.

- Evolution clonale et cellules souches cancéreuses

Ce nouveau concept s'oppose en quelque sorte au fameux concept de l'origine clonale des tumeurs où la tumeur serait la conséquence de l'accumulation de mutations géniques spécifiques à partir d'une cellule (et augmentant avec la différenciation de ses cellules filles leur conférant un avantage sélectif). Ainsi, même si il est clair que les altérations géniques conduisent la cancérisation, des observations sont difficiles à concilier avec la notion de cellules différenciées comme seule cible de mutations génétiques. En particulier, il est rare que les cellules différenciées de l'épithélium prolifèrent et, de plus les tumeurs sont très hétérogènes, composées de cellules ayant des degrés de différenciation et de transformation très différents. Or, il est difficilement compréhensible comment une cellule cible bien différenciée mutée et cancéreuse produit des cellules tumorales bien moins différenciées qu'elle. Enfin, si l'on considère qu'une cellule possède toutes les mutations requises au développement d'une tumeur, pourquoi faut-il injecter un très grand nombre de ces cellules tumorigènes pour développer une tumeur en modèle animal (Polyak and Hahn, 2006).

Ainsi, la différence majeure entre les deux théories est la nature de la cellule mutée au départ, dans un cas n'importe quelle cellule normale peut accumuler des mutations dans l'autre, ce sont des progéniteurs ou des cellules souches qui subissent des mutations et seront tumorigènes (Figure 22).

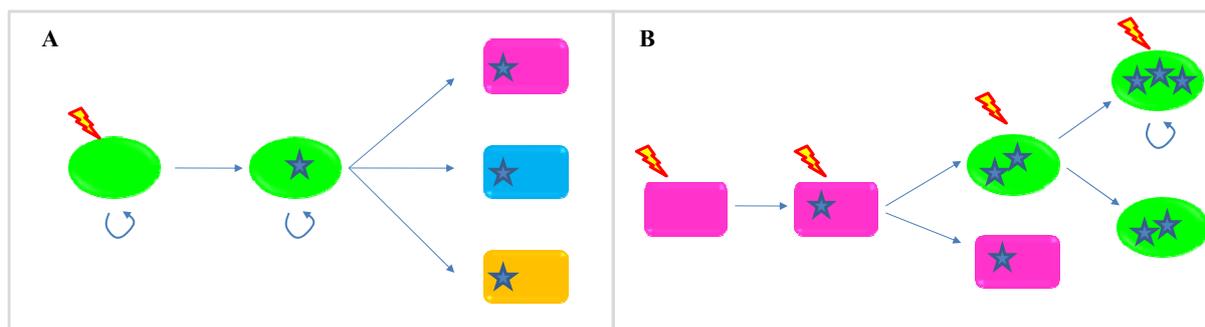


Figure 22. Représentation schématique des concepts de l'initiation et de la progression du cancer.

A. Le concept des cellules souches cancéreuses, une cellule souche subit une ou plusieurs mutations et produit des cellules filles différenciées mutées et pouvant acquérir de nouvelles mutations. B. Le concept de l'évolution clonale, une cellule différenciée est altérée génétiquement et ses cellules filles qui accumulent d'autres mutations se dédifférencient et acquièrent un potentiel de renouvellement illimité. En vert, cellules indifférenciées à renouvellement illimité (représenté par les flèches courbes), les cellules différenciées sont représentées sous forme rectangulaire et les mutations par les étoiles.

- Les cellules souches cancéreuses de sein

Comme décrit précédemment, le cancer du sein est une pathologie très hétérogène. Ainsi, contrairement à d'autres cancers épithéliaux comme le cancer du côlon ou du pancréas qui présentent un schéma de mutations successives linéaires (Fearon and Vogelstein, 1990), les événements impliqués dans la progression du cancer du sein semblent plus complexes.

La découverte de cellules cancéreuses souches de sein a fait suite à celle des cellules souches dont la prolifération est lente et donnant naissance à des cellules très prolifératives (transit-amplifying cells) et enfin à diverses cellules différenciées et spécialisées. Les cellules souches cancéreuses ont gardé le potentiel de renouvellement qui est illimité et la capacité à produire des cellules différenciées (Smalley and Ashworth, 2003). Dans le cancer du sein, des cellules ayant des capacités de cellules souches ont été identifiées comme hautement tumorigènes, elles sont CD44⁺ et CD24^{- or low} (Al-Hajj et al., 2003; Dontu et al., 2003; Ponti et al., 2005).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe II. B. 2 b, les tumeurs mammaires sont désormais classées notamment selon le type de cellules tumorales majoritaires c'est-à-dire luminal ou basal-like. Sur la base de cette classification et de l'hypothèse des cellules souches, un nouveau modèle de cancer du sein fait jour, il est présenté en figure 23 (Shipitsin and Polyak, 2008; Stingl and Caldas, 2007).

Introduction

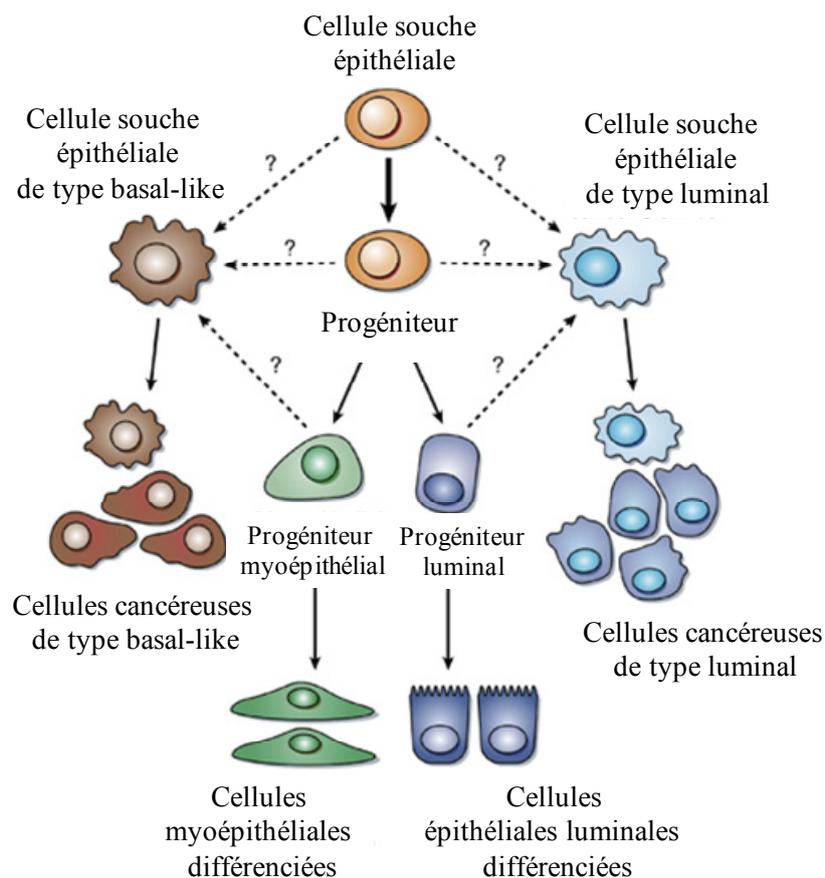


Figure 23. Représentation schématique du modèle des cellules souches de cancer du sein.

Au centre est représentée la voie de différenciation hypothétique des cellules épithéliales mammaires où une cellule souche « bipotentielle » donne naissance à des progéniteurs « bipotentiels » pouvant produire à leur tour des progéniteurs myoépithélial ou luminal se différenciant en cellules myoépithéliales et épithéliales luminales. Lors de la différenciation, la capacité de renouvellement propre des cellules décroît. Les cellules cancéreuses mammaires peuvent potentiellement dériver des cellules souches, ou des cellules plus différenciées, hypothèses représentées par les flèches en pointillé. Les cellules souches cancéreuses ont un potentiel de différenciation limités et produisent des cellules de type luminal ou basal-like (Shipitsin and Polyak, 2008).

- Les neurotrophines dans ce concept

La cellule cancéreuse est souvent perçue comme une cellule dédifférenciée et retournant vers un état proche des cellules multipotentes et non différenciées du développement embryonnaire. Grâce à ce concept de cellules souches cancéreuses mammaires, le lien entre développement embryonnaire et développement cancéreux converge. Le rôle majeur et indiscutable joué par les neurotrophines lors du développement embryonnaire du système nerveux rend leur implication dans la cancérogenèse mammaire une hypothèse à explorer.

Introduction

- Les facteurs régulateurs

Le développement de la glande mammaire et sa cancérisation sont finalement des événements extrêmement contrôlés notamment par les facteurs systémiques et locaux. Parmi eux, les facteurs de croissance jouent un rôle essentiel en favorisant la croissance de la tumeur primaire (prolifération et résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses, angiogénèse) et la formation de métastases (migration et invasion des cellules cancéreuses, angiogénèse). La tumeur mammaire est une organisation complexe faite d'une pléiotropie de populations cellulaires, les cellules épithéliales cancéreuses (ou non) baignant dans un stroma composé de cellules myoépithéliales, fibroblastiques, immunitaires et endothéliales (Polyak, 2007). Le dialogue entre ces différentes populations est effectué en particulier par les facteurs de croissance sécrétés par tous ces types cellulaires. La figure 24 synthétise les contrôles paracrines et autocrines impliqués dans la croissance tumorale mammaire.

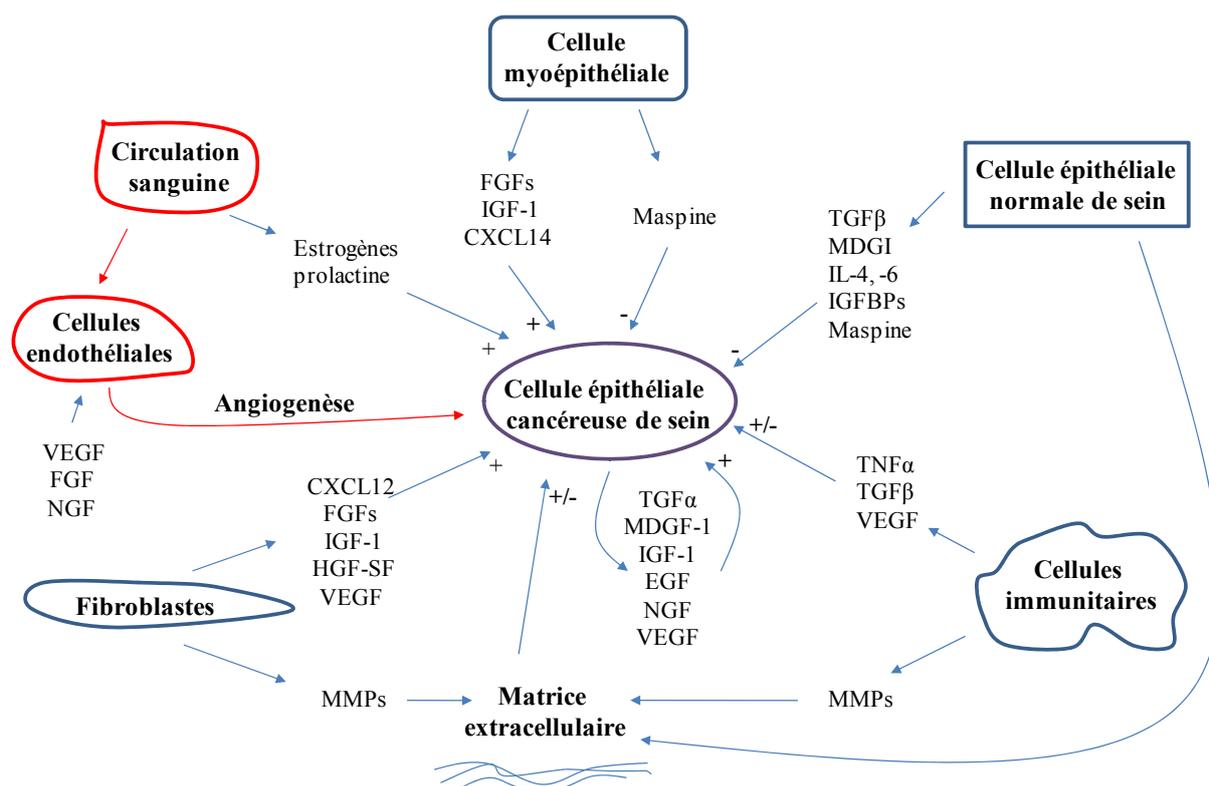


Figure 24. Régulation de la croissance de la cellule mammaire cancéreuse.

Les effets stimulateurs sont représentés par un « + », les effets inhibiteurs par un « - ». FGF : Fibroblast Growth Factor; IGF : Insulin-like Growth Factor; IGF-BPs : IGF Binding Protein; TGF α : Transforming Growth Factor α ; TGF β : Transforming Growth Factor β ; MDGI : Mammary-Derived Growth Factor Inhibitor; HGF-SF : Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor; EGF : Epithelial Growth Factor; NGF : Nerve Growth Factor; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor; TNF α : Tumor Necrosis Factor α ; IL-4, -6 : Interleukine-4, -6; CXCL12 et 14 : chemokine CXC motif ligand 12 et 14; MMPs : Métalloprotéases.

Introduction

La régulation des signaux de la croissance tumorale est dépendante de la progression cancéreuse elle-même puisqu'un même facteur présente parfois une dualité dans ses fonctions. C'est le cas du TGF β , un facteur inhibiteur de la prolifération des cellules tumorales de stades cancéreux précoces, il agit sur l'agressivité des cellules cancéreuses de stade plus tardif en stimulant l'invasion et la formation de métastases (Chang et al., 2007). Le facteur de croissance VEGF est quant à lui impliqué dans la formation de métastases de plusieurs manières puisqu'il induit à la fois la résistance à l'apoptose et la migration des cellules cancéreuses elles mêmes par autocrinie et active l'angiogenèse tumorale. Par ailleurs, il régule dans les cellules cancéreuses l'expression du récepteur de SDF-1, le CXCR4, stimulant indirectement mais encore un peu plus leur migration (Bachelder et al., 2002; Dewan et al., 2006; Mercurio et al., 2005). Les cellules cancéreuses produisent leurs propres facteurs et stimulent leur prolifération, leur survie, leur migration. C'est le cas du NGF, il est exprimé et sécrété par les cellules cancéreuses épithéliales mammaires et induit leur survie et leur prolifération (Descamps et al., 2001b; Dolle et al., 2003) (Figure 24). Enfin, les cellules du microenvironnement produisent d'autres facteurs de croissance comme les FGF, les IGF ou l'HGF qui stimulent de façon paracrine la croissance et la migration des cellules cancéreuses.

Hormis la production de facteurs de croissance, le microenvironnement lui-même est désormais associé à la progression du cancer. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les cellules qui composent le microenvironnement (cellules myoépithéliales, fibroblastes, cellules immunitaires, endothéliales...) et les molécules de la matrice extracellulaire sont importantes dans le développement de la glande mammaire normale et modulent la croissance, la survie, la polarité et l'invasivité des cellules cancéreuses (Bissell and Radisky, 2001; Elenbaas et al., 2001; Imagawa et al., 2002; Orimo and Weinberg, 2006). Les cellules myoépithéliales associées au carcinome canalaire *in situ* mammaire ont par exemple été montrées comme phénotypiquement anormales, en effet, elles ont perdu leurs marqueurs de différenciation et régulent positivement des facteurs impliqués dans l'angiogenèse et l'invasion. Elles produisent en particulier des chimiokines (comme la CXCL14) qui se fixent sur les cellules épithéliales tumorales afin d'augmenter leur prolifération et leur migration et sécrètent des métalloprotéases (MMP) qui dégradent la matrice extracellulaire et permettent l'invasion des cellules tumorales (Allinen et al., 2004). Les cellules tumorales de sein induisent également une activation des fibroblastes en myofibroblastes, à l'aide du TGF β , qu'elles libèrent dans le microenvironnement. En effet, les

Introduction

tumeurs invasives présentent un nombre plus élevé de myofibroblastes et moins de fibroblastes que les tumeurs *in situ*. En retour, les myofibroblastes sécrètent des chimiokines telles que le stromal cell-derived factor 1 (SDF-1 ou CXCL12) favorisant le développement cancéreux par la stimulation de la prolifération des cellules tumorales qui expriment son récepteur CXCR4 et le recrutement de progéniteurs endothéliaux favorisant la néoangiogenèse (Orimo et al., 2005; Orimo and Weinberg, 2007). Enfin, les macrophages ont été montrés pour leur implication dans l'angiogenèse, l'invasion et la propagation de métastases (Lewis and Hughes, 2007; Lin and Pollard, 2007; Pollard, 2008) et leur élimination a permis de réduire la croissance tumorale montrant ainsi la possibilité du ciblage du microenvironnement tumoral comme stratégie thérapeutique (Luo et al., 2006). Ainsi, les cellules stromales subissent des changements comme des altérations épigénétiques transformant le microenvironnement et stimulant la progression tumorale (Hu et al., 2005).

III. OBJECTIFS DE LA THESE

III. A. Contexte de la thèse

Les études des effets du NGF sur les cellules de cancer du sein ont commencé en 1998 par la démonstration de son effet mitogène pour les cellules de cancer du sein, alors que de manière surprenante, il est sans effet sur les cellules mammaires normales (Descamps et al., 1998). Afin de connaître les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène, l'étude a été poursuivie, et étendue à l'effet anti-apoptotique du NGF. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou d'anticorps bloquants spécifiques des voies de signalisation ou des récepteurs membranaires a permis de montrer que l'activité mitogène du NGF passait par l'activation de TrkA et des MAPkinases (Erk) tandis que l'activité anti-apoptotique passait par p75^{NTR} et l'induction de la voie NF-kB (Descamps et al., 2001b). De plus, la recherche des partenaires de liaison du récepteur p75^{NTR} impliqués dans l'effet anti-apoptotique du NGF a permis de mettre en évidence que TRADD était, après recrutement par p75^{NTR}, responsable de l'induction de la voie NF-kB (El Yazidi-Belkoura et al., 2003). De manière intéressante, les cellules normales de sein bien que possédant les deux types de récepteur, semblent incapables de répondre au NGF. Par ailleurs, il a été montré que les récepteurs du NGF, TrkA et p75^{NTR}, sont présents dans les tumeurs du sein (Aragona et al., 2001; Descamps et al., 2001a). De plus, une activation de TrkA, plus importante dans les effusions pleurales que dans les tumeurs primaires, suggère une implication de ce récepteur dans la progression tumorale (Davidson et al., 2004). D'autres travaux ont montré que le NGF coopère avec p185 (erb-B2) pour activer la croissance des cellules de cancer du sein et que le tamoxifen, drogue anti-oestrogénique couramment utilisée en thérapie du cancer du sein, inhibe l'effet mitogène du NGF (Chiarenza et al., 2001; Tagliabue et al., 2000). Si le NGF est produit dans le système nerveux, la question était de comprendre comment peut-il agir sur les cellules mammaires cancéreuses. En fait, le NGF est synthétisé et sécrété par les cellules de cancer du sein contrairement aux cellules normales, et les cellules cancéreuses utilisent le NGF produit pour proliférer suggérant une boucle d'action autocrine de ce facteur (Dolle et al., 2003).

De tels résultats ont fait naître la question de l'implication des autres neurotrophines dans le cancer du sein.

III. B. Les objectifs de la thèse

Les effets biologiques des neurotrophines relève d'un équilibre entre proportion des ligands disponibles, composition des récepteurs et voies de signalisation exprimées, celui-ci dépendant du type cellulaire. Aussi, l'objectif principal de ma thèse a été de déterminer, ce que j'ai appelé au paragraphe I. D. 1. b, « le contexte cellulaire » des cellules de cancer du sein.

Pour ce faire j'ai :

- réalisé une approche descriptive

J'ai étudié l'expression des neurotrophines et de leur récepteurs dans les cellules cancéreuses et normales de sein et dans des biopsies tumorales de sein, par PCR en temps réel, western-blot et immunocyto-histochimie.

- réalisé une approche fonctionnelle

Les effets biologiques des neurotrophines exprimées ont été mesurés dans des activités de prolifération, survie et migration par supplémentation et inhibition en culture de cellules. L'effet de leur inhibition sur le développement tumoral en modèle animal a également été étudié.

- appréhendé la signalisation des neurotrophines par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de leurs récepteurs.

Ma thèse a contribué à élargir les connaissances sur l'effet des neurotrophines dans le cancer du sein, et plus particulièrement à :

- mieux comprendre l'effet du NGF. Les résultats de ce travail sont présentés dans la publication intitulée : **Nerve Growth Factor is a Potential Therapeutic Target in Breast Cancer.**

- identifier l'expression et le rôle biologique de 2 autres neurotrophines et de leurs récepteurs. Les résultats de ce travail sont présentés dans la publication intitulée : **Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-4/5 contribute to Breast Cancer Cell Survival Through p75^{NTR}**, et dans la partie « travaux supplémentaires ».

Introduction

Chapitre 2 : Résultats

Résultats

Article 1: Nerve Growth Factor is a Potential Therapeutic Target in Breast Cancer

Nous mettons en lumière dans ce premier article publié dans le journal Cancer Research l'intérêt potentiel de cibler le Nerve Growth Factor dans le cancer du sein. Nous montrons que les cellules épithéliales cancéreuses mammaires d'un large spectre de tumeurs du sein expriment le NGF et que son inhibition décroît de façon spectaculaire la croissance tumorale en modèle animal.

Suite à ce premier article, des travaux supplémentaires ont été effectués et ont eu pour objectif de réaliser une **Inhibition stable du Nerve Growth Factor par une stratégie de shRNA.**

Nerve Growth Factor Is a Potential Therapeutic Target in Breast Cancer

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

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

Abstract

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

Introduction

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

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

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

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

Materials and Methods

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

Real-time reverse transcription-PCR. After pulverizing breast tumors in nitrogen liquid, total RNA was isolated with tri reagent (Euromedex) and treated with DNase (Invitrogen). Reverse transcription was performed with 1 µg of RNA, 0.5 µg of random hexamers, and 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) for 10 min at 25°C, 50 min at 37°C, and 15 min at 70°C in a final volume of 20 µL. Real-time PCR amplifications were performed using a Quantitect SYBRGreen PCR kit (Qiagen) with 2 µL of 1:10 cDNA and 500 nmol/L of primers. The primers used were as follows: 5'-CAACAGGACTCACAGGAGCA-3' and 5'-ACCTCTCCAACACCATCAC-3' for *NGF* transcript, and 5'-GTGATGTG-CAGCTGATCAAGACT-3' and 5'-GATGACCAGCCAAAGGAGA-3' for *RPLP0* (human acidic ribosomal phosphoprotein P0), which was used as a reference gene. The subsequent PCR conditions were 40 cycles and were carried out in the following manner: 95°C for 15 s, 60°C for 20 s, and 72°C for 30 s. Data were analyzed using the MX4000 PCR system software (Stratagene).

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

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

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

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

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

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

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

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

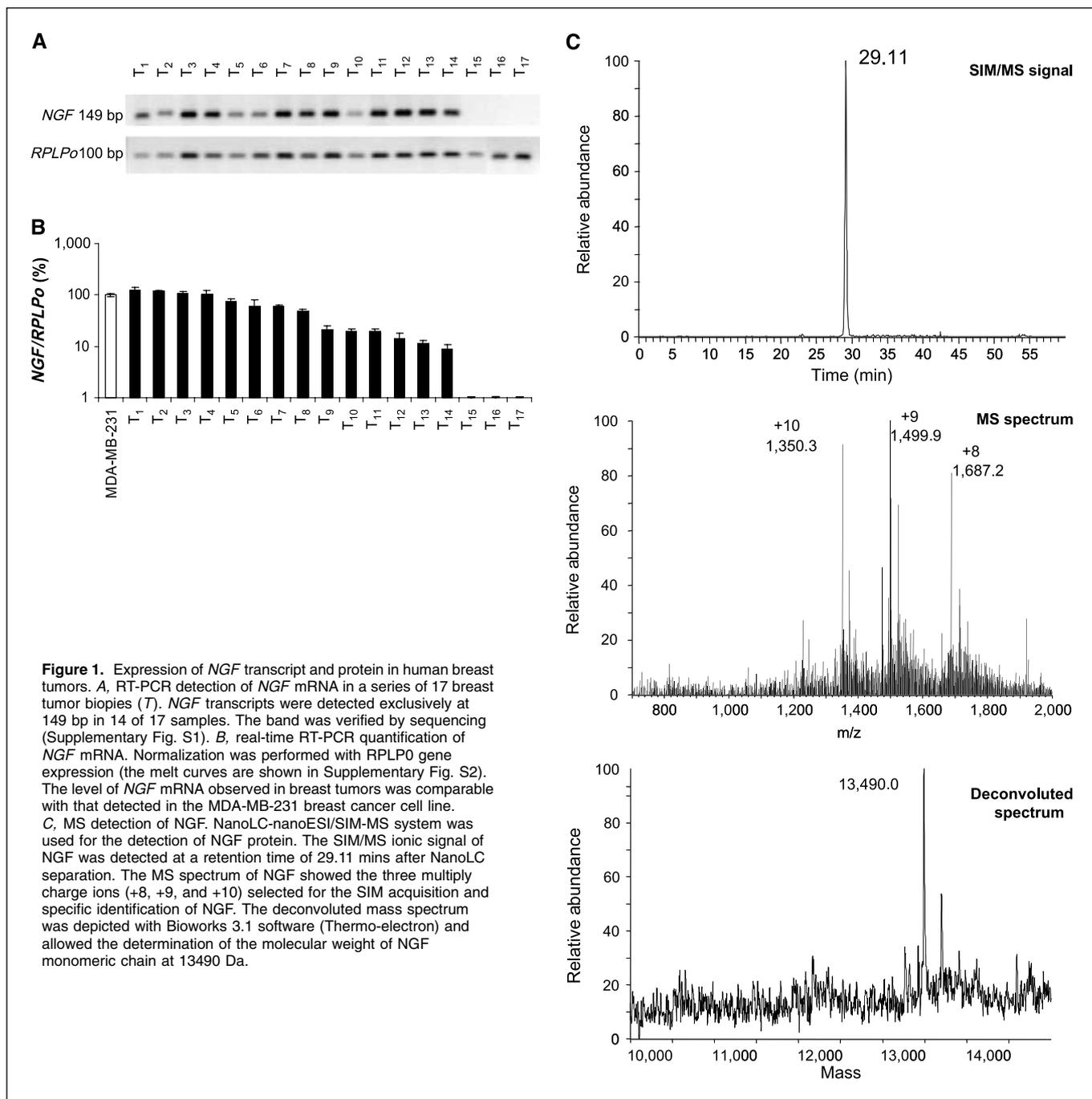


Figure 1. Expression of NGF transcript and protein in human breast tumors. **A**, RT-PCR detection of NGF mRNA in a series of 17 breast tumor biopsies (T). NGF transcripts were detected exclusively at 149 bp in 14 of 17 samples. The band was verified by sequencing (Supplementary Fig. S1). **B**, real-time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

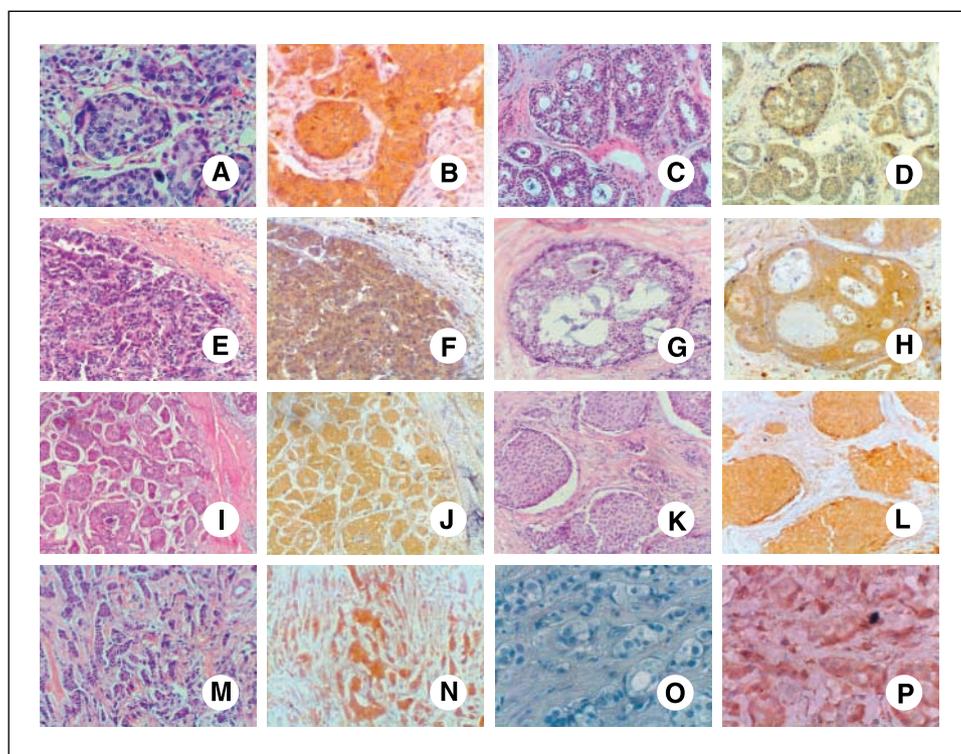


Figure 2. Immunodetection of NGF in human breast cancer tumors. Immunohistochemistry with NGF antibody (Ab) was performed on breast cancer biopsies (a, c, e, g, i, k, and m), and hemalum staining was performed on adjacent sections (b, d, f, h, j, l, and n). Strong anti-NGF immunoreactivity was observed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

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

Effect of anti-NGF treatment on tumor xenograft in immunodeficient mice. MDA-MB-231 human breast cancer cells were obtained from the American Type Culture Collection and routinely grown as previously described (5). Six-week-old female severe combined immunodeficient (SCID) mice were purchased from Charles River Laboratories and acclimatized for at least 2 weeks. Mice were maintained under a 12 h light/dark cycle at a temperature of 20°C to 22°C. Food and water were available *ad libitum*. Mice were maintained in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee procedures and guidelines. MDA-MB-231 cells were harvested and resuspended in PBS before s.c. injection into flanks (3×10^6 cells per flank) of 8-week-old SCID mice. Ten days after cell injection, anti-NGF treatments were applied every 3 days. Anti-NGF (12.5 µg; Mab 256 from R&D Systems), or 3 µg anti-NGF siRNA in 100 µL PBS, or 20 nmol/L K-252a were injected as close as possible to the tumor. The injections were repeated every 3 days. The tumor volume was determined every 3 days by measuring the length (*l*) and width (*w*) and then calculating the volume as $\pi/6 \times l \times w \times (l+w)/2$. Twelve animals were used in each group and experiments were replicated over three independent trials. Statistical significance between control and transfected cell animal groups was evaluated using Student's *t* test. Hepatic metastasis rates were macroscopically counted for each animal. For determination of index labeling, anti-Ki-67/MIB-1 (Immunotech) was used for the determination of proliferating cells, and cell apoptosis was measured using terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL). The microvascular density was measured after immunocytochemistry using anti-CD31 (Novus Biological).

Results

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

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

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

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

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

Discussion

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

Table 1. NGF overexpression versus various clinicopathologic factors

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

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

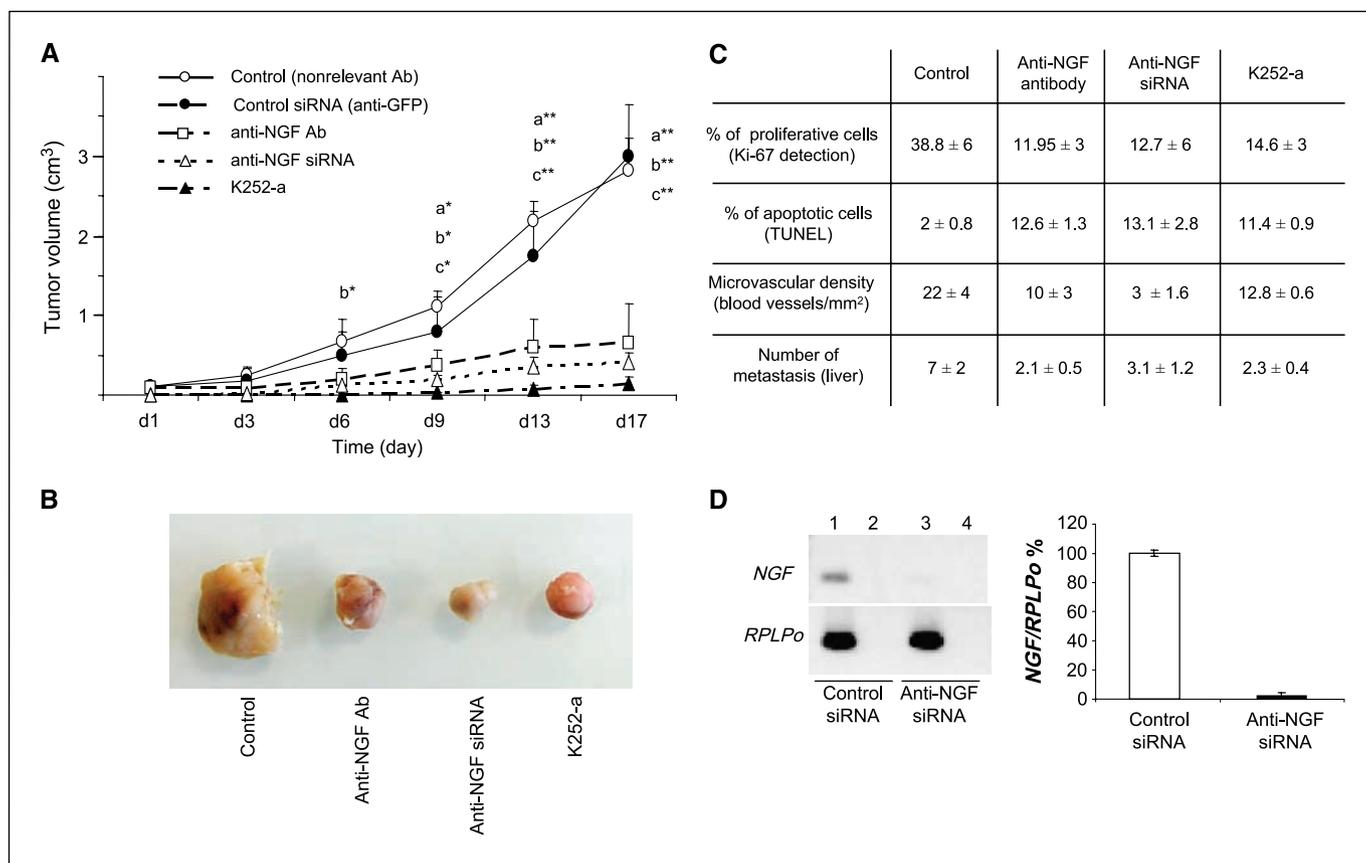


Figure 3. Antitumoral effect of NGF inhibition in animal model. **A**, SCID mice were injected with MDA-MB-231 breast cancer cells. When mean tumor volumes reached about 200 mm³ in size, mice were injected with 12.5 µg anti-NGF antibodies, 3 µg siRNA against NGF, or 20 mmol/L K252a. Nonrelevant antibody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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

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

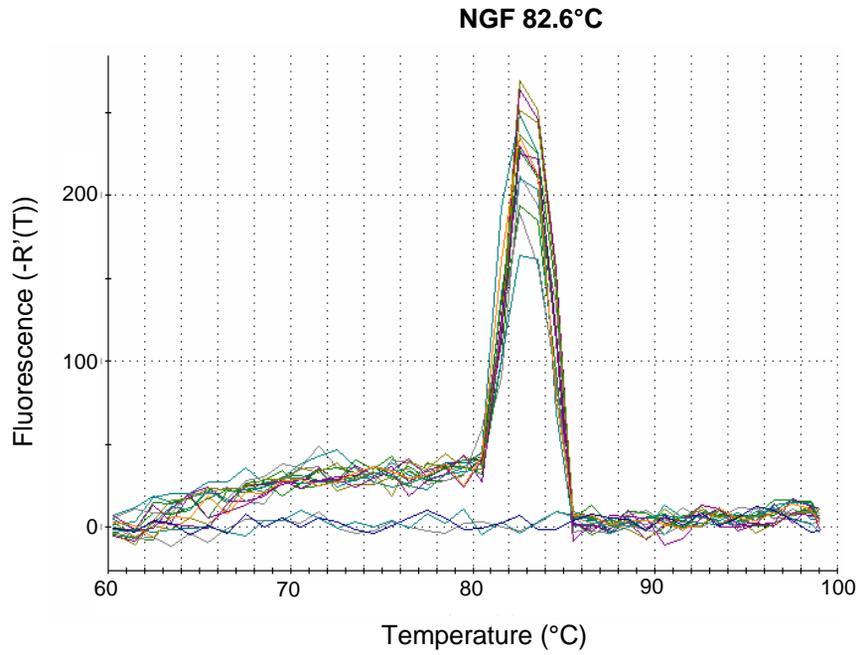
The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

References

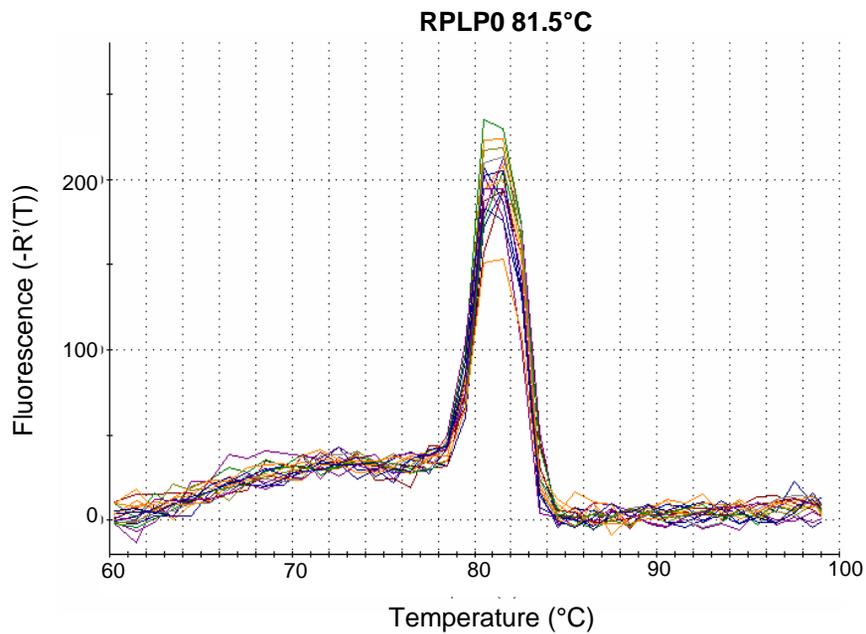
- Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med* 2005;353:1652-4.
- Tagliabue E, Castiglioni F, Ghirelli C, et al. Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000;275:5388-94.
- Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, Cantarella G, Bianchi A, Bernardini R. Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* 2001;61:3002-8.
- Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V, Hondermarck H. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22:5592-601.
- Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, et al. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 2001;276:17864-70.
- Descamps S, Pawlowski V, Revillion F, et al. Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:4337-40.
- Aragona M, Panetta S, Silipigni AM, et al. Nerve growth factor receptor immunoreactivity in breast cancer patients. *Cancer Invest* 2001;19:692-7.
- Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Ann Florenes V, Nielsen S, Nesland JM. Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004;83:119-28.
- Adriaenssens E, Dumont L, Lottin S, et al. H19 overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumor values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression. *Am J Pathol* 1998;153:1597-607.
- Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Brit J Cancer* 1957;11:359-77.
- Campos X, Munoz Y, Selman A, et al. Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;104:168-75.
- Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, et al. TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 2004;6:347-60.
- Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Gulino A, Mackay AR. TrkAIII. A novel hypoxia-regulated alternative TrkA splice variant of potential physiological and pathological importance. *Cell Cycle* 2005;4:8-9.
- Marchetti D, McQuillan DJ, Spohn WC, Carson DD, Nicolson GL. Neurotrophin stimulation of human melanoma cell invasion: selected enhancement of heparanase activity and heparanase degradation of specific heparan sulphate subpopulations. *Cancer Res* 1996;56:2856-63.
- McGregor LM, McCune BK, Graff JR, et al. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4540-5.
- Zhu ZW, Friess H, Wang L, et al. Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001;7:105-12.
- Krygiel S, Djakiew D. Neurotrophin receptor p75(NTR) suppresses growth and nerve growth factor-mediated metastasis of human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2002;98:1-7.
- Miknyoczki SJ, Wan W, Chang H, et al. The neurotrophin-trk receptor axes are critical for the growth and progression of human prostatic carcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 2002;8:1924-31.
- Shonukan O, Bagayogo I, McCrea P, Chao M, Hempstead B. Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin. *Oncogene* 2003;22:3616-23.
- Cantarella G, Lempereur L, Presta M, et al. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *FASEB J* 2002;16:1307-9.
- Davidson B, Reich R, Lazarovici P, et al. Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:2248-59.

Supplemental Fig. 2. Melt curves obtained for NGF (A) and RPLP0 (B) in breast tumor samples. These curves correspond to the real time PCR data presented in Fig. 1B.

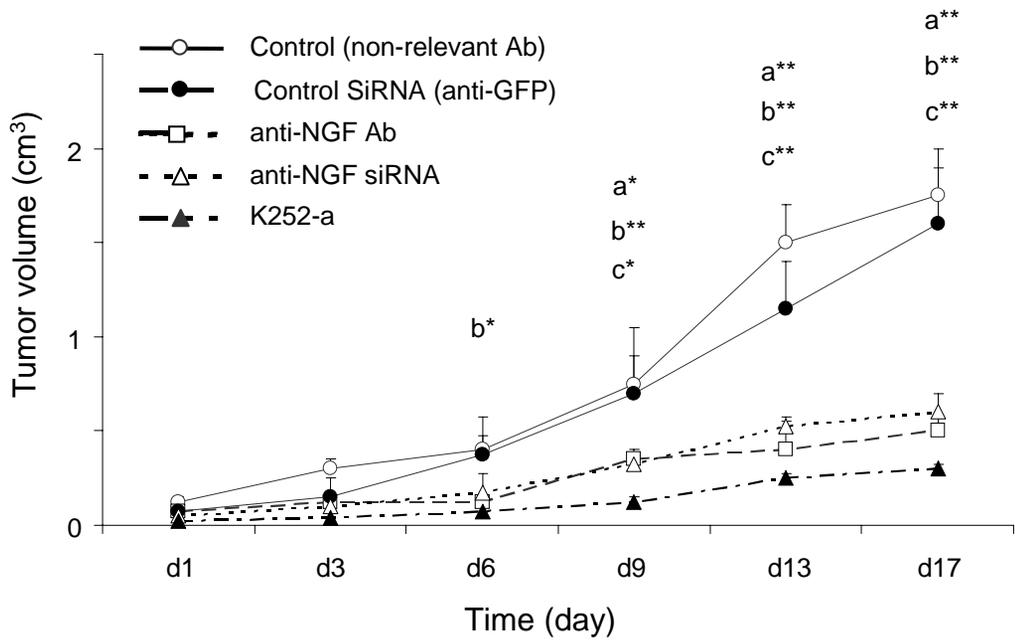
A



B



Supplemental Fig. 3. Time-course of T47D xenograft tumor growth in SCID mice. The experiments were realized as described for MDA-MB-231 cells (Fig. 3A). Statistical test (Student's *t* test) was performed between control group and anti-NGF antibody group (a), between control group and K252-a group (b) and between anti-GFP siRNA group and anti-NGF siRNA group (c). * indicates $p < 0.05$ and ** indicates $p < 0.01$.



Résultats

Travaux supplémentaires : Inhibition stable du Nerve Growth Factor par une stratégie de shRNA.

Les résultats obtenus par l'inhibition du Nerve Growth Factor décrit dans l'article 1 nous ont amené à imaginer la possibilité d'éteindre complètement et durablement la synthèse du NGF afin d'étudier ses effets phénotypiques sur les cellules de cancer du sein. Nous avons donc eu l'idée de construire un vecteur permettant la synthèse constante de siRNA (small interfering RNA) dirigés de façon séquence spécifique contre l'ARN messager du NGF induisant l'invalidation (silencing) post-transcriptionnelle du gène.

MATERIEL ET METHODE

- **Choix de la séquence siRNA anti-NGF**

Durant mon DEA, j'ai testé différentes séquences dérivées de la séquence nucléotidique du NGF. Parmi les quatre séquences, l'une s'est révélée particulièrement capable d'inhiber l'expression du NGF dans les cellules MDA-MB-231.

Les séquences suivantes ont été choisies :

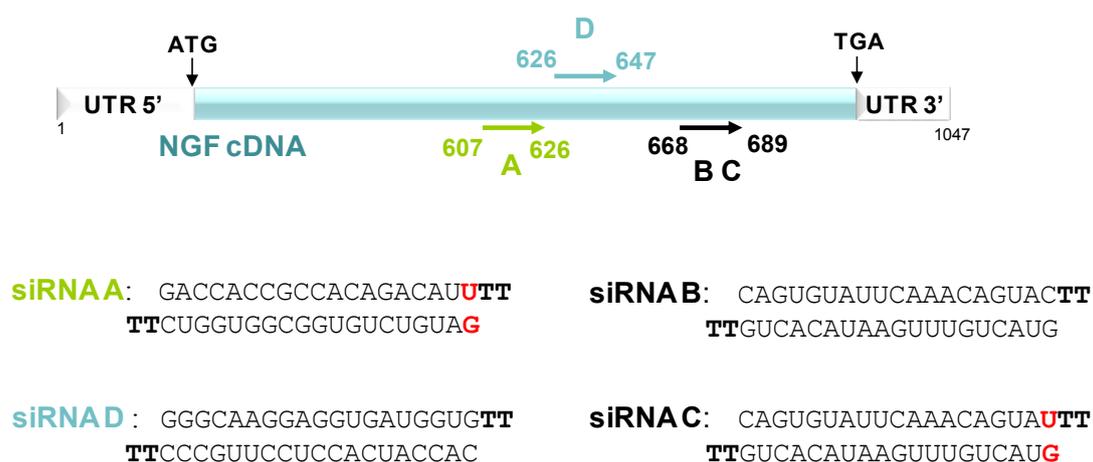


Figure 25. Séquences des siRNA anti- NGF

En gras, désoxynucléotides. En rouge, mésappariement visant à privilégier la prise en charge du brin antisens siRNA par le complexe RISC.

Résultats

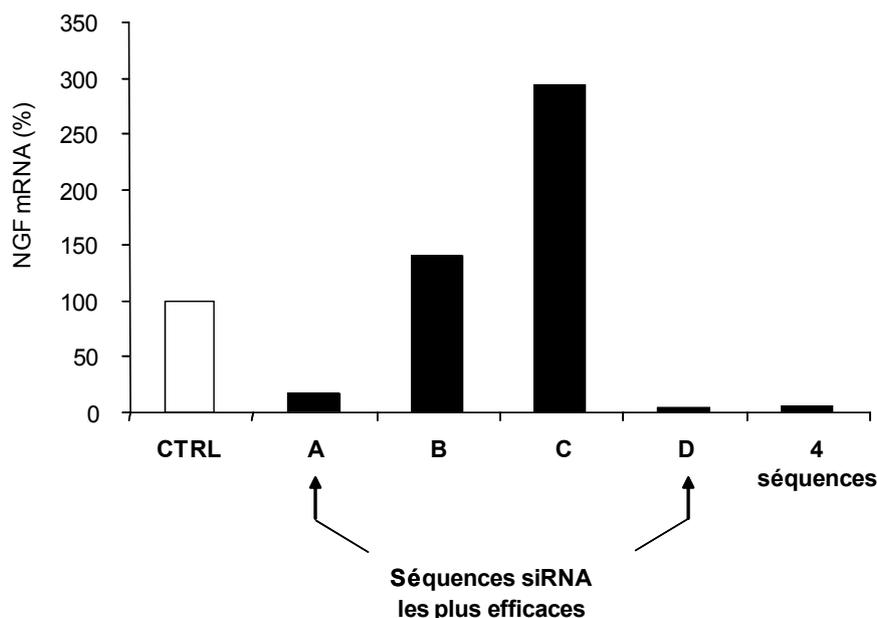


Figure 26. Comparaison de l'efficacité de dégradation des 4 séquences siRNA anti-NGF.

Quantification relative du NGF. Ensemencement de 200 000 cellules en plaque 6 puits (2 puits/condition), transfection de chaque séquence individuellement : A, B, C, D ou ensemble : 4 séquences ou transfectant seul : contrôle. Extraction des ARN 48h après transfection.

Il ressort de cette étude que les séquences A et D sont les plus performantes et ont été choisies en conséquence pour l'inhibition du NGF en modèle animal (article 1). En ce qui concerne la construction du vecteur RNAi stable, nous avons choisi la séquence la plus efficace soit la séquence D.

- **Choix du vecteur et mécanisme d'ARN interférence**

Le vecteur choisi est le pGSU6-GFP, commercialisé par *Gene therapy systems* sous le nom GeneSilencer shRNA Vector Kits (Figure 27). Ce vecteur comporte un promoteur U6 en amont d'un site de clonage (*Bam*H I, *Not* I), un gène de résistance à une sélection eucaryote (Néo^R : résistance à la généticine), et un marqueur de transfection, la GFP (Green Fluorescent Protein). Ce vecteur permet donc d'obtenir des clones stables exprimant en continu des petits siRNA anti-NGF, et doit permettre d'inhiber continuellement la synthèse de NGF dans nos cellules.

Résultats

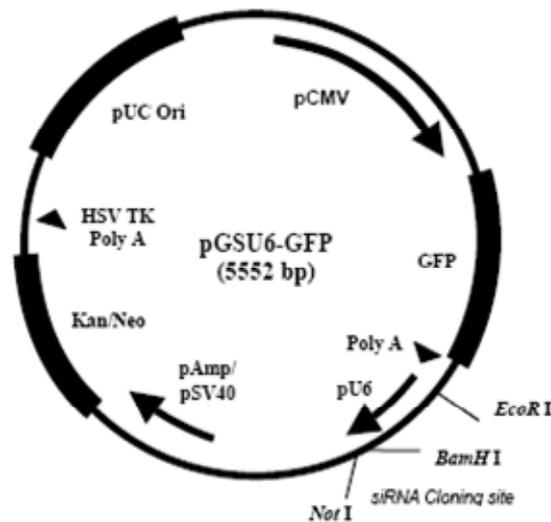


Figure 27. Carte du vecteur pGSU6-GFP.

Ce vecteur vendu ouvert avec les extrémités *BamH I* et *Not I* protusives, a été reliqué et circularisé. Les oligonucléotides correspondant à la séquence siRNA antiNGF D insérés comportent les séquences protusives compatibles avec ces enzymes. Nous avons choisi d'introduire un site *EcoR I* dans la "hairpin" afin de cribler facilement les plasmides recombinés par digestion enzymatique (Figure 28).

Une fois transfecté, le plasmide pourra s'intégrer au génome des cellules de cancer du sein, la transcription de la séquence d'intérêt permettra la formation d'une structure du siRNA D en épingle à cheveux (short hairpin RNA : shRNA) comme sur la figure 28 (Paddison et al., 2002). Les shRNA NGF seront alors pris en charge par Dicer, une enzyme connu pour cliver les ARN double brins en siRNA (Bernstein et al., 2001; Elbashir et al., 2001). Les duplex de siRNA sont ensuite incorporés à un complexe multiprotéique appelé RISC (RNA-induced silencing complex) composé notamment dans les cellules de mammifères de la protéine Argonaute 2 (Ago2). Au sein du RISC, Ago2 clive le brin sens dit « passager » (passenger strand) et libère le brin guide antisens du duplex de siRNA (Matranga et al., 2005). Les siRNA (simple brin) couplés au complexe RISC activé passent alors au crible tous les ARNm de la cellule et clivent grâce à Ago2 les ARNm ayant une séquence complémentaire (Hutvagner and Simard, 2008). L'ARNm cible (NGF) est coupé au centre en un site unique déclenchant l'invalidation génique du gène d'intérêt grâce à la dégradation de l'ARNm (Zamore and Haley, 2005).

Résultats

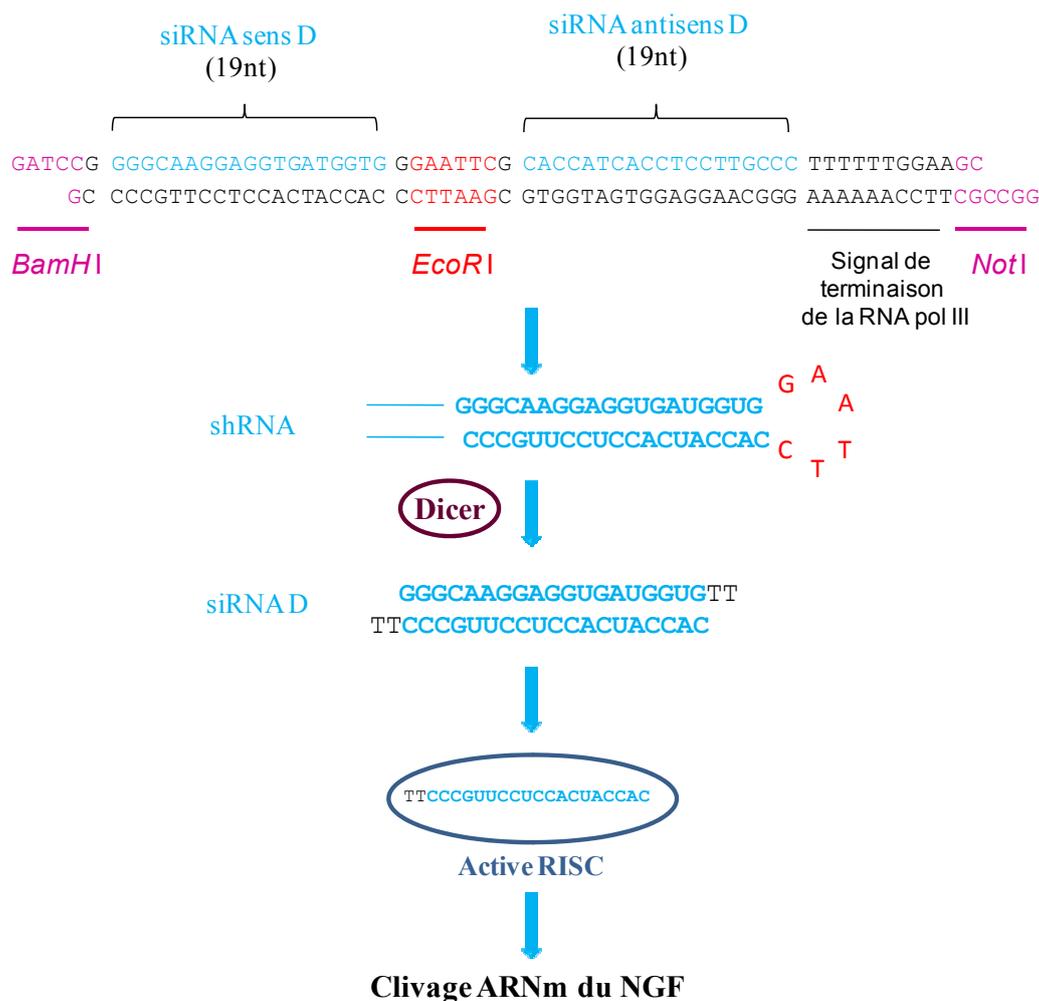


Figure 28. Mécanisme d'inhibition du NGF par le plasmide pGSU6-GFP-shRNA NGF.

La séquence siRNA D est introduite dans le site de clonage grâce à des séquences protusives BamHI et NotI, la séquence EcoRI est insérée au niveau de la boucle du shRNA afin de cribler les plasmides possédant l'insert lors du clonage. La transcription du plasmide permet la formation des shRNA NGF dont la structure caractéristique est en épingle à cheveux. Les shRNA sont pris en charge dans les cellules de cancer du sein par Dicer qui produit les siRNA, ici les siRNA D. Les siRNA sont incorporés à un complexe protéique RISC (RNA-induced silencing complex) qui, activé, permet le clivage de l'ARNm cible et sa dégradation, ici du NGF.

- **Clonage des siRNA dans le plasmide pGSU6-GFP**

Les oligonucléotides hybridés décrits dans la figure 28 ont été insérés par ligation dans le vecteur pGSU6-GFP linéarisé. Les bactéries compétentes transformées avec le produit de ligation (pGSU6-GFP-shRNA NGF) ont alors été mises en culture et une dizaine de colonies ont été testées par digestion enzymatique afin de vérifier la fonctionnalité du clonage.

Les plasmides extraits des colonies bactériennes transformées ont dans un premier temps été digérés par l'enzyme de restriction EcoRI. La taille des fragments nucléotidiques attendue en cas de clonage réussi est de 359 pb puisque le plasmide comporte un site EcoRI situé à la

Résultats

base 1864 et le site *EcoR* I ajouté à la boucle de l'insert est situé à la base 2223 (2223-1864=359pb). La figure 29 A présente la digestion de 5 plasmides issus de 5 colonies bactériennes, notons que seul la colonie 2 ne présente pas d'insert.

Afin de confirmer la présence de l'insert, une digestion enzymatique *BamH* I et *Not* I a été réalisée sur les plasmides de la colonie 1, ces enzymes encadrant l'insert. Le fragment attendu a une taille d'environ 70 pb comme sur la figure 29 B, ce plasmide validé et séquencé a donc été utilisé pour la suite des expérimentations.

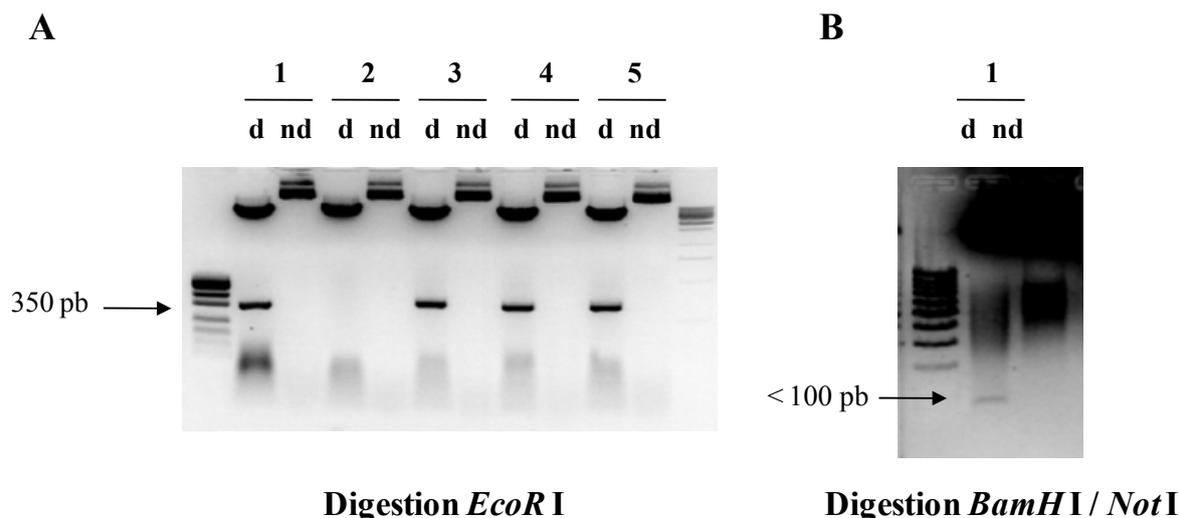


Figure 29. Validation du clonage du vecteur pGSU6-GFP par digestions enzymatiques.

A, Digestion des clones 1 à 5 par *EcoRI*. B, digestion du clone 1 par *BamHI/NotI* (d, plasmide digéré ; nd, pour plasmide non digéré)

• Choix des cellules de cancer du sein et sélection clonale

Nous avons choisi de transférer stablement les cellules de cancer de sein MDA-MB-231 pour différentes raisons. D'abord, elles sont les cellules de cancer du sein qui expriment le plus fortement le NGF. Par ailleurs, le laboratoire possédait déjà des cellules MDA-MB-231 surexprimant chacun des récepteurs du NGF TrkA et p75^{NTR} et il semblait judicieux de pouvoir comparer chacun des phénotypes obtenus soit par la surexpression des récepteurs, soit par l'inhibition du NGF. Enfin, les MDA-MB-231 sont hautement tumorigènes et sont donc un excellent outil en vue d'études en modèle animal.

Les MDA-MB-231 (1.10^6) ont été transfectées par nucléofection (Amaxa, tampon T, programme A-023) avec la construction plasmidique pGSU6-GFP-shRNAD validée (2 μ g) ou le vecteur vide (2 μ g), le taux de transfection vérifié grâce au marqueur GFP puis les cellules ont été soumises à une sélection antibiotique, la geneticin (G418, 1mg/ml).

Résultats

Nous avons alors sélectionné à l'aide de papier whatmann imbibé de trypsine puis remis en culture séparément en plaque 6 puits:

- 84 clones shRNA NGF
- 60 clones témoins regroupés par la suite en 5 « pool » de 12 nommés A, B, C, D, E.

Ils ont été remis en culture et amplifiés en vue de l'analyse de chacun d'entre eux.

RESULTATS

- Analyse de l'expression du NGF dans les 84 clones sélectionnés

Afin de discriminer les cellules de cancer du sein dépourvu de NGF, nous avons déterminé l'expression du NGF dans chacun des clones. La quantification de l'expression transcriptionnelle du NGF a été réalisée par PCR en temps réel car les résultats obtenus par PCR semi quantitative n'étaient pas concluant. Les données obtenues sont présentées dans un premier temps avec les courbes d'amplification de l'expression du NGF et du gène de référence RPLP0 du clone 43 comparé à un pool contrôle (figure 30). Puis sous forme de tableau récapitulant les différences de Ct (ΔCt : NGF-RPLP0) pour chaque clone.

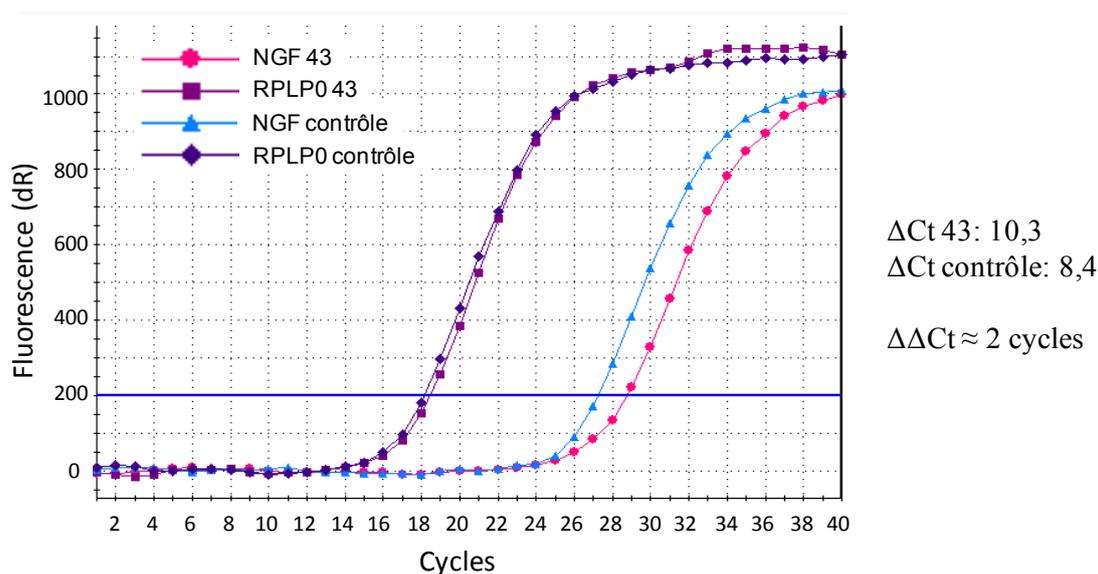


Figure 30. Discrimination des clones sous exprimant le NGF par PCR en temps réel.

Suite à l'extraction des ARN totaux des clones, 1 μ g sont rétrotranscrits en ADNc grâce l'enzyme MMLV (Invitrogen). L'expression du gène d'intérêt, le NGF et du gène de référence, RPLP0 sont amplifiés par PCR en temps réel (stratagène, MX4000). L'analyse est effectuée par la méthode du ΔCt , c'est-à-dire la différence entre l'expression du NGF et de RPLP0 pour un clone donné. Le $\Delta \Delta Ct$ correspond à la différence d'amplification entre les 2 conditions soit ici ΔCt 43- ΔCt contrôle= 2 cycles correspondant à une diminution de l'expression du NGF de 4 fois.

Résultats

L'analyse des autres clones est répertoriée dans le tableau suivant où sont présentés les ΔCt d'expression du NGF pour chaque clone shRNA anti-NGF.

N° clone	ΔCt NGF-RPLP ₀	N° clone	ΔCt NGF-RPLP ₀	N° clone	ΔCt NGF-RPLP ₀						
1		16	7,69	31	7,14	46	9,05	61	9,02	76	
2	8,31	17	10,25	32	7,92	47	8,06	62	7,7	77	0
3	8,82	18	7,82	33		48		63	9,32	78	9,48
4	8,28	19	6,75	34	7,5	49	9,24	64	0	79	9,45
5	7,43	20	8,31	35	7,8	50	6,8	65	8,92	80	9,36
6	8,75	21	9,96	36	9,38	51	9,99	66	6,67	81	7,35
7	7,96	22	7,71	37	8,65	52	9,04	67	8,06	82	9,06
8	7,64	23	9,36	38	8,45	53	9,25	68	8,95	83	9,78
9	8,32	24	8,14	39	8,16	54	8,99	69	7,78	84	7,69
10	8,33	25	8,7	40	9,68	55	10,7	70	7,83		
11	9,72	26	8,73	41	9,55	56	9,08	71	7,28	ctrl	8,4
12	7,45	27	10,29	42	7,18	57	9,6	72	8,11		
13	6,91	28	7,96	43	10,31	58	10,38	73	7,75		
14		29	8,05	44	8,34	59	8,79	74	7,4		
15	9,29	30	8,43	45	8,02	60	9,09	75	7,7		

Table 6. Expression du NGF dans les clones shRNA.

Sont reportés dans ce tableau les ΔCt d'expression du NGF pour chaque clone shRNA. Sachant que dans les contrôles (pool et MDA native), le ΔCt est de 8,4, seuls les clones dont le ΔCt est supérieur à 8,4 d'au moins 1 cycle soit une inhibition de 50% ont été retenus (en gras). Les clones n'ayant pas de valeur ont présenté un problème lors de la remise en culture du clone ou lors de la préparation des ARN ou des cDNA et non pu être étudiés.

Une deuxième analyse en PCR en temps réel des 14 premiers clones intéressant a finalement réduit leur nombre à 10 (en gras dans le tableau suivant).

Résultats

N° clone	ΔCt NGF-RPLPo	N° clone	ΔCt NGF-RPLPo	N° clone	ΔCt NGF-RPLPo
11	9,34	41	9,61	58	10,58
17	9,79	43	10,6	78	10,67
21	10,47	51	9,82	79	9,32
27	9,83	55	0	83	10,3
40	10,11	57	10,2	Contrôle	8,7

Table 7. Expression du NGF dans les 14 clones shRNA intéressants.

Sont reportés dans ce tableau les ΔCt d'expression du NGF des 14 clones shRNA préalablement sélectionnés et soumis à une deuxième analyse par PCR en temps réel. Sachant que dans les contrôles (pool et MDA native), le ΔCt est de 8,7, seuls les clones dont le ΔCt est supérieur à 8,7 d'au moins 1 cycle soit une inhibition de 50% ont été finalement retenus (en gras). Le clone 55 n'a finalement pas repris en culture.

○ Analyse des 10 clones intéressants

De façon étonnante la différence d'expression de NGF des 10 clones potentiellement intéressants comparativement au témoin ($\Delta\Delta Ct$) est en moyenne de 1-1,5 cycles et n'excède pas 2 cycles alors que la séquence siRNA D transfectée transitoirement décalait l'expression du NGF de plus de 4 cycles. Lors de l'entretien des 10 clones, il est apparu qu'une dérive cellulaire avait lieu (malgré le maintien de la pression de sélection, G418 0,5mg/ml) pouvant expliquer l'efficacité réduite des shRNA anti-NGF.

Le plasmide pGSU6-GFP possède, comme son nom l'indique, le marqueur GFP sous le contrôle d'un promoteur fort pCMV qui permet la discrimination des cellules ayant reçu le plasmide. Or, comme le montre les photos de la figure 31, les clones ne sont pas purs et nous avons sélectionné un mélange de cellules résistantes à la néomycine. Dans le cas du clone 43, une analyse en cytomètre de flux a évalué le nombre de cellules GFP + à moins de 10%. Les 90% de cellules GFP négatives ont certainement intégré le plasmide en le coupant au niveau de la séquence GFP ou de son promoteur pCMV.

Résultats

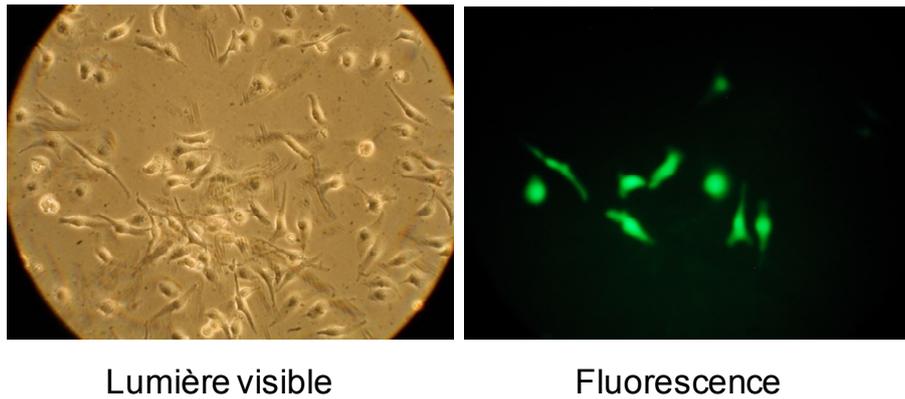


Figure 31. Mise en évidence d'un mélange de population cellulaire au sein d'un clone shRNA anti-NGF.
Les cellules MDA-MB-231 du clone 43 ont été prises en photos en lumière visible, et en fluorescence mettant en évidence une sous représentation des cellules GFP+ et donc un mélange de populations cellulaires résistantes à la néomycine.

○ Tri des cellules

Afin de palier ce problème et d'optimiser la production de shRNA NGF, nous avons décidé de trier les cellules sur la base de leur fluorescence. Avec l'aide de Nathalie Jouy (Institut de Recherches contre le Cancer de Lille), les cellules GFP + de 2 clones shRNA NGF (27 et 57) et un témoin (pool C) dont le taux de cellules fluorescentes était le plus élevé ont été triées (trieur de cellules, coulter-Beckman) (Figure 32).

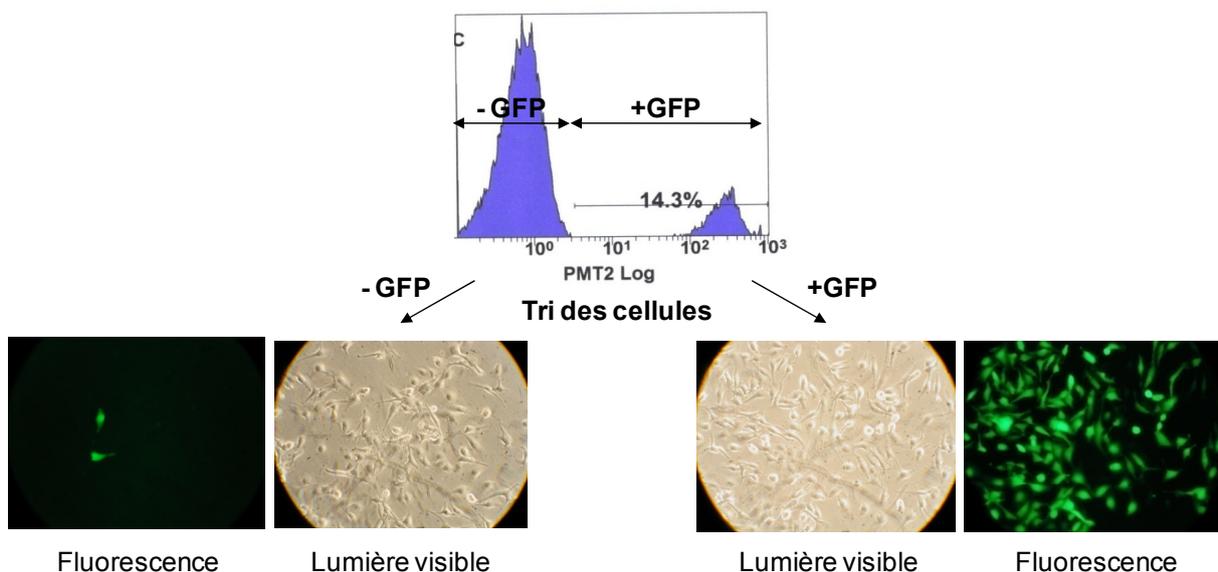


Figure 32. Tri des cellules MDA-MB-231 shRNA NGF GFP+.

Les cellules GFP+ (14,3 % de la population totale) ont été séparées des cellules GFP- grâce au trieur de cellules Coulter-Beckman. Ici est représenté le tri cellulaire du clone 27.

Résultats

○ Analyse des clones 27 et 57 triés

Comme précédemment, les ARN des clones 27, 57 et pool C triés (ou non) ont été extraits et soumis à l'analyse de l'expression du NGF par PCR en temps réel, les résultats en ΔCt sont indiqués dans le tableau suivant.

N° clone	ΔCt NGF-RPLPo	N° clone	ΔCt NGF-RPLPo	N° clone	ΔCt NGF-RPLPo
27 avant tri	8,88	57 avant tri	9	Pool C avant tri	8,7
27 - GFP	9,72	57- GFP	9,67	Pool C - GFP	8,65
27 + GFP	8,64	57 + GFP	7,63	Pool C + GFP	8,46

Table 8. Expression du NGF dans les clones shRNA triés.

Malgré le tri cellulaire et la séparation des cellules GFP positives des cellules GFP négatives, l'amplification du NGF par PCR en temps réel ne montre pas de variation notable comparativement aux résultats obtenus avant le tri cellulaire. Alors qu'on aurait pu s'attendre à accroître le ΔCt NGF et donc améliorer l'inhibition du NGF dans nos cellules GFP +, il s'avère que ce sont les cellules GFP négatives (en gras dans le tableau) des clones 27 et 57 qui conservent cette différence. Cependant, il n'en ressort aucune amélioration puisque nous n'obtenons pas plus d'un cycle de différence entre l'expression du NGF des clones shRNA et du témoin.

CONCLUSION / DISCUSSION

L'inhibition du NGF n'a pas été suffisante pour espérer établir un modèle cellulaire de cancer du sein KO NGF irréprochable et utilisable pour une étude phénotypique puisque nous n'avons pas obtenu de diminution de l'expression du NGF en ARN messagers de plus de 60% (soit moins de 2 cycles en PCR).

Les raisons de cet échec peuvent être les suivantes :

○ Mélange clonal

Le plasmide pGSU6-GFP est doté de la séquence de la GFP sous le contrôle du promoteur fort pCMV qui permet de distinguer facilement les cellules ayant reçu le vecteur d'après leur fluorescence verte. Or l'entretien des clones cellulaires sélectionnés a révélé un mélange de populations cellulaires puisque seule un faible pourcentage des cellules au sein d'un clone

Résultats

étaient fluorescentes. Nous avons sélectionnés un mélange de cellules résistantes à la néomycine, certainement massivement vertes au moment de la sélection, et des sous populations de cellules non vertes prenant le dessus au fil de l'entretien cellulaire. Il est très probable qu'au vue de la taille du promoteur pCMV et de la séquence de la GFP dans le plasmide pGSU6-GFP-shRNA, celui-ci ait été inséré dans le génome des MDA-MB-231 suite à une coupure dans l'une ou l'autre de ces séquences, expliquant l'absence de fluorescence verte. Nous avons donc entrepris de séparer les populations GFP+ et GFP- au sein d'un même clone afin d'enrichir la population clonale GFP+. Alors même que nous pensions augmenter les chances d'inhiber le NGF dans les populations vertes ayant forcément reçues le plasmide, l'inhibition du NGF était certes maintenue mais non enrichie dans les populations non vertes. Ces cellules n'expriment pas la GFP car ont intégré le plasmide au niveau des séquences du pCMV ou de la GFP, par contre elles possèdent à la fois la séquence shRNA anti-NGF et la résistance à la néomycine responsable de leur sélection, ceci expliquant le maintien de l'inhibition du NGF observée pour les clones triés (27 et 57). Les cellules GFP+ ont, quant à elles, pu être intégrées dans le génome des MDA-MB-231 par coupure dans le promoteur U6 et le site de clonage. Quoiqu'il en soit, suite au tri cellulaire des clones 27 et 57, nous n'avons pas sélectionné de cellules invalidant totalement le NGF. Il aurait peut être fallu effectuer une dilution limite afin d'écarter au sein d'une population toutes les cellules n'inhibant pas le NGF et exclure totalement le mélange clonal.

○ Difficulté à établir des lignées shRNA stables

La stratégie que nous avons mis en place dès 2004 pour invalider le NGF s'est basée sur la découverte des shRNA et la mise sur le marché de plasmides utilisables facilement en laboratoire (Paddison et al., 2002; Paddison et al., 2004). Les shRNA permettent de pallier les inconvénients des siRNA synthétisés chimiquement (efficacité de transfection modérée et durée de vie courte) et d'établir des modèles cellulaires KO pour un gène. Cependant, de nombreux rapports évoquent aujourd'hui la difficulté d'établir des lignées shRNA stables, l'efficacité des shRNA en terme d'invalidation génique étant très faible en comparaison du temps passé et du coût.

Le vecteur plasmidique ou les séquences ARN interférentes utilisés dans notre étude ne semblent pas optimaux pour permettre une répression massive de l'expression du facteur de croissance NGF. Malgré le tri cellulaire, nous n'avons pas observé d'enrichissement en cellules inhibant le NGF suggérant l'efficacité réduite de notre technique.

Résultats

- shRNA non actif

Alors que les séquences des siRNA D provoquaient une répression transcriptionnelle du NGF de plus de 95%, les séquences sous forme shRNA ne semblent pas optimales car ne produisant pas suffisamment de siRNA dans les cellules et en conséquence ne permettant pas de saturer les séquences cibles. Il faudrait alors envisager l'utilisation d'une, voire de plusieurs nouvelles séquences shRNA dirigées contre le NGF. En effet, la mise en place de notre stratégie a débuté en 2004 avec l'utilisation de siRNA sélectionnés empiriquement sur les bases des travaux sur les siRNA naturels de l'équipe de Tuschl (Elbashir et al., 2002). Aujourd'hui, les algorithmes permettant la conception de ces séquences ont considérablement évolué tant au niveau de la taille, de la structure et des modifications chimiques à leur apporter (De Paula et al., 2007). Il est donc possible d'envisager la conception de nouvelles séquences shRNA grâce à ces algorithmes (Pei and Tuschl, 2006; Shah et al., 2007; Tafer et al., 2008).

- Le vecteur

Le vecteur que nous avons utilisé est le plasmide pGSU6-GFP, il contient en amont du site de clonage le promoteur U6 de l'ARN polymérase III. Il est décrit que l'activité des promoteurs (U6, H1, 5S, 7SK, tRNA) de l'ARN polymérase III, enzyme nécessaire à la transcription des petits ARN non codants, peut varier d'un type cellulaire à un autre. Cette observation suggère l'utilisation de vecteurs ayant des promoteurs différents lors de l'optimisation de l'expression des shRNA d'intérêts dans le modèle cellulaire (De Paula et al., 2007). Le promoteur U6 a été utilisé avec succès pour l'invalidation génique par shRNA dans les MDA-MB-231 (Yoo et al., 2008). Cependant dans cette étude, les auteurs utilisent un mode de transfert des séquences shRNA différent du plasmide, il s'agit d'un adenovirus. Une solution consisterait à changer de système vectoriel, l'utilisation de virus et notamment de lentivirus est connue pour être efficace avec des shRNA (Snove and Rossi, 2006). Malgré l'efficacité démontrée de notre vecteur, il est en effet reporté dans la littérature pour son efficacité à inhiber des séquences cibles à la fois en transfection transitoire et stable dans divers modèles cellulaires (Nusinzon and Horvath, 2006; Sang et al., 2005), d'autres plus récents sont aujourd'hui disponibles. Ces nouveaux vecteurs permettent l'expression des shRNA grâce à des systèmes inductibles (systèmes tetracycline ou ecdysone) (Kappel et al., 2007; Rangasamy et al., 2008), permettent l'introduction de plusieurs séquences shRNA dans le même plasmide (Nagao et al., 2008) ou encore d'utiliser des shRNA dont la structure est basée sur une autre classe de petits ARN non codants, celle des miRNA (microRNA) naturels. Les miRNA se différencient des siRNA par

Résultats

une hybridation des nucléotides (miARN-ARNm cible) imparfaite et inhibent les gènes par divers moyens : la dégradation de l'ARNm cible, l'inhibition de sa traduction ou encore sa séquestration dans des « processing bodies » (P Bodies) situés dans le cytoplasme où la machinerie traductionnelle n'a pas accès (Eulalio et al., 2008). En effet, des miRNA artificiels ont été utilisés et semblent être très efficaces pour permettre la répression de l'expression des gènes (Chang et al., 2006). Nous pourrions donc envisager d'améliorer à la fois la conception des séquences shRNA et leur intégration dans les cellules de cancer du sein.

Malgré l'échec de cette construction de modèle cellulaire, ce travail fait partie intégrante de ma thèse puisqu'il a pris naissance lors de mon DEA (master) et s'est étalé sur une très grande partie de ma thèse en parallèle de l'étude de l'implication des autres neurotrophines que le NGF dans le cancer du sein. C'est pourquoi, nous avons choisi de faire figurer la stratégie et l'élaboration de la construction du plasmide et du modèle en lui-même dans le présent manuscrit.

Je terminerai ce chapitre, sur une note d'ironie, par une citation d'une publicité pour des lignées cellulaires invalidées stablement et prêtes à l'emploi (silenciX cell lines, Tebu-Bio) reçue fin 2007 alors que je réalisais l'échec de mon étude... "Silencing a cell line in a lab usually takes several months or years with unpredictable results or planning time, sometimes a low extinction rate is obtained and this cell line is not a good tool for analysis." Par contre, ils n'ont pas encore construit de lignée cellulaire KO NGF...

Résultats

Article 2 : Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-4/5 are involved in Breast Cancer.

Dans cet article (soumis à The Journal of Clinical Investigation), nous montrons que les neurotrophines BDNF et NT-4/5 contribuent à la progression du cancer du sein en conférant aux cellules cancéreuses une résistance à l'apoptose. Nous avons démontré que le BDNF et la NT-4/5 sont exprimés par les cellules cancéreuses de sein et leur expression est exclusivement identifiée dans les cellules mammaires épithéliales de biopsies tumorales de sein. Nous avons également mis en évidence que seul le récepteur du BDNF et de la NT-4/5 sans activité catalytique intrinsèque, p75^{NTR}, est exprimé dans le cancer du sein. Enfin, la sécrétion du BDNF et de la NT-4/5 par les cellules mammaires stimule leur récepteur p75^{NTR} grâce auquel elles exercent leur action de facteur de survie à la fois *in vitro* et en modèle animal.

De façon complémentaire à ce deuxième article, j'ai analysé

- **l'expression des isoformes de TrkB dans le cancer du sein,**
- **la régulation transcriptionnelle des neurotrophines,**
- **l'expression des neurotrophines dans le modèle de transformation de Weinberg.**

Les résultats s'y rapportant sont présentés après l'article.

Résultats

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

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

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

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

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

Key words: breast cancer / neurotrophins

* **Corresponding author:** H. Hondermarck, INSERM U 908, bâtiment SN3, University Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel: 33 (0)3 20 43 40 97. hubert.hondermarck@univ-lille1.fr

FOOTNOTES

The abbreviations used are:

NT, neurotrophin, BDNF, brain-derived neurotrophic factor, NT-4/5, neurotrophin 4/5, NT-3, neurotrophin 3, NGF, nerve growth factor, EGF, epithelial growth factor, 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, FBS, fetal bovine serum, HMEC, human mammary epithelial cells, TBS-T, Tris buffered saline-tween, PBS, phosphate buffered saline.

ABSTRACT

Nerve growth factor (NGF), along with its tyrosine kinase receptor TrkA and the neurotrophin receptor p75^{NTR}, has been shown to be involved in breast cancer, but the potential expression of other neurotrophins has not been reported. We demonstrate here that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-4/5 (NT-4/5), but not neurotrophin-3 (NT-3), are expressed and released by breast cancer cells *in vitro*, whereas the corresponding tyrosine kinase receptors TrkB and TrkC are not detected. The expression of BDNF and NT-4/5 was confirmed in breast tumor biopsies with an immunoreactivity concentrated in epithelial cancer cells. Interestingly, BDNF and NT-4/5 exhibited an anti-apoptotic effect on breast cancer cells, that was decreased by siRNA against p75^{NTR}, whereas the use of the pharmacological inhibitors K252a and PD98059 confirmed the non-involvement of the Trk receptors/MAP-kinase pathway. Moreover, immunodeficient mice xenografted with human breast cancer cells and treated with either anti-BDNF or anti-NT-4/5 antibodies displayed inhibited tumor growth, associated to an increase of tumor cell apoptosis. Together, these data indicate that BDNF and NT-4/5 contribute to breast cancer cell survival and can be targeted, in a preclinical model, to inhibit tumor development.

INTRODUCTION

The neurotrophins constitute a family of structurally and functionally related polypeptides including the prototypic nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) and neurotrophin 4/5 (NT-4/5). These growth factors have their activities mediated through two classes of cell surface receptors characterized by different intracellular signaling. Each neurotrophin shows binding specificity for a particular tyrosine kinase receptor: 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 (1). In contrast, all neurotrophins bind and activate the p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}), a member of the Tumor Necrosis Factor-receptor superfamily (2). From a functional point of view, neurotrophins are primarily known to play an important role in the development and maintenance of the nervous system, where they stimulate neuronal cell survival, differentiation and plasticity (3). In addition, non neuronal cells can also respond to neurotrophins in both healthy tissues and in disease states (4, 5). In addition to their involvement in neuroblastomas and glioblastomas, several studies have also reported the influence of neurotrophins in non neuronal cancer (Kruttgen et al. 2006). Indeed, neurotrophins and their receptors participate in tumor growth and cause changes in tumor cell behaviour in several non neuronal cancers including Wilm's tumors (6), medullary thyroid carcinoma (7), prostatic cancer (8), melanoma (9), myeloma (10) as well as pancreatic (11, 12), ovarian (13, 14) and hepatocellular (15) carcinomas.

In breast cancer, it has previously been described that NGF is able to stimulate proliferation and survival of breast tumor cell lines through the activation TrkA and p75^{NTR} respectively (16-20). In addition, NGF cooperates with HER2 to activate breast cancer cell growth (21) and the antiestrogen drug tamoxifen, which is widely used in breast cancer therapy, is able to

inhibit the NGF mitogenic effect in breast cancer cells (22). The evidence that TrkA and p75^{NTR} are expressed in breast tumors and have a prognostic value (23-25), associated to the fact that NGF is overexpressed in the majority of human breast tumors, and that its inhibition can inhibit tumor growth in preclinical xenograft models (Adriaenssens et al. 2008), suggest its potential interest as a therapeutic target. Although it has previously been shown that the addition of exogenous BDNF, NT-4/5 or NT-3 can have an anti-apoptotic effect on breast cancer cells (Descamps et al. 2001), no study has investigated their potential expression and impact in breast cancer.

Here, we report for the first time that BDNF and NT-4/5 are expressed and secreted by breast cancer cells, whereas NT-3 is not. BDNF and NT-4/5 can activate p75^{NTR}, but not TrkB nor trkC which are not expressed, and act as anti-apoptotic factors for breast cancer cells. These results demonstrate that BDNF and NT-4/5 contribute to the progression of breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

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

Cell culture. The human breast epithelial cell lines (MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, BT-20 and MCF-10A) and the human neural precursor cells NTERA-2 cl.D1 (NT2/D1) derived from the NT-2 teratocarcinoma were obtained from the American Type Culture Collection. The Human Mammary Epithelial cells (HMEC) were from Cambrex. MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, BT-20, MCF-10A, were routinely grown in monolayer cultures as described previously (18). HMEC and NT2/D1 were grown in conditions given by the supplier. To obtain

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

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

corresponded to 1 fibroadenoma, 1 ductal carcinoma in situ, 1 adenocarcinoma, 3 invasive ductal carcinomas, 2 invasive lobular carcinomas, 1 mixed ductal and lobular carcinoma and 1 medullary carcinoma. Reverse transcription was performed with 1 µg of RNAs, 0.5 µg of random hexamers, 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase for 10 min at 25°C, 50 min at 37°C and 15 min at 70°C in a final volume of 20 µl. Real time PCR amplifications were performed using a Quantitect SYBR®Green PCR kit with 2 µl of 1/10 cDNA and 500 nM of primers. The primers used were as follows: for *NT-3* transcript 5'-TGGCATCCAAGGTAACAACA-3' and 5'-CTCTGTTGTCGCAGCAGTTC-3' ; *NT-4/5* 5'-AGGCCAAGCAGTCCTATGT-3' and 5'-GGTCTCTCAGCATCCAGCT-3' ; *BDNF* 5'-TGGCTGACACTTTCGAACAC-3' and 5'-CCTCATGGACATGTTTGCAG-3'; *p75^{NTR}* 5'-ACGGCTACTACCAGGATGAG-3' and 5'-TGGCCTCGTCGGAATACGTG-3'; *TrkB* 5'-AGGGCAACCCGCCACGGAA-3' and 5'-GGATCGGTCTGGGGAAAAGG-3', *TrkC* primers were Quantitect® Primer Assay: QT00052906 (Qiagen) and for *RPLP0* (human acidic ribosomal phosphoprotein P0), which was used as a reference gene: 5'-GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT-3' and 5'-GATGACCAGCCCAAAGGAGA-3'. The subsequent PCR conditions were carried out in the following manner: 95°C for 15s, 60°C (or 55°C for Quantitect® Primer Assay) for 20 s, and 72°C for 30 s. Data were analyzed using the MX4000 PCR system software (Stratagene) with the SYBRGreen option (with dissociation curves). Standard curves were performed on serial dilutions of genomic human DNA or RT-transcripts. Values were obtained by the calculation methodology recommended by (26) : 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 Δ Ct 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 (Carlo Erba), 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Nonidet 40, 1 mM permethylsulfonate, 1 mM orthovanadate, 1% SDS, 1% protease inhibitors) at 4 °C. 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 (Scheilcher & Shuell) in transfer buffer (48 mM Tris-Base, 39 mM glycine, 0.0037% 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 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 1:10000) for 1 h at room temperature. The reaction was revealed using the chemiluminescence kit West Pico chemiluminescent substrate (Pierce) and HyperfilmTM (Amersham Biosciences).

Immunohistochemistry. Analysis of tumor biopsies was performed using tissue arrays (Superbiochips, Clinisciences), with TSA biotin system kit (PerkinElmer), according to the manufacturer's instructions. Anti-neurotrophins rabbit polyclonal antibodies (Santa Cruz) were used at dilution 1/200 in blocking buffer, overnight at 4°C, in a moist chamber. After several washes, slides were incubated for 1h 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 immunolabeling, 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. Statistical significance between control and treated cell animal groups was evaluated using Student's t test. For determination of index labeling, anti-PCNA (Pharmingen) was used for the determination of proliferating cells, and cell apoptosis was measured using terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL, Roche).

RESULTS

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

Neurotrophin and receptor expression in breast tumors. Expression of neurotrophins and associated receptors mRNA were also detected by real time RT-PCR in 10 breast tumor biopsies. The results presented in Fig. 2A show that NT-4/5 and p75^{NTR} transcripts were

present in all biopsies studied. BDNF was detected in 6/10 tumors. We have then determined the relative quantification of BDNF, NT-4/5 and p75^{NTR} expression in these 10 biopsies. Fig. 2B shows that the mRNA rates were very variable within the 10 biopsies, confirming the well known heterogeneity among mammary tumors (Fig. 2B). To study the distribution of BDNF and NT-4/5, breast tissue arrays corresponding to 45 breast tumor samples were analysed by immunohistochemistry. Fig. 2C summarizes results obtained with the different spots of tissue for each tumor. The staining intensities for NT-4/5 and BDNF were slightly, but significantly, elevated in cancer biopsies compared to normal tissue, whatever breast cancer type, and were concentrated in the epithelial cancer cells. The levels of NT-4/5 and BDNF were estimated by microscopic observation and breast tissues were classified into four different categories depending on the intensity of labelling (Table 1). The results show no relationship between the level of any neurotrophin with stage, node invasion, oestrogen or progesterone receptors and p53 levels, indicating no relationship was found with classical clinicopathological factors. In conclusion, BDNF, NT-4/5 and p75^{NTR} were not only expressed by mammary epithelial cell lines, but also by tumor epithelial cells of each histological subclass of mammary tumors.

Biological effect of BDNF and NT-4/5 on breast cancer cells. As BDNF and NT-4/5 were found expressed in breast cancer cells, we have tested their effect on survival, proliferation and migration of these cells. First, our data indicated no effect of exogenously added neurotrophins on cell proliferation and migration, whereas an anti-apoptotic effect was observed, confirming previous data (Descamps et al. 2001). Interestingly, we found that endogenously produced BDNF and NT-4/5 can stimulate breast cancer cell survival. The effect of BDNF and NT-4/5 on breast cancer cell survival was evaluated by Hoechst staining after apoptosis induced by TRAIL, and the number of characteristic condensed and fragmented nuclei was counted. The 2 exogenously added neurotrophins exhibited a rescue

effect on TRAIL-treated MCF-7 cells (Fig. 3A). MDA-MB-231 cells were also tested and the same survival effect of BDNF and NT-4/5 was obtained (data not shown) and combination of BDNF and NT-4/5 provided no more effect on cell survival (data not shown). siRNA against p75^{NTR} totally abolished the NT-4/5 and BDNF anti-apoptotic effect and even increased the apoptosis rate compared to siRNA control (Fig. 3A and 3B). Moreover, the Trk pharmacological inhibitors K252a, and the MEK inhibitor PD98059, had no effect on apoptosis induced by siRNA anti p75^{NTR} nor on neurotrophin survival effect, confirming the non-involvement of Trk receptors in BDNF and NT-4/5 activity in breast cancer cells. The control of siRNA efficacy in depleting p75^{NTR} mRNA is shown in Fig. 3C.

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

participate in breast tumor growth by stimulating breast tumor cell survival and resistance to apoptosis.

DISCUSSION

Our results show that BDNF and NT-4/5 mRNA are expressed in all tested mammary epithelial cell lines, whereas NT-3 was only detected, and at a very low level, in MDA-MB-231 and normal breast epithelial cells. This was confirmed at the protein level for which BDNF and NT-4/5 expression and release were clearly observed, whereas no NT-3 protein was detected in any of the cell lines tested. In addition, expression pattern analysis, in both cell lines and tissue biopsies, revealed widespread expression and secretion of BDNF and NT-4/5 in both cancerous and non-cancerous samples. Thus, unlike NGF which is overexpressed in breast cancer cells (18), NT-4/5 and BDNF are also synthesized and secreted by normal epithelial cells, and in consequence, they could not be proposed as new biomarkers of breast cancer. Considering the levels of immunoreactivity in tumor biopsies, and the strong staining of these growth factors in breast metastatic tissue (lymph node), they may well be related to tumor aggressiveness, albeit we have as yet established no relationship with any known prognostic factor. Therefore, although prognostic value was not directly shown here, we have established that BDNF and NT-4/5 expression occur in breast cancer.

As BDNF and NT-4/5 were detected in breast cancer, we determined the expression of their corresponding tyrosine kinase receptor TrkB in breast cancer cells. The implication of TrkB in neuronal and non neuronal cancer is largely documented. Indeed, TrkB is overexpressed in some cancers like neuroblastoma (27), prostate adenocarcinoma (28), Wilm's tumors (29), pancreatic adenocarcinoma (11), myeloma (30), and is able to increase resistance to chemotherapy, and eventually promote tumor invasion, proliferation and neoangiogenesis. In further support for a role of TrkB in metastasis, TrkB acts as a potent mediator of anoikis resistance, which is believed to be a contributing factor (31, 32). However, in our study we show that TrkB was not expressed in breast cancer cell lines. In contrast, the other receptor

for BDNF and NT-4/5, P75^{NTR}, had already been shown to be expressed in breast tumors where it could be related to prognosis (23-25), and we confirmed here the expression of p75^{NTR} in breast cancer cell lines and tumors. Together, p75^{NTR} is the predominant receptor form for BDNF and NT-4/5 in breast cancer, and the biological effect of these neurotrophins has to be analyzed in that context.

Several neurotrophic growth factors, and their corresponding receptors, are now known for their implication in carcinogenesis (5). In neuroblastoma, TrkAIII splice variant is able to act as a stimulator (33) as well as TrkB and BDNF which enhance neuroblastoma cell survival, resistance to chemotherapy and tumor progression (34-37). In breast cancer, the expression of NGF and glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) increase proliferation, survival and breast cancer cell scattering (38, 39). In the present study, we show that BDNF and NT-4/5 exogenous stimulation rescue breast cancer cells from apoptosis and can therefore be considered as survival factors for breast cancer cells, whereas neither proliferative nor migratory effects were observed. p75^{NTR} binds all neurotrophins with the same affinity and regulates the apoptosis/survival balance in neuronal systems (40). In carcinogenesis, p75^{NTR} also seems to present an ambivalence since it is correlated to the development of melanoma through increase of cell invasion, survival and brain metastasis (9, 41) and is acting more like an inhibitor in prostate, gastric and hepato carcinomas (42-44). In our experiments, the inhibition of p75^{NTR} with specific siRNA totally abolished the BDNF and NT-4/5 anti-apoptotic/prosurvival effect. Furthermore, the use of pharmacological inhibitors of Trk and MEK had no consequence on BDNF and NT-4/5 survival effect of breast cancer cells. Together, these data indicate that the anti-apoptotic effect of BDNF and NT-4/5 in breast cancer cells is mediated through activation of p75^{NTR}, without implication of Trk receptors and MAPK pathway. In addition, abolition of p75^{NTR} further increased the basal level of TRAIL induced apoptosis of mammary cancer cells, suggesting an endogenous stimulation of

p75^{NTR} through BDNF and NT-4/5 secretion in breast cancer cells. This strongly suggests the existence of a BDNF and NT-4/5 mediated autocrine loop, through p75^{NTR}, for the stimulation of breast cancer cells.

In conclusion, our study demonstrates that, after NGF, other members of the neurotrophin family are involved in breast cancer. Although further pharmacological and clinical investigations will be needed, the stimulation of breast cancer cell survival by BDNF and NT-4/5 through p75^{NTR} suggests a potential value as therapeutic target that may have ramifications for the design of innovative therapeutic strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by grants from the INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2006), le Ministère de l'Education Nationale and the Région Nord/Pas-de-Calais. Elsa Vanhecke was the recipient of a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). We thank Prof. Philippe Delannoy (USTL, France) for the use of Mx4000 and Nanodrop apparatus.

REFERENCES

1. Huang, E.J., and Reichardt, L.F. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
2. Lu, B., Pang, P.T., and Woo, N.H. 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6:603-614.
3. Chao, M.V. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299-309.
4. Sariola, H. 2001. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci* 58:1061-1066.
5. Kruttgen, A., Schneider, I., and Weis, J. 2006. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain Pathol* 16:304-310.
6. Donovan, M.J., Hempstead, B., Huber, L.J., Kaplan, D., Tsoulfas, P., Chao, M., Parada, L., and Schofield, D. 1994. Identification of the neurotrophin receptors p75 and trk in a series of Wilms' tumors. *Am J Pathol* 145:792-801.
7. McGregor, L.M., McCune, B.K., Graff, J.R., McDowell, P.R., Romans, K.E., Yancopoulos, G.D., Ball, D.W., Baylin, S.B., and Nelkin, B.D. 1999. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4540-4545.
8. Dalal, R., and Djakiew, D. 1997. Molecular characterization of neurotrophin expression and the corresponding tropomyosin receptor kinases (trks) in epithelial and stromal cells of the human prostate. *Mol Cell Endocrinol* 134:15-22.
9. 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*.
10. Pearse, R.N., Swendeman, S.L., Li, Y., Raffi, D., and Hempstead, B.L. 2005. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* 105:4429-4436.
11. Miknyoczki, S.J., Lang, D., Huang, L., Klein-Szanto, A.J., Dionne, C.A., and Ruggeri, B.A. 1999. Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal

- adenocarcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *Int J Cancer* 81:417-427.
12. 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* 21:850-858.
 13. Davidson, B., Reich, R., Lazarovici, P., Nesland, J.M., Skrede, M., Risberg, B., Trope, C.G., and Florenes, V.A. 2003. Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 9:2248-2259.
 14. Campos, X., Munoz, Y., Selman, A., Yazigi, R., Moyano, L., Weinstein-Oppenheimer, C., Lara, H.E., and Romero, C. 2007. Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 104:168-175.
 15. Yang, Z.F., Ho, D.W., Lam, C.T., Luk, J.M., Lum, C.T., Yu, W.C., Poon, R.T., and Fan, S.T. 2005. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 65:219-225.
 16. 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* 273:16659-16662.
 17. 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. 2001. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 276:17864-17870.
 18. Dolle, L., El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Nurcombe, V., and Hondermarck, H. 2003. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 22:5592-5601.
 19. El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Dolle, L., Descamps, S., and Hondermarck, H. 2003. Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells. *J Biol Chem* 278:16952-16956.
 20. 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* 67:6725-6736.

21. Tagliabue, E., Castiglioni, F., Ghirelli, C., Modugno, M., Asnaghi, L., Somenzi, G., Melani, C., and Menard, S. 2000. Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 275:5388-5394.
22. Chiarenza, A., Lazarovici, P., Lempereur, L., Cantarella, G., Bianchi, A., and Bernardini, R. 2001. Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* 61:3002-3008.
23. Aragona, M., Panetta, S., Silipigni, A.M., Romeo, D.L., Pastura, G., Mesiti, M., Cascinu, S., and La Torre, F. 2001. Nerve growth factor receptor immunoreactivity in breast cancer patients. *Cancer Invest* 19:692-697.
24. 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* 83:119-128.
25. Descamps, S., Pawlowski, V., Revillion, F., Hornez, L., Hebbar, M., Boilly, B., Hondermarck, H., and Peyrat, J.P. 2001. Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res* 61:4337-4340.
26. Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
27. Nakagawara, A., Azar, C.G., Scavarda, N.J., and Brodeur, G.M. 1994. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 14:759-767.
28. Dionne, C.A., Camoratto, A.M., Jani, J.P., Emerson, E., Neff, N., Vaught, J.L., Murakata, C., Djakiew, D., Lamb, J., Bova, S., et al. 1998. Cell cycle-independent death of prostate adenocarcinoma is induced by the trk tyrosine kinase inhibitor CEP-751 (KT6587). *Clin Cancer Res* 4:1887-1898.
29. Eggert, A., Grotzer, M.A., Ikegaki, N., Zhao, H., Cnaan, A., Brodeur, G.M., and Evans, A.E. 2001. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol* 19:689-696.
30. Sclabas, G.M., Fujioka, S., Schmidt, C., Li, Z., Frederick, W.A., Yang, W., Yokoi, K., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Hess, K.R., et al. 2005. Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 11:440-449.

31. Douma, S., Van Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., Van Garderen, E., and Peeper, D.S. 2004. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 430:1034-1039.
32. Geiger, T.R., and Peeper, D.S. 2007. Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis. *Cancer Res* 67:6221-6229.
33. Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Desantis, G., Tessitore, A., Vetuschi, A., Sferra, R., Rucci, N., Argenti, B., Screpanti, I., et al. 2004. TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 6:347-360.
34. Ho, R., Eggert, A., Hishiki, T., Minturn, J.E., Ikegaki, N., Foster, P., Camoratto, A.M., Evans, A.E., and Brodeur, G.M. 2002. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res* 62:6462-6466.
35. Schulte, J.H., Schramm, A., Klein-Hitpass, L., Klenk, M., Wessels, H., Hauffa, B.P., Eils, J., Eils, R., Brodeur, G.M., Schweigerer, L., et al. 2005. 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* 24:165-177.
36. Li, Z., Jaboin, J., Dennis, P.A., and Thiele, C.J. 2005. 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* 65:2070-2075.
37. Li, Z., Zhang, J., Liu, Z., Woo, C.W., and Thiele, C.J. 2007. 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* 14:318-326.
38. Esseghir, S., Todd, S.K., Hunt, T., Poulson, R., Plaza-Menacho, I., Reis-Filho, J.S., and Isacke, C.M. 2007. 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* 67:11732-11741.
39. Adriaenssens, E., Vanhecke, E., Saule, P., Mougel, A., Page, A., Romon, R., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., and Hondermarck, H. 2008. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 68:346-351.
40. Nykjaer, A., Willnow, T.E., and Petersen, C.M. 2005. p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 15:49-57.

41. Marchetti, D., Aucoin, R., Blust, J., Murry, B., and Greiter-Wilke, A. 2004. p75 neurotrophin receptor functions as a survival receptor in brain-metastatic melanoma cells. *J Cell Biochem* 91:206-215.
42. Jin, H., Pan, Y., Zhao, L., Zhai, H., Li, X., Sun, L., He, L., Chen, Y., Hong, L., Du, Y., et al. 2007. p75 neurotrophin receptor suppresses the proliferation of human gastric cancer cells. *Neoplasia* 9:471-478.
43. Papatsoris, A.G., Liolitsa, D., and Deliveliotis, C. 2007. Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 16:303-309.
44. Yuanlong, H., Haifeng, J., Xiaoyin, Z., Jialin, S., Jie, L., Li, Y., Huahong, X., Jiugang, S., Yanglin, P., Kaichun, W., et al. 2008. The inhibitory effect of p75 neurotrophin receptor on growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.*

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

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

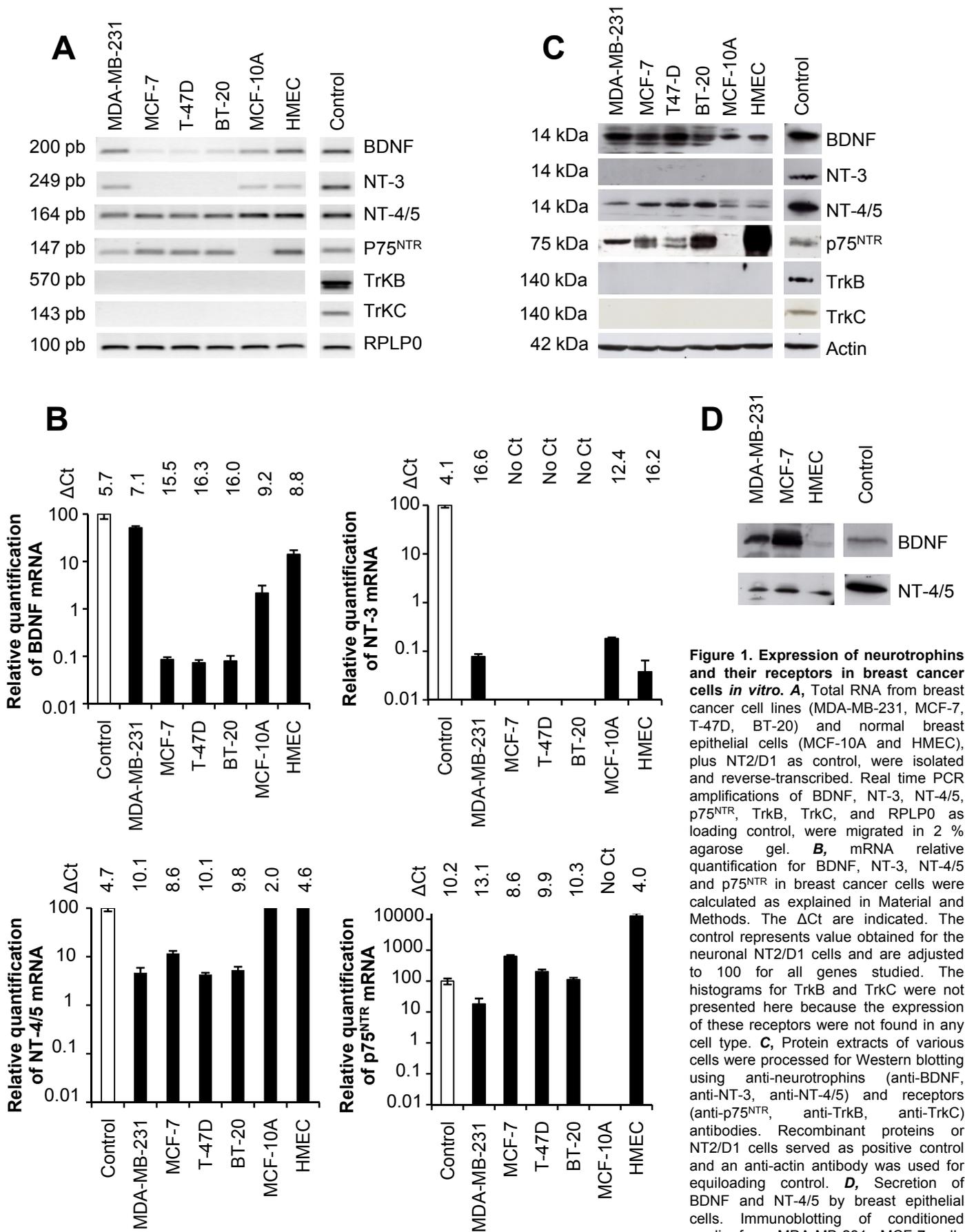


Figure 1. Expression of neurotrophins and their receptors in breast cancer cells *in vitro*. **A**, Total RNA from breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF-7, T-47D, BT-20) and normal breast epithelial cells (MCF-10A and HMEC), plus NT2/D1 as control, were isolated and reverse-transcribed. Real time PCR amplifications of BDNF, NT-3, NT-4/5, p75^{NTR}, TrkB, TrkC, and RPLP0 as loading control, were migrated in 2 % agarose gel. **B**, mRNA relative quantification for BDNF, NT-3, NT-4/5 and p75^{NTR} in breast cancer cells were calculated as explained in Material and Methods. The Δ Ct are indicated. The control represents value obtained for the neuronal NT2/D1 cells and are adjusted to 100 for all genes studied. The histograms for TrkB and TrkC were not presented here because the expression of these receptors were not found in any cell type. **C**, Protein extracts of various cells were processed for Western blotting using anti-neurotrophins (anti-BDNF, anti-NT-3, anti-NT-4/5) and receptors (anti-p75^{NTR}, anti-TrkB, anti-TrkC) antibodies. Recombinant proteins or NT2/D1 cells served as positive control and an anti-actin antibody was used for equiloading control. **D**, Secretion of BDNF and NT-4/5 by breast epithelial cells. Immunoblotting of conditioned media from MDA-MB-231, MCF-7 cells and HMEC were performed using anti-BDNF and anti-NT-4/5 antibodies.

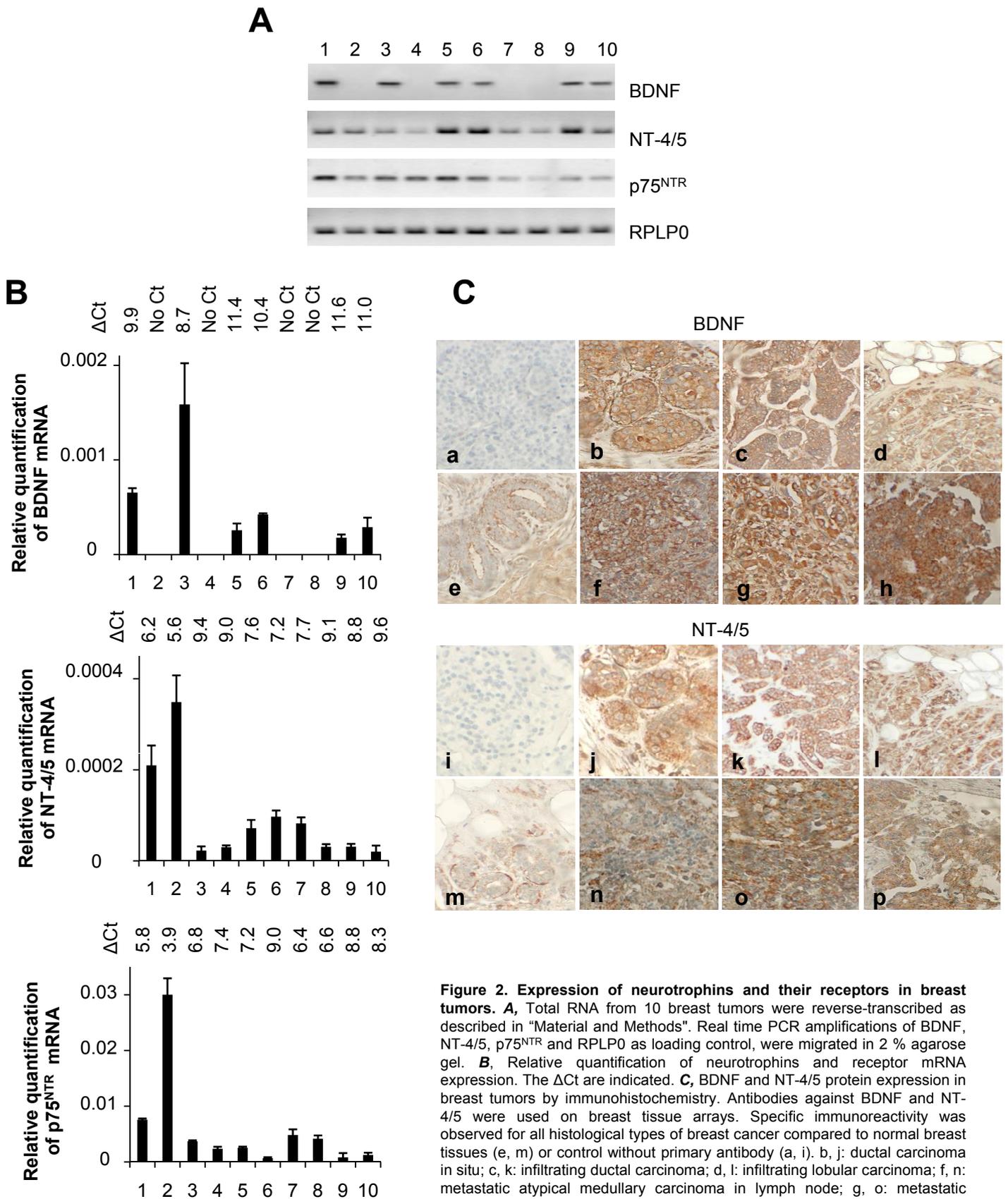


Figure 2. Expression of neurotrophins and their receptors in breast tumors. **A**, Total RNA from 10 breast tumors were reverse-transcribed as described in "Material and Methods". Real time PCR amplifications of BDNF, NT-4/5, p75^{NTR} and RPLP0 as loading control, were migrated in 2 % agarose gel. **B**, Relative quantification of neurotrophins and receptor mRNA expression. The Δ Ct are indicated. **C**, BDNF and NT-4/5 protein expression in breast tumors by immunohistochemistry. Antibodies against BDNF and NT-4/5 were used on breast tissue arrays. Specific immunoreactivity was observed for all histological types of breast cancer compared to normal breast tissues (e, m) or control without primary antibody (a, i). b, j: ductal carcinoma in situ; c, k: infiltrating ductal carcinoma; d, l: infiltrating lobular carcinoma; f, n: metastatic atypical medullary carcinoma in lymph node; g, o: metastatic infiltrating ductal carcinoma in lymph node; h, p: metastatic infiltrating lobular carcinoma in lymph node. Relative quantification of immunostaining intensities are presented in Table 1.

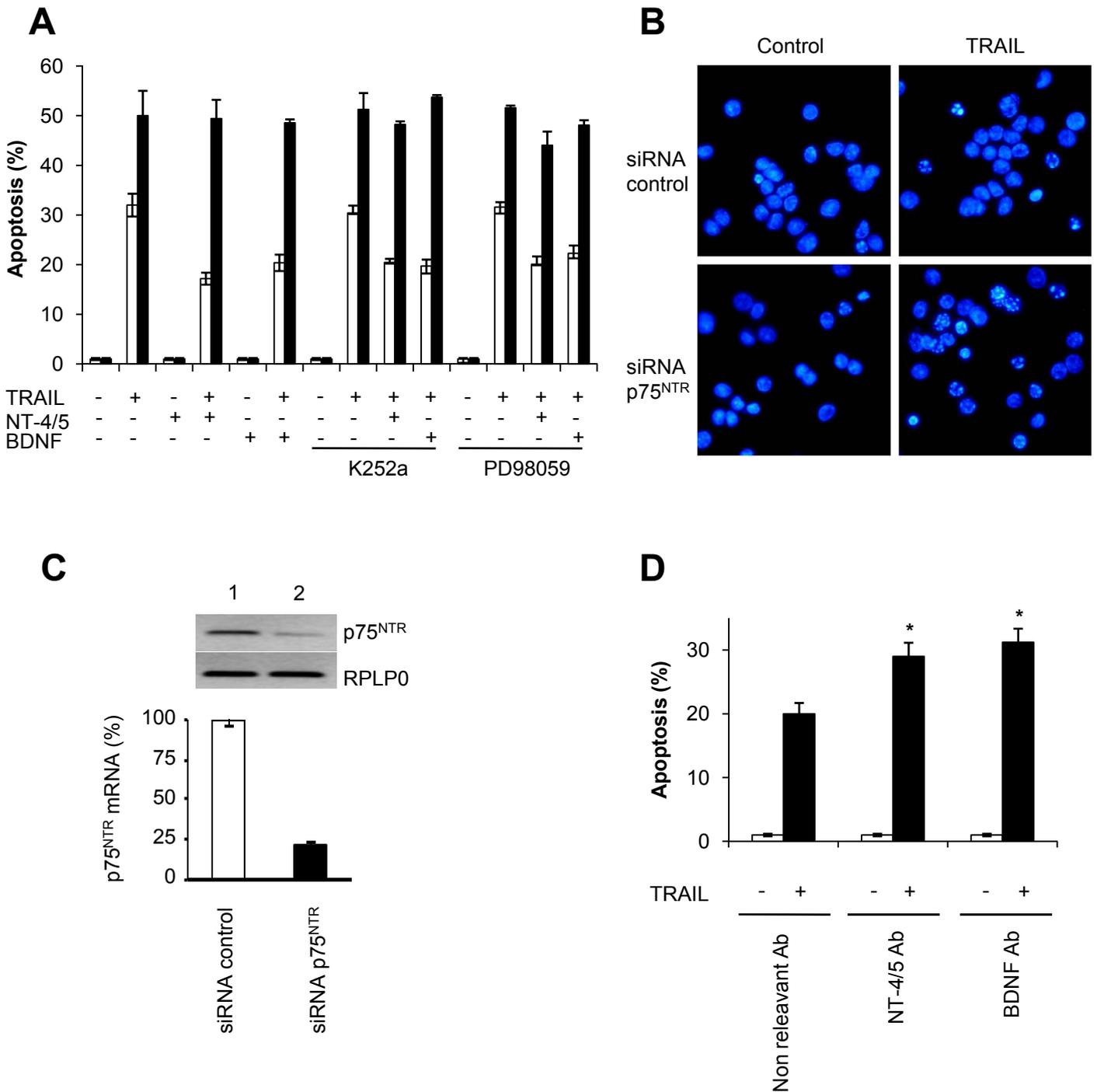


Figure 3. Effect of BDNF and NT-4/5 on breast cancer cells *in vitro*.

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

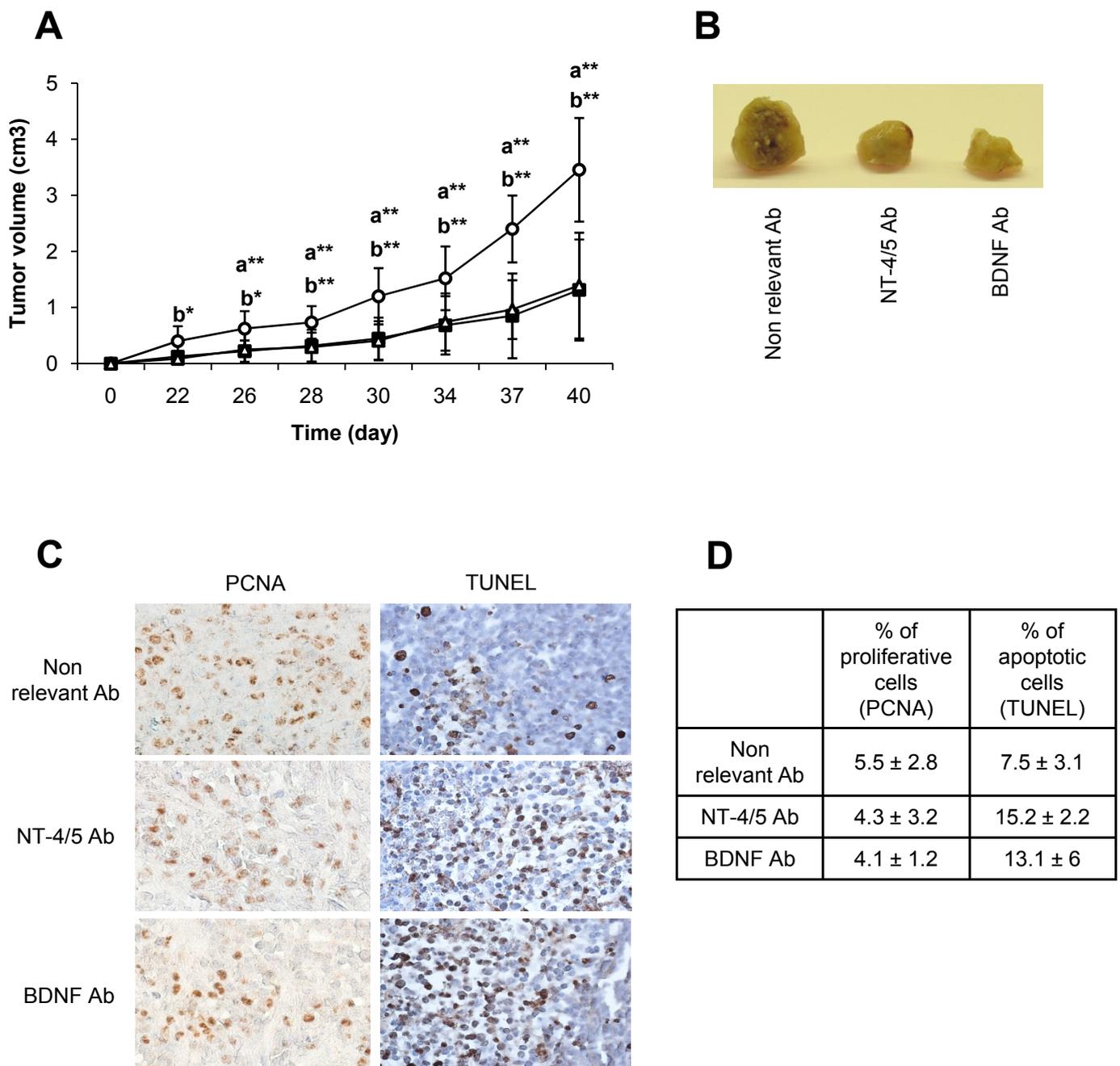


Figure 4. Effect of BDNF and NT-4/5 inhibition on tumor xenograft in immunodeficient mice. **A**, 3 days after subcutaneous injection of MDA-MB-231 cells, SCID mice were injected with 12.5 μ g of neutralizing antibodies: anti-BDNF (Δ), anti-NT-4/5 (\blacksquare) and non relevant antibodies (\circ) as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

Travaux supplémentaires: Les isoformes de TrkB dans le cancer du sein

TrkB est le récepteur à activité tyrosine kinase qui lie le BDNF et la NT-4/5. Sa surexpression est associée dans bon nombre de cancers (neuronaux et non neuronaux) à une agressivité de la tumeur (voir § I. D. 2. b). Comme décrit dans l'introduction au chapitre I. B. 4. b, TrkB est alternativement épissé conduisant à la formation potentielle de 3 isoformes majeurs chez l'homme. Nous montrons dans le cancer du sein que TrkB dans sa forme entière n'est pas exprimé (article 2 : Vanhecke et al.). Cependant, les récepteurs Trk en dehors du système nerveux sont représentés le plus souvent par des formes tronquées de leur partie intracellulaire suggérant qu'ils agissent tels des « scavenger » récepteurs ou comme des dominants négatifs des récepteurs entiers (Sariola, 2001). Nous avons donc recherché dans les cellules de cancer du sein l'expression des isoformes tronquées TrkB-T1 et TrkB-T-shc, les deux formes tronquées majoritaires.

MATERIEL ET METHODE

Sur la base des épissages alternatifs, ces trois isoformes sont facilement différenciables en PCR (Figure 8). Les amorces publiées ont été choisies dans des zones propres à chacun des isoformes (Labouyrie et al., 1999; Stoilov et al., 2002):

- TrkB entier (FL) dans le domaine kinase

5'-AGGGCAACCCGCCACGGAA-3' et 5'-GGATCGGTCTGGGGAAAAGG-3'

- TrkB-T1 dans l'exon 16, spécifique de cet isoforme

5'-TAAAACCGGTTGGGAACATC-3' and 5'-ACCCATCCAGTGGGATCTTA-3'

- TrkB-T-shc dans l'exon 19, spécifique de cet isoforme

5'-ATGATGACTCTGCCAGCCCA-3' and 5'-ATCAGGCGGTCTTGGGGGAA-3'

Nous avons choisi d'utiliser en contrôle positif des cellules de neuroblastomes SH-SY5Y qui lors de leur différenciation augmentent leur expression des isoformes de TrkB (Kaplan et al., 1993). Les SH-SY5Y cultivées dans du milieu complet DMEM ont été induites en différenciation à l'aide d'acide rétinoïque (5µM) pendant 2 et 6 jours, puis les ARN extraits ont été rétrotranscrits en ADNc (MMLV, Invitrogen) et amplifiés par PCR en temps réel avec les 3 couples d'amorces cités ci-dessus, RPLP0 servant de contrôle.

RESULTATS

Les résultats de la figure 33 indiquent que plus les cellules de neuroblastomes sont induites en différenciation, plus elles expriment les 3 isoformes de TrkB (Figure A et B). Les amorces de PCR ainsi validées ont donc pu être utilisées dans les cellules de cancer du sein. De façon intéressante, les MDA-MB-231 et les MCF-7 expriment l'isoforme TrkB-T1 contrairement aux récepteurs TrkB entier et TrkB-Tshc (Figure 33 C).

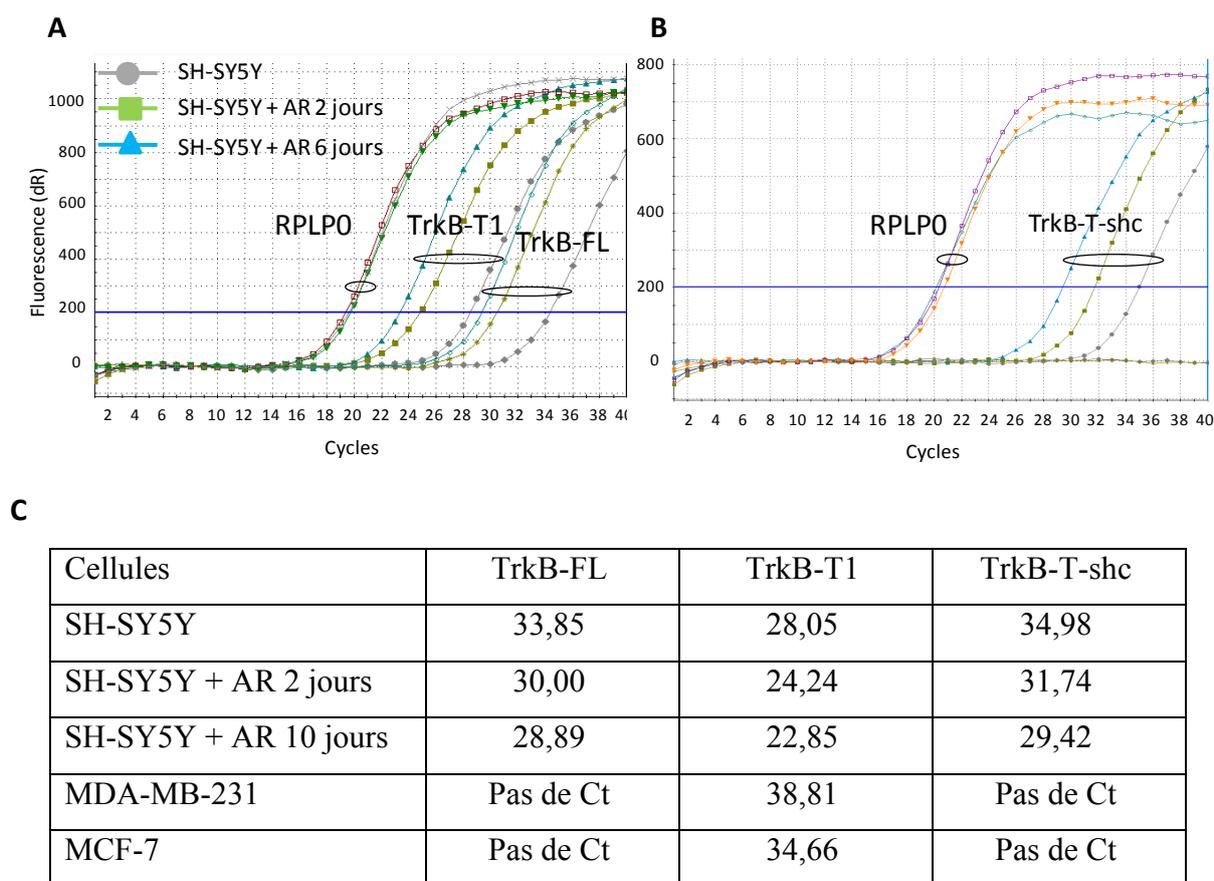


Figure 33. Expression des isoformes de TrkB dans les SH-SY5Y, les MDA-MB-231 et les MCF-7.

A, B. Expression de TrkB-FL, TrkB-T1 (A) et TrkB-T-shc (B) dans des cellules SH-SY5Y induites ou non en différenciation par l'acide rétinoïque (AR) (2 ou 6 jours). Plus le traitement est long, plus les cellules expriment les isoformes de TrkB. C, Récapitulatif des amplifications (Ct) des isoformes de TrkB dans les SH-SY5Y, les MDA-MB-231 et les MCF-7.

Nous avons ensuite testé l'expression de TrkB-T1 dans un plus grand nombre de cellules cancéreuses et normales de sein. Nous montrons que TrkB-T1 est présent au niveau transcriptionnel et protéique (Figures 34 A et C) dans toutes les cellules testées. De plus, nous

Résultats

avons confirmé nos résultats en identifiant TrkB-T1 dans les MCF-7 par clonage et séquençage du produit de PCR (Figure 34 B).

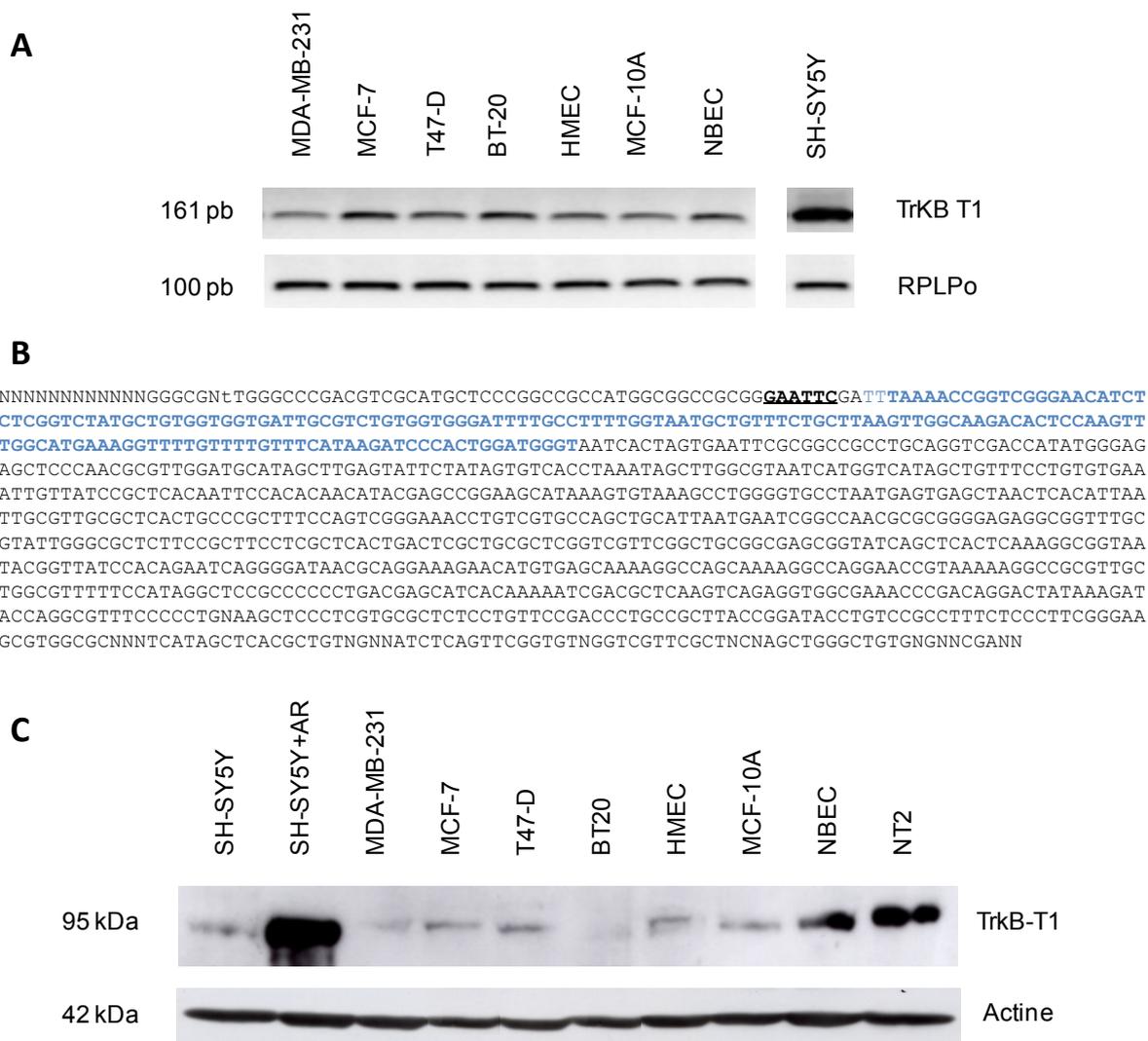


Figure 34. Expression de TrkB-T1 dans les cellules cancéreuses de sein.

A, C. Expression de TrkB-T1 dans les cellules de cancer du sein (MDA-MB-231, MCF-7, T47-D, BT-20) et les cellules normales de sein (HMEC, MCF-10A, NBEC) par PCR (A) et Western-Blot (C), les SH-SY5Y servant de contrôle. B, Séquençage du produit de PCR amplifié dans les MCF-7, TrkB-T1 est en bleu.

Nous avons alors étendu l'étude de l'expression de TrkB-T1 à des biopsies tumorales. Pour cela, des ARN de biopsies de cancer du sein ont été rétrotranscrits, amplifiés par PCR et déposés sur gel d'agarose (voir conditions expérimentales de l'article Vanhecke et al.). Les résultats montrent que les 10 biopsies testées expriment le récepteur tronqué TrkB-T1 (Ct compris entre 27,5 et 33,8) alors que TrkB-FL n'est présent que dans 2 biopsies (Figure 35 A). Au niveau protéique, la détection a été réalisée par immunohistochimie sur des tissus

Résultats

array (Superbiochip, clinisciences) à l'aide d'un anticorps reconnaissant sans distinction les isoformes de TrkB. Celle-ci est exclusivement localisée dans les cellules épithéliales cancéreuses (Figure 35 B). Ce marquage protéique est, par ailleurs, trouvé plus important dans les cancers et les ganglions lymphatiques métastasés que dans les tissus normaux (Table 9) mais n'est corrélé à aucun facteur clinicopathologique (Stade, récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone, ganglions lymphatiques, p53) (Table 9).

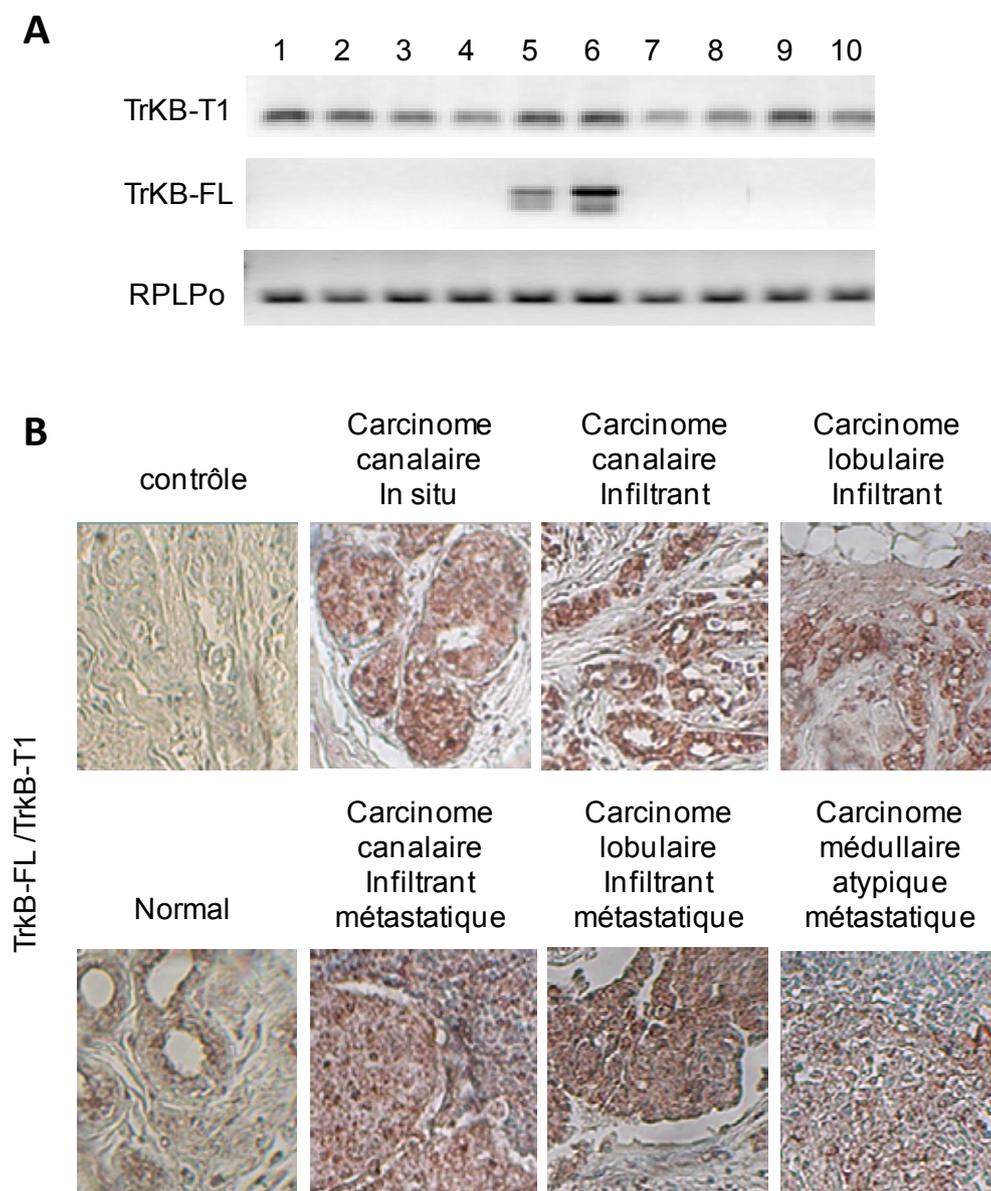


Figure 35. Expression de TrkB-T1 dans des biopsies tumorales de sein.

A. Expression transcriptionnelle de *TrkB-T1*, *TrkB-FL* et *RPLP0* (gène contrôle), B. Détection de *TrkB/TrkB-T1* par immunohistochimie.

Résultats

Facteurs clinicopathologiques	TrkB / TrkB-T1							
		Intensité du marquage				Moyenne	Ecart-type	
		0	1	2	3			
Tissu normal de sein	(n=9)	3	4	1	1	1,0	0,9	
Tissu cancéreux de sein	(n=36)	6	9	11	10	1,7	1,0	
Tissu métastatiques de sein (ganglions lymphatiques)	(n=9)	1	2	5	1	1,7	0,8	
cancers + métastases	(n=45)	7	11	16	13	1,8	1,0	
Stade	0	(n=2)	0	0	0	2	3,0	0,0
	I	(n=0)	0	0	0	0	0,0	0,0
	II	(n=15)	2	6	5	2	1,5	0,9
	III	(n=28)	5	5	11	7	1,7	1,0
Récepteurs aux œstrogènes	+	(n=25)	5	6	10	4	1,5	1,0
	-	(n=20)	2	5	6	7	1,9	1,0
Récepteurs de la progestérone	+	(n=18)	2	5	8	3	1,7	0,9
	-	(n=26)	5	6	8	1	1,0	1,1
Statut des ganglions lymphatiques	+	(n=33)	6	6	13	8	1,7	1,0
	-	(n=11)	1	5	2	3	1,6	1,0
P53	+	(n=17)	1	4	8	4	1,9	0,8
	-	(n=28)	6	7	8	7	1,6	1,1

Table 9. Marquage immunohistologique des formes de TrkB dans le cancer du sein.

L'intensité de marquage d'un anti-TrkB dans des biopsies tumorales (n=45) et normales (n=9) de sein a été estimée entre 0 (pas de coloration) et 3 (forte coloration). Pour chaque échantillon, le stade, le statut des récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone, des ganglions lymphatiques et de p53 est connu. Pour 2 échantillons, les données concernant le récepteur à la progestérone et le statut des ganglions n'est pas connu (n=44).

CONCLUSION / DISCUSSION

Nous avons montré que le récepteur TrkB entier n'est pas exprimé dans les lignées de cellules de cancer du sein (Vanhecke et al.), et nous montrons que seules 2 tumeurs sur 10 testées expriment ce récepteur. Nous pouvons donc supposer que l'expression de TrkB entier pourrait être due aux cellules du microenvironnement présentes dans les tumeurs de cancer du sein telles que les cellules endothéliales ou immunitaires. En revanche, nous montrons ici que la forme tronquée TrkB-T1 est exprimée dans toutes les lignées et dans toutes les biopsies tumorales de sein testées en PCR alors que l'autre récepteur sans domaine kinasique TrkB-T-shc n'est pas détecté confirmant son absence dans les cellules non neuronales (Stoilov et al., 2002). Ainsi pouvons-nous déduire que TrkB-T1 est la forme prédominante exprimée dans les cancers du sein. Par déduction, le marquage de nos immunohistochimies

Résultats

réalisées avec un anticorps reconnaissant toutes les formes de TrkB, rend compte de la présence de TrkB-T1 et ce de façon plus importante dans les cellules épithéliales de cancer du sein que les tissus normaux mais sans corrélation avec les facteurs utilisés couramment en diagnostic ou pronostic du cancer du sein.

De façon générale, dans les cancers, les études concernant le rôle des récepteurs TrkB sans domaine kinasique (TrkB TK-) ont souligné une corrélation entre ces récepteurs et un bon pronostic dans les tumeurs de Wilm's (Eggert et al., 2001) et un phénotype différencié de bon pronostic dans les tumeurs neuroblastiques (Nakagawara et al., 1994), ceci est potentiellement dû à l'inhibition de la signalisation du récepteur entier. Une seule publication révèle un lien entre la surexpression d'un isoforme tronqué et la carcinogenèse, il contribuerait hypothétiquement à la sélection d'une voie de signalisation de prolifération induite par le BDNF dans le cancer du foie (Yang et al., 2005).

Dans notre étude, TrkB entier n'est pas exprimé par les cellules de cancer du sein alors que TrkB-T1 est largement présent. Nous pouvons supposer que TrkB-T1 pourrait induire des voies de signalisation spécifiques malgré sa courte queue cytoplasmique à l'image de ce qui est décrit dans les cellules gliales (Rose et al., 2003) ou agir sur le récepteur p75^{NTR} (Hartmann et al., 2004).

A ce stade, l'absence de phénotype associé à ce récepteur TrkB-T1 ne nous a pas permis d'intégrer ces résultats à l'article Vanhecke et al. D'autres études sont nécessaires afin d'explorer le rôle de ce récepteur dans le cancer du sein, nous envisageons notamment d'inhiber spécifiquement TrkB-T1 (avec ou non p75^{NTR}) à l'aide de siRNA et d'en observer les effets phénotypiques sur les cellules de cancer du sein. De façon complémentaire, la possible dimérisation avec d'autres récepteurs et notamment p75^{NTR} sera étudiée par immunoprécipitation de TrkB-T1.

Travaux supplémentaires: Régulation transcriptionnelle des neurotrophines

Nous avons vu dans le chapitre introductif que la glande mammaire et sa cancérisation sont sous l'influence de nombreux facteurs environnementaux agissant de manières endocrine, paracrine et même autocrine. Ainsi, la cancérisation de la glande mammaire peut notamment être dépendante de l'action des facteurs de croissance ainsi que des hormones stéroïdes ou peptidiques comme l'œstradiol, la progestérone ou la prolactine (Figure 24). L'expression des neurotrophines et des récepteurs correspondants dans les cellules cancéreuses mammaires pourrait être régulée par ces facteurs et hormones ou les drogues associées, utilisées en traitement du cancer du sein, comme le tamoxifen. Ainsi, l'expression de la famille des NT et par extension son rôle dans le développement du cancer du sein ne serait pas un événement isolé mais pourrait être sous l'influence des signaux extérieurs et de toute la machinerie hormonale du sein.

MATERIEL ET METHODE

L'étude transcriptionnelle des NT a été réalisée par PCR en temps réel (Stratagène, MX4000) afin de déterminer une quantification relative de chaque ARNm dans les cellules de cancer du sein en fonction des traitements administrés (facteurs de croissance, hormones, drogue anticancéreuse).

- Traitements aux facteurs de croissance : NGF, EGF, FGF2, IGF2, VEGF

Les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 et/ou MCF-7 sontensemencées en boîte 100 mm en milieu complet. 24h après ensemencement, elles sont rincées et sevrées avec du milieu sans serum pendant une nuit puis traitées 24h en milieu sans serum frais supplémenté des différents facteurs de croissance : NGF (200 ng/ml), EGF (100 ng/ml), FGF2 (100 ng/ml), IGF2 (20 ng/ml), VEGF (10 ng/ml), les contrôles sont SVF (serum de veau fœtal) (10%) comme contrôle positif et milieu sans serum seul comme contrôle négatif. Les récepteurs de ces facteurs de croissance sont exprimés par les cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 et MCF-7 et leur stimulation entraîne une réponse cellulaire marquée (prolifération, survie).

Résultats

- Traitements aux hormones peptidiques : prolactine, et stéroïdiennes : œstradiol et progestérone, et à la drogue antioestrogénique : Tamoxifen.

Les cellules de cancer du sein hormono-sensibles MCF-7 (ER α +, ER β +) sontensemencées en boîte 100 mm en milieu complet sans rouge de phénol (RPMI). 24h après ensemencement, elles sont rincées et sevrées avec du milieu RPMI sans serum pendant une nuit puis traitées 24h en milieu sans serum frais supplémenté des différentes hormones : estradiol (E2) (10^{-9} M), progestérone (10^{-9} M), prolactine (PRL) (100 ng/ml) et de la drogue anti-oestrogénique tamoxifen (TAM) (10^{-6} M), les hormones stéroïdiennes et le TAM étant repris dans l'éthanol, il est ajouté au 1/1000 dans le milieu de sevrage et sert de contrôle.

Suite aux différents traitements, les cellules sont lysées, les ARN extraits au Trireagent (Euromedex). Les étapes de rétrotranscription et les conditions de PCR en temps réel sont identiques à celles utilisées dans les articles n°1 et n°2 (Adriaenssens et al., Vanhecke et al.).

RESULTATS

La figure 36 présente les résultats obtenus en PCR en temps réel après traitement de la lignée MDA-MB-231 aux facteurs de croissance. Globalement l'expression des neurotrophines et de leur récepteurs ne présentent pas de variations notables ni dans les MDA-MB-231 ni dans les MCF-7 (résultats non montrés). La faible variation d'expression de TrkA induite par l'EGF n'est en effet pas retrouvée dans le MCF-7.

Alors que les neurotrophines et leurs récepteurs ne sont pas régulés par les facteurs de croissance, nous montrons dans la figure 37 que l'expression transcriptionnelle du récepteur p75^{NTR} est régulée positivement (six fois) par l'hormone stéroïdienne œstradiol dans les MCF-7.

Résultats

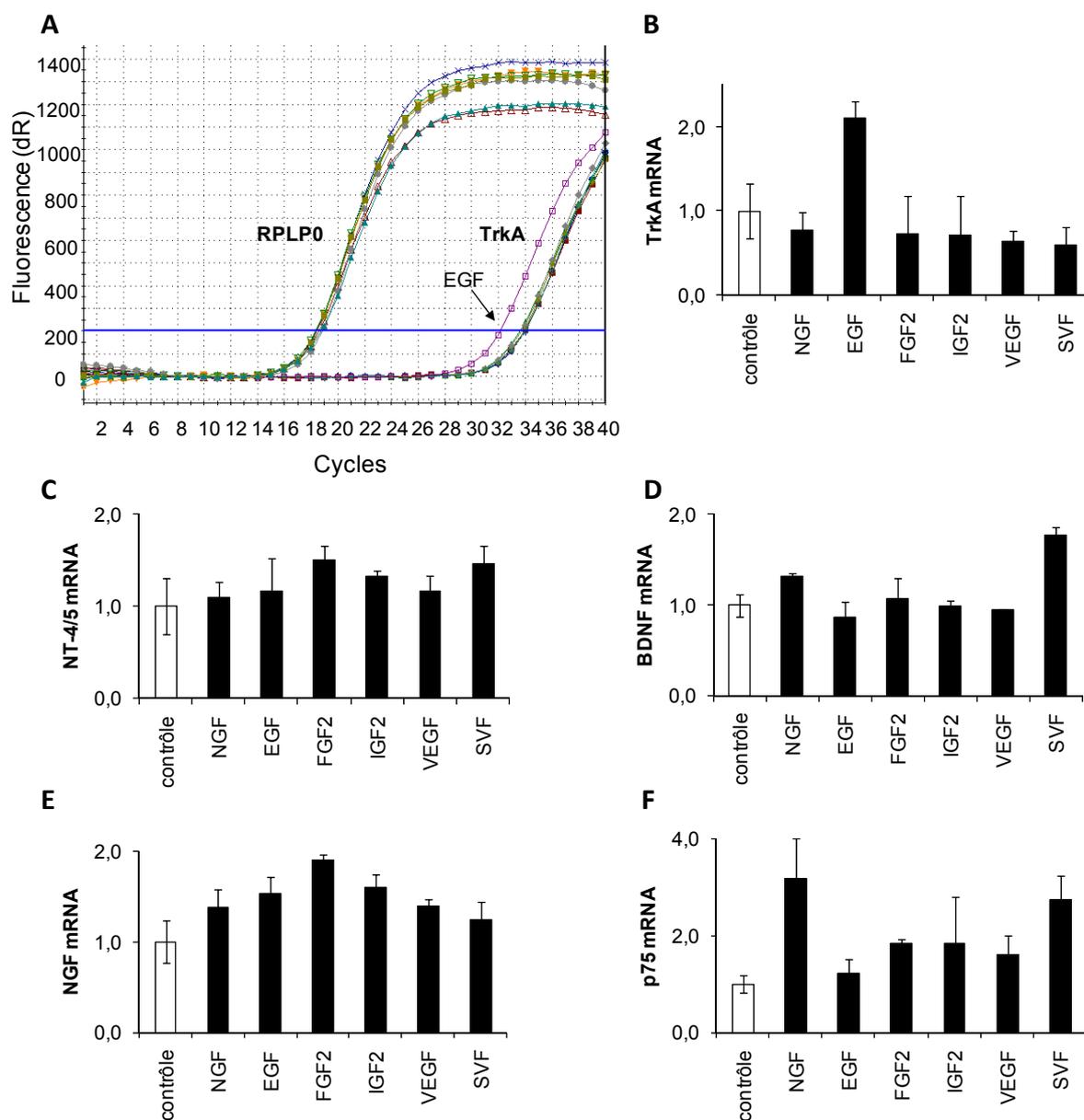


Figure 36. Effet de facteurs de croissance sur l'expression transcriptionnelle des neurotrophines dans les MDA-MB-231.

Les MDA-MB-231 sont soumises 24h à une stimulation par des facteurs de croissance (NGF, EGF, FGF2, IGF2, VEGF) et au SVF puis les variations potentielles de l'expression transcriptionnelle des neurotrophines NT-4/5, BDNF, NGF, et des récepteurs TrkA et p75^{NTR} sont étudiées en PCR en temps réel. La quantification relative de chaque gène est réalisée selon la méthode de Pfaffl et al avec comme gène de référence RPLP0. A, courbes d'amplification des gènes RPLP0 et TrkA dans les différentes conditions, notons le petit décalage d'amplification de TrkA après traitement à l'EGF (1 cycle). B, C, D, E, F, quantification relative de l'expression de TrkA, la NT-4/5, le BDNF, le NGF et p75^{NTR} (expériences réalisées 2 fois).

Résultats

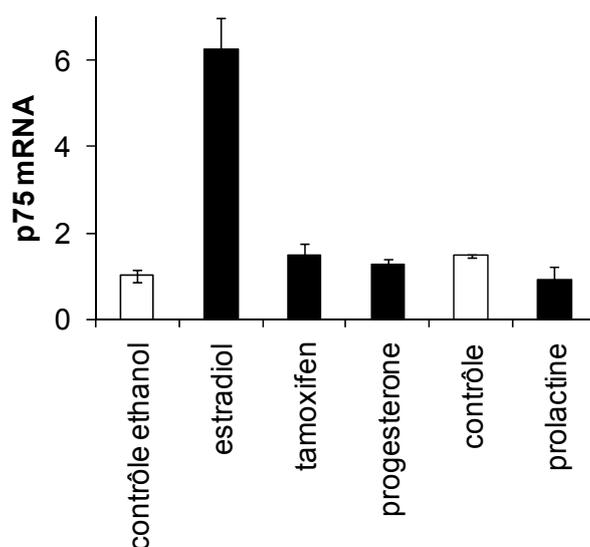


Figure 37. Effet de l'estradiol sur l'expression transcriptionnelle de p75^{NTR} dans les MCF-7.

Quantification relative de l'expression de p75^{NTR} par PCR en temps réel suite au traitement des MCF-7 par des hormones et le tamoxifen (les résultats sont la moyenne de 2 expériences individuelles).

CONCLUSION / DISCUSSION

Cette étude nous a permis de démontrer une régulation transcriptionnelle du récepteur aux neurotrophines p75^{NTR}. Cette régulation met en jeu la machinerie hormonale et notamment les œstrogènes et se traduit moléculairement soit par une augmentation de la transcription du gène, soit par une stabilisation de son ARNm. Nous n'avons par ailleurs pas pu déterminer de régulations significatives des neurotrophines suite à un traitement avec les facteurs de croissance NGF, EGF, IGF2, FGF2 et VEGF (caractérisés pour leur implication dans le cancer du sein).

Les œstrogènes sont des hormones impliquées à la fois dans le développement normal de la glande mammaire et dans la cancérisation par une stimulation de la prolifération des cellules malignes. De plus, la détection des récepteurs aux œstrogènes (ER) dans une tumeur du sein oriente le diagnostic et le choix d'une thérapie vers une hormonothérapie (si elle est ER+) type tamoxifen. Démontrer un lien entre ces hormones et les neurotrophines qui elles-mêmes contribuent à la carcinogenèse mammaire n'est donc pas vain. Ce lien a d'ores et déjà été établi dans un autre modèle cellulaire impliquant les neurotrophines c'est-à-dire le système nerveux (Amantea et al., 2005). Les neurotrophines et leurs récepteurs sont, en effet, régulés

Résultats

au niveau transcriptionnel par l'œstradiol dans différentes populations neuronales. Par exemple, les œstrogènes régulent négativement p75^{NTR} et positivement TrkA dans les ganglions des racines dorsales (DRG) (Sohrabji et al., 1994) ; augmentent la transcription du NGF et BDNF dans les neurones cholinergiques (Simpkins et al., 1997), celle du BDNF dans une pléthore de neurones (Sohrabji and Lewis, 2006) et celle de TrkB dans les neurones hypothalamiques (Carrer and Cambiasso, 2002). Il n'est donc pas surprenant d'observer une variation de l'expression transcriptionnelle de p75^{NTR} par les œstrogènes dans le sein, un organe lui-même régulé par cette hormone. De plus, il a été démontré dans un autre cancer dépendant des hormones stéroïdiennes une régulation de l'expression de p75^{NTR}. A l'image du sein et des œstrogènes, la prostate est sous l'influence d'autres androgènes comme la testostérone. De plus, dans ce cancer, p75^{NTR} est un suppresseur de tumeur dont l'expression est perdue avec la progression du cancer et l'acquisition de la résistance aux hormones. Il a été démontré clairement que l'expression de p75^{NTR} était maintenue à des niveaux élevés par la dehydrotestostérone (DHT) (Festuccia et al., 2007a).

En conclusion, les hormones stéroïdiennes, qui régulent la sensibilité neuronale et prostatique aux NT, pourraient être un médiateur de l'action des neurotrophines dans le cancer du sein par la modulation de l'expression de p75^{NTR}.

Travaux supplémentaires : Etude de l'expression des neurotrophines dans le modèle de transformation de Weinberg.

Comme décrit dans l'introduction au chapitre II. B. 2. c, Hanahan et Weinberg ont répertorié six altérations essentielles à la cancérisation d'une cellule : indépendance vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire ou du cycle cellulaire, insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, échappement à l'apoptose, potentiel réplicatif illimité, conversion angiogénique, invasion et métastase (Hanahan and Weinberg, 2000). Afin d'étudier ce processus de tumorigenèse, l'équipe de Weinberg a développé un système de cancérogenèse mammaire *in vitro* par l'ajout de 3 éléments génétiques définis à des cellules mammaires normales humaines (HMEC) ; les transgènes choisis mimant les perturbations caractéristiques des cancers et générant à partir de cellules normales à la fois des cellules immortalisées et des cellules transformées. Les transgènes utilisés sont la sous-unité catalytique de la télomérase humaine : hTERT, les antigènes T (LT, Large T) et t (st, small t) de la région proximale du virus SV40 : SV40ER et l'oncogène activé H-Ras : H-RasV12. La réactivation de la télomérase immortalise les cellules en leur conférant un potentiel réplicatif illimité (cellules appelées HME), LT inhibe la senescence par l'abrogation des suppresseurs de tumeurs p53 et pRb et st stabilise Myc en empêchant sa dégradation par le protéasome (cellules HMLE) enfin H-RasV12 permet la croissance sans ancrage des cellules et la formation de tumeur en souris nude (cellules HMLE-PR) (Elenbaas et al., 2001).

Nous disposons de ce modèle au sein du laboratoire, nous avons donc pu étudier dans le cadre de ma thèse l'expression transcriptionnelle des neurotrophines et de leurs récepteurs dans ce système *in vitro*.

MATERIEL ET METHODE

Les quatre lignées cellulaires HMEC, HME, HMLE et HMLE-PR ont été cultivées en milieu complet (MEBM, cambrex) puis les ARN ont été extraits (kit Macherey Nagel) rétrotranscrits en ADNc et l'expression des neurotrophines et récepteurs associés étudiée par PCR en temps réel (Mx4000, Strategène). Les étapes de rétrotranscription et les conditions de PCR en temps réel sont identiques à celles utilisées dans les articles n°1 (Adriaenssens et al.) et n°2 (Vanhecke et al.)

RESULTATS

La figure 38 présente les quantifications relatives des gènes exprimés dans ce modèle comparativement au gène de référence RPLP0. Des variations d'expression notables de l'expression de la NT-4/5, du BDNF et de $p75^{NTR}$ (mais pas du NGF) apparaissent dans les cellules transformées (HMLE-PR). L'expression de TrkA, quant à elle, augmente progressivement avec l'ajout des transgènes.

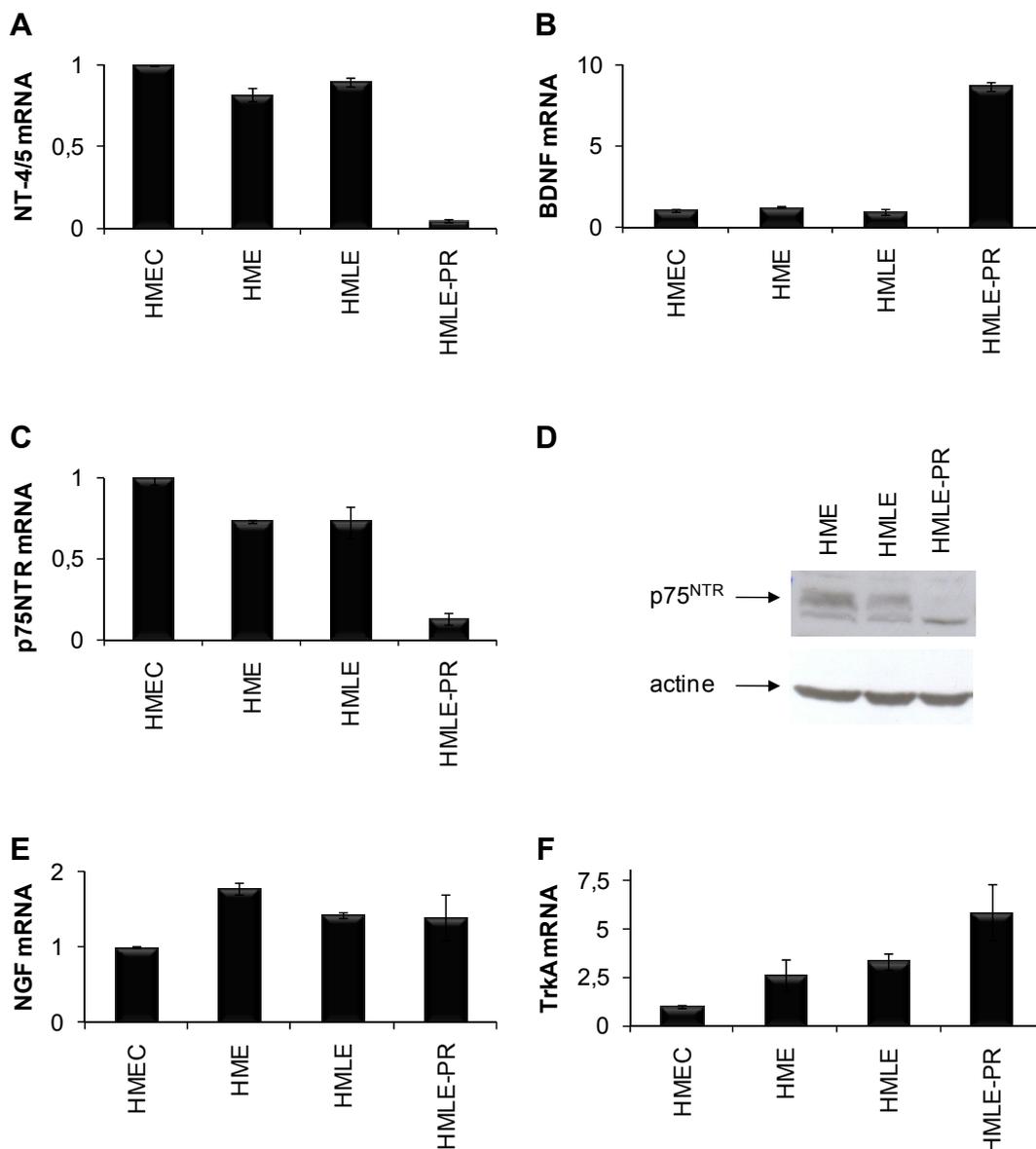


Figure 38. Expression des neurotrophines et de leurs récepteurs dans le modèle *in vitro* de Weinberg. Quantification relative de l'expression des ARNm de la NT-4/5 (A), du BDNF (B), de $p75^{NTR}$ (C), du NGF (E) et de TrkA (F) dans les cellules mammaires normales HMEC, immortalisées HME et HMLE et transformées HMLE-PR. Expression de la protéine $p75^{NTR}$ dans les HME, HMLE et HMLE-PR (D). Expériences réalisées 2 fois.

CONCLUSION / DISCUSSION

Le modèle de Weinberg représente l'un des rares modèles *in vitro* de la cancérogenèse, c'est-à-dire qu'il permet de convertir de manière contrôlée une cellule normale en une cellule cancéreuse. Celle-ci est capable de proliférer sans ancrage et de former des tumeurs chez l'animal. Les auteurs précisent toutefois que l'étape de transformation par RasV12 n'est pas associée à la formation de métastases et que les tumeurs sont faiblement différenciées.

Les variations transcriptionnelles de la NT-4/5, du BDNF et de p75^{NTR} sont associées à la transformation cellulaire. Ces résultats documentent la place de p75^{NTR} et l'action des neurotrophines sur la modification des cellules de sein une fois transformées et cancéreuses. Cela suggère que p75^{NTR} et la signalisation des neurotrophines pourraient jouer un rôle dans le développement tumoral mammaire. De plus, l'expression de l'ARNm de TrkA augmente graduellement dans les 4 lignées suggérant une implication de TrkA dans la sénescence d'une part et dans la transformation d'autre part. Cette donnée va dans le même sens que nos précédentes observations sur l'expression de TrkA où nous montrions qu'il était surexprimé dans les biopsies tumorales de 10 à 140 fois comparativement aux biopsies normales. Cette surexpression stimule la croissance, la migration et l'invasion *in vitro* et contribue au développement tumoral *in vivo* (article n°3, Lagadec et al.). Ainsi, nos résultats dans ce modèle de tumorigenèse nous renseignent sur une possible variation de la sensibilité au NGF des cellules mammaires *via* ses 2 récepteurs TrkA et p75^{NTR} en fonction de leur transformation et soutiennent la première conclusion sur un rôle des neurotrophines dans le développement tumoral mammaire.

Chapitre 3 : Discussion et perspectives

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de mieux comprendre l'implication de la famille des neurotrophines dans la cancérogenèse mammaire. Aussi, la discussion débute par une synthèse globale de l'expression et des effets protumoraux des neurotrophines dans le cancer du sein. Nous verrons ensuite l'intérêt de cibler les neurotrophines ou leurs récepteurs pour l'élaboration d'une thérapie anticancéreuse. Enfin, nous nous proposons de discuter des neurotrophines comme le point de convergence entre innervation et cancérogenèse mammaire.

Discussion et perspectives

1. Expression et effets biologiques des neurotrophines dans le cancer du sein

Des travaux antérieurs à ma thèse indiquaient que le NGF est un facteur anti-apoptotique et mitogène dans le cancer du sein *via* l'activation de ses récepteurs membranaires p75^{NTR} et TrkA (Descamps et al., 1998; Descamps et al., 2001b). De plus, le NGF agirait dans le cancer du sein selon une boucle d'activation autocrine (Dolle et al., 2003).

Nous apportons dans ce travail la preuve définitive qu'en modèle préclinique, le NGF contribue à la croissance tumorale. De plus, le NGF est exprimé de façon ubiquitaire par les tumeurs et posséderait, en conséquence, un effet dans de nombreux types et stades de cancer du sein. De ce fait, le NGF peut être présenté comme une molécule cible pour une thérapie anticancéreuse plus universelle que des drogues aujourd'hui utilisées en traitement (comme l'Herceptine, utilisée seulement dans 20% des cancers du sein (Vogel and Franco, 2003)).

Au vue des résultats obtenus avec le NGF, il était intéressant d'étendre l'étude aux autres neurotrophines. Nous avons mis en évidence pour la première fois que le BDNF et la NT-4/5 sont exprimés et sécrétés par différentes lignées de cellules de cancer du sein, alors que la NT-3 n'est que faiblement détectée. De plus, leur expression dans des tumeurs mammaires est spécifiquement localisée dans les cellules épithéliales. Nous pouvons en déduire que le NGF, le BDNF et la NT-4/5 sont les trois neurotrophines majoritaires exprimées dans le cancer du sein. Cependant, alors que le NGF n'est pas exprimé par les cellules normales de sein, nous montrons que le BDNF et la NT-4/5 y sont détectés et, par conséquent, ne peuvent être présentés comme des marqueurs diagnostiques du cancer du sein. De plus, nous avons montré par immunohistochimie que le NGF, le BDNF et la NT-4/5 semblent plus exprimés dans les tissus mammaires cancéreux comparativement aux tissus sains. Il est largement admis que la surexpression de facteurs de croissance contribue à la carcinogenèse, le BDNF est par exemple surexprimé dans le neuroblastome et entraîne un comportement agressif des cellules cancéreuses (Aoyama et al., 2001). Ces surexpressions peuvent être dues à des modifications génétiques (amplification génique ou modifications épigénétiques), des régulations transcriptionnelles (régulation positive ou stabilisation de l'ARNm) ou traductionnelles (stabilisation de la protéine, maturation de la protéine). D'après les résultats que nous avons obtenus, il semble que le mécanisme mis en jeu par les cellules de cancer du sein pour surexprimer le NGF et les neurotrophines BDNF et NT-4/5 soit différent.

Discussion et perspectives

Dans le cas du NGF, l'absence de transcrite dans les cellules mammaires normales de sein (Dolle et al., 2003) indique que l'expression du NGF dans les cellules cancéreuses serait due à une activation transcriptionnelle. Bien que les altérations du chromosome 1, où se situe le NGF, présentent des anomalies les plus régulièrement observées dans le cancer du sein (Bieche et al., 1993; Bieche et al., 1999; Hainsworth et al., 1992), une étude réalisée au laboratoire n'a pas montré d'amplification génique ni de mutation du gène du NGF ou de son promoteur. Des modifications épigénétiques sont corrélées à une modification de l'expression de facteurs de croissance dans le cancer et pourraient alors expliquer la surexpression du NGF. Le cas de l'IGF2 est certainement l'un des plus documentés, il résulte de la perte de l'empreinte génomique une augmentation de son expression dans bon nombre de cancers (Chao and D'Amore, 2008). Il serait donc intéressant de déterminer si le promoteur du NGF subit des modifications épigénétiques (modification de la méthylation par exemple) au cours de la cancérisation mammaire. A ce stade, nous ne pouvons exclure un effet indirect modulant l'activation transcriptionnelle du NGF. Il se peut que des dérégulations de voies de signalisation aboutissent à la fixation de facteurs de transcription sur le promoteur du NGF. Cependant, peu d'éléments relatifs au promoteur du NGF sont décrits, il serait donc intéressant d'élargir l'étude de son promoteur à l'identification de sites consensus de fixation de facteurs de transcription, puis à l'analyse de leur transactivation.

Contrairement au NGF, les transcrits du BDNF et de la NT-4/5 sont détectés dans les cellules normales de sein. Il se pourrait donc que la surexpression protéique du BDNF et de la NT-4/5 soit due à des événements traductionnels ou post-traductionnels. Or, il semble qu'un différentiel de maturation des neurotrophines BDNF et NT-4/5 existe entre les cellules normales et les cellules cancéreuses de sein. Nous avons observé par Western-blot que des bandes de poids moléculaire 40-50 kDa, pouvant correspondre aux précurseurs protéiques des neurotrophines, sont plus importantes dans les cellules normales alors que les formes matures à 14kDa sont plus importantes dans les cellules cancéreuses. Les neurotrophines sont produites suite au clivage d'un précurseur protéique par des enzymes intracellulaires (la furine ou des proconvertases) ou extracellulaires (la plasmine et certaines métalloprotéases comme les MMP-3 et MMP-7). L'expression de ces enzymes représente un point clé dans la régulation de la maturation et donc de l'expression des neurotrophines (Schweigreiter, 2006). Il serait intéressant de tester le différentiel d'expression et d'activation de ces enzymes dans les cellules normales vs cellules cancéreuses de sein afin de valider l'hypothèse d'une maturation différentielle des neurotrophines entre cellules normales et cellules cancéreuses de sein.

Discussion et perspectives

En ce qui concerne le récepteur commun aux neurotrophines $p75^{\text{NTR}}$, nous confirmons son expression dans les cellules de cancer du sein. Par conséquent, $p75^{\text{NTR}}$ peut être activé dans les cellules mammaires cancéreuses par le NGF, le BDNF et la NT-4/5. Concernant les récepteurs tyrosine kinase, nous montrons que, TrkB et TrkC n'étant pas détectés, seul TrkA est exprimé dans le cancer du sein. Nous pouvons déduire de cette étude descriptive que les axes BDNF/TrkB, NT-4/5/TrkB et NT-3/TrkC ne peuvent être activés dans les cellules de cancer du sein contrairement à l'axe NGF/TrkA déjà connu.

Les récepteurs Trk sont décrits en dehors du système nerveux pour être exprimés majoritairement sous forme tronquée de leur domaine kinasique (Sariola, 2001). Puisque le BDNF et la NT-4/5 sont produits par les cellules de cancer du sein, nous avons recherché les récepteurs tronqués correspondant, c'est-à-dire TrkB-T1 et TrkB-T-shc (Middlemas et al., 1991; Stoilov et al., 2002). De manière intéressante, alors que le récepteur pleine longueur n'est pas détecté, nous montrons que TrkB-T1 est exprimé dans toutes les lignées de cellules cancéreuses et dans toutes les biopsies tumorales mammaires testées. Le deuxième isoforme TrkB-T-shc n'est pas exprimé dans les cellules cancéreuses mammaires testées, ces résultats préliminaires vont dans le sens d'une expression limitée au système nerveux (Stoilov et al., 2002).

En conclusion, nous démontrons pour la première fois que seuls les récepteurs du BDNF et de la NT-4/5 dépourvus de domaine intracellulaire catalytique c'est-à-dire $p75^{\text{NTR}}$ et TrkB-T1 sont exprimés et peuvent être activés dans le cancer du sein.

Les cellules normales de sein expriment les mêmes récepteurs à savoir $p75^{\text{NTR}}$, TrkA et TrkB-T1. Toutefois, dans le cas de NGF, nous avons montré que l'ajout exogène du facteur de croissance sur les cellules normales était sans effet malgré la présence de ses 2 classes de récepteurs (Descamps et al., 1998) (les expérimentations concernant l'effet du BDNF et de la NT-4/5 sur les cellules normales sont quant à elles en cours). Ainsi, l'expression des neurotrophines dans les cellules cancéreuses s'accompagne d'une sensibilité de ces cellules à ces facteurs de croissance.

Il est connu que la stimulation exogène des cellules de cancer du sein par les neurotrophines entraîne une résistance à l'apoptose (Descamps et al., 2001b). Une étude plus approfondie de l'effet du NGF a précisé que son action anti-apoptotique dans les cellules de cancer du sein était orchestrée par le récepteur $p75^{\text{NTR}}$, le recrutement de l'adaptateur TRADD, et l'induction de la voie NF κ B (Descamps et al., 2001b; El Yazidi-Belkoura et al., 2003; Naderi et al.,

Discussion et perspectives

2007). Nous montrons ici que la sécrétion du BDNF et de la NT-4/5 confère aux cellules de cancer du sein une résistance à l'apoptose par l'activation du récepteur p75^{NTR}. Ainsi, le NGF, le BDNF et la NT-4/5 sont des facteurs de survie pour les cellules de cancer du sein *via* l'activation de p75^{NTR}. Il serait maintenant intéressant de déterminer si les voies de signalisation induites par les différentes neurotrophines sont les mêmes, en particulier si TRADD et NFκB sont recrutés et activés par p75^{NTR} après la fixation du BDNF et de la NT-4/5. Notre étude a également révélé la présence du récepteur TrkB-T1 dans les cellules de cancer du sein. TrkB-T1 garde la capacité à fixer les neurotrophines BDNF et NT-4/5, cependant nous n'avons pas déterminé son rôle dans le cancer du sein. Il est possible que TrkB-T1 ait une signalisation propre ou puisse se dimériser avec p75^{NTR} pour modifier sa signalisation. Nous pouvons alors envisager une étude de coimmunoprécipitation de TrkB-T1 et de p75^{NTR} associée à une étude phénotypique des cellules de cancer du sein. Une invalidation de l'expression de TrkB-T1 (associée ou non à celle de p75^{NTR}) par des siRNA semble appropriée afin de déterminer son implication dans des effets protumoraux et notamment l'effet de survie du BDNF et de la NT-4/5.

Dans le cancer du sein, le NGF est aussi un facteur mitogène par l'activation de son récepteur TrkA et la voie des MAPK (Descamps et al., 2001b). Les lignées cellulaires de cancer du sein couramment utilisées en recherche expriment peu TrkA en comparaison des échantillons tumoraux, c'est pourquoi un modèle cellulaire le surexprimant a été établi au laboratoire. Cette surexpression de TrkA stimule la croissance, mais aussi la migration et l'invasion des cellules de cancer du sein (article 3, Lagadec et al.). Notre étude n'a pas mis en évidence d'effet sur la prolifération ou la migration induit par le BDNF ou la NT-4/5, confirmant la non implication de leur récepteur TrkB. Ces observations expliquent certainement les différences de résultats obtenus lors de la neutralisation de l'activité du NGF *vs* BDNF ou NT-4/5 *in vivo*. En effet, les tumeurs traitées avec un anticorps anti NGF sont moins volumineuses que celles traitées avec des anticorps bloquant le BDNF ou la NT-4/5, malgré un plus grand nombre de cellules cancéreuses de sein injectées dans les souris (article 1 : Adriaenssens et al, 2008 et article 2 : Vanhecke et al). De plus, les tumeurs traitées par un inhibiteur pharmacologique de TrkA ne se développent que très peu. Ainsi, l'effet protumoral du NGF est engendré par l'activation de ses 2 récepteurs TrkA et p75^{NTR} et l'effet protumoral du BDNF et de la NT-4/5 est induit par p75^{NTR}. Ces résultats suggèrent que les neurotrophines sont impliquées dans la cancérogenèse mammaire à des degrés différents. Il serait intéressant de savoir si en conditions physiologiques, les neurotrophines présentent un effet additif ou synergique afin de

Discussion et perspectives

déterminer la meilleure stratégie d'inhibition à adopter en vue d'un traitement. Nous avons testé cette hypothèse par un ajout exogène des neurotrophines, seules ou en combinaison, et observé la survie des cellules de cancer du sein. Nos résultats n'ont pas montré de différences entre les conditions mais il est possible que tous les sites de liaison aux récepteurs soient saturés par la supplémentation exogène. Pour rester dans des conditions physiologiques, il est nécessaire d'invalider chaque neurotrophine individuellement ou en combinaison et de réaliser ensuite des tests phénotypiques sur les cellules de cancer du sein.

Par ailleurs, nous avons montré que le récepteur p75^{NTR} est régulé positivement par les œstrogènes alors que l'expression de TrkA ne varie pas suite aux traitements par des facteurs de croissance ou des hormones. Ce résultat suggère que l'expression de p75^{NTR} est sensible à des signaux régulateurs agissant dans des phases précoces de cancérisation. Nous avons également montré dans le modèle de Weinberg que l'expression de TrkA augmentait progressivement entre les cellules normales, immortalisées et transformées. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Davidson qui démontrent que l'activation de TrkA (p-TrkA) est plus importante dans les effusions pleurales que dans les tumeurs mammaires primaires suggérant son implication dans la progression du cancer du sein. En revanche, le récepteur p75^{NTR} est moins fréquemment détecté dans les effusions pleurales comparativement aux tumeurs primaires (Davidson et al., 2004). L'ensemble de ces données nous laisse penser que l'activation autocrine du récepteur p75^{NTR} par les neurotrophines aurait lieu dans des phases précoces de cancérisation conférant un avantage de survie aux cellules cancéreuses de sein, puis l'axe NGF/TrkA serait impliqué dans une progression rapide de cette maladie par la stimulation de la prolifération et de la migration.

Toutefois, le BDNF et la NT-4/5 sont, comme le NGF, détectés dans tous les types de biopsies tumorales mammaires testés de stades cancéreux différents. Les tumeurs sont des tissus hétérogènes constitués d'une pléiotropie de type cellulaire (cellules endothéliales, immunitaires, fibroblastes...) proliférant au sein de la tumeur. Ce microenvironnement est démontré pour être essentiel à la cancérisation et la progression tumorale (Gatenby and Gillies, 2008). Les neurotrophines et notamment le NGF et le BDNF sont connues pour être exprimées par les cellules endothéliales ou immunitaires (Bayas et al., 2003; Cantarella et al., 2002; Kerschensteiner et al., 1999; Ricci et al., 2000) et pour leur implication dans d'autres phénomènes biologiques tels que l'angiogenèse (Kermani and Hempstead, 2007; Nico et al., 2008). Dans ce contexte, nous pouvons supposer que leur sécrétion par les cellules de cancer du sein stimulerait de façon paracrine les cellules du microenvironnement tumoral, et pourrait accroître le potentiel protumoral des neurotrophines dans le cancer du sein.

Discussion et perspectives

En conclusion, sont reportés schématiquement sur la figure suivante, les résultats découlant des travaux de ma thèse et du laboratoire, et montrant l'effet autocrine du NGF, du BDNF et de la NT-4/5 dans les cellules de cancer du sein.

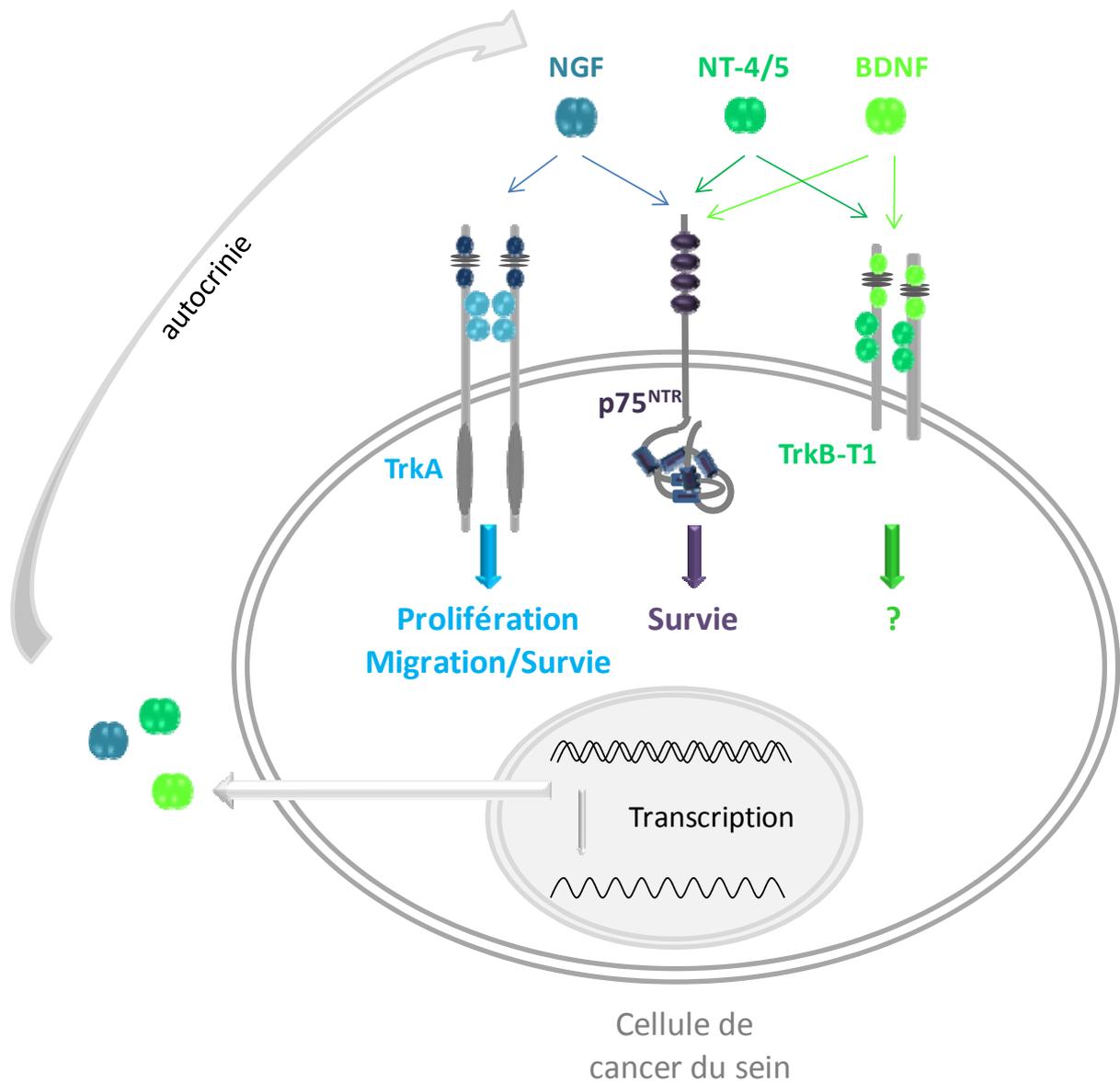


Figure 39. Expression et effets biologiques des neurotrophines dans les cellules de cancer du sein.

2. Intérêt des neurotrophines en traitement du cancer du sein

Les thérapies actuelles sont agressives (chimiothérapies, radiothérapies, chirurgie) ou restreintes à une faible proportion de malades exprimant des cibles moléculaires (hormonothérapie, herceptine...). De plus, les cellules cancéreuses peuvent développer des résistances à ces traitements limitant encore leur utilisation. Un des grands défis de la recherche contre le cancer est la mise au point de thérapies alternatives fondées sur des bases moléculaires validées. Dans ce contexte, cibler les neurotrophines et leurs signalisations représente une voie encourageante pour un traitement innovant du cancer du sein.

A l'image de l'herceptine, on pourrait imaginer développer un anticorps neutralisant les sites de liaison conservés des neurotrophines au récepteur p75^{NTR}. Cet anticorps bloquant permettrait d'inhiber la voie de survie activées par les neurotrophines. D'après nos résultats, l'inhibition spécifique de p75^{NTR} par des siRNA associée à l'apoptogène TRAIL entraînent une mort par apoptose des cellules de cancer du sein, supérieure à celle obtenue avec TRAIL seul (article 2 : Vanhecke et al.). Combiner un traitement anti p75^{NTR} à TRAIL pourrait être envisageable. En effet, TRAIL suscite un certain enthousiasme chez les oncologues puisque cette cytokine est capable d'induire sélectivement la mort des cellules tumorales sans affecter les cellules normales (LeBlanc and Ashkenazi, 2003). Des perspectives cliniques le concernant sont d'ailleurs fortement envisagées. TRAIL est actuellement en essai clinique de phase I alors que des anticorps humanisés agonistes de ses récepteurs DR4 et DR5 ont été testés en phase I et II (Huang and Sheikh, 2007). Nos données suggèrent donc qu'une inhibition de p75^{NTR} potentialiserait l'effet d'une drogue anticancéreuse apoptogénique. Il est clair que ces résultats sont très préliminaires au vue de l'importance des conclusions qu'ils entraînent. Une étude plus approfondie à l'aide de divers apoptogènes et d'un échantillonnage plus grand de cellules de cancer du sein est nécessaire *in vitro*, tout comme une validation *in vivo*.

De façon complémentaire, le ciblage de l'axe NGF/TrkA pourrait limiter la progression du cancer du sein. De nouvelles thérapies sont désormais développées visant à éteindre la signalisation des RTK (récepteurs tyrosine kinase) notamment dans le cancer du sein (Wakeling, 2005). Un composé ciblant les Trk, le CEP-701 (un analogue du k252a) est actuellement testé dans le cancer du pancréas et de la prostate (Chan et al., 2008; Collins et al., 2007).

3. Convergences entre Innervation et Cancérogenèse mammaire.

L'implication des neurotrophines dans le développement et le maintien du système nerveux laisse supposer qu'en cas de dérégulation de leur expression, elles pourraient avoir un rôle neurotrophique à l'extérieur du système nerveux. C'est ainsi qu'un concept d'innervation du cancer a vu le jour.

- La néoneurogenèse

L'implantation d'un petit fragment d'une tumeur de souris dans un embryon de poulet entraîne l'invasion de fibres sensorielles dans la tumeur et une hyperinnervation des organes internes. Ces observations de Rita Levi-Montalcini datent de 1949 et ont été les prémices de la découverte du NGF. Le lien entre les neurotrophines et la cancérogenèse n'est donc pas nouveau. Néanmoins, l'idée selon laquelle les tumeurs initieraient leur propre innervation favorisant la migration et la formation de métastases est récente. Cette idée est née de divers constats épars et collectés à partir de différents cancers. D'abord, des tumeurs sont souvent innervées (Lu et al., 2003; Seifert et al., 2002; Seifert and Spitznas, 2002) et sécrètent leurs propres facteurs neurogéniques (Dolle et al., 2003; Esseghir et al., 2007; Geldof et al., 1998; Ricci et al., 2000; Truzzi et al., 2008). De plus, dans le cas du cancer du pancréas, l'expression des neurotrophines par les cellules cancéreuses est corrélée à une innervation tissulaire et à une sensibilité à la douleur (Schneider et al., 2001; Zhu et al., 1999). Ensuite, la détection de marqueurs de cellules nerveuses dans les tumeurs est corrélée à un mauvais pronostic (Grabowski et al., 2001). Enfin, les tumeurs initient fréquemment le développement de vaisseaux sanguins ou lymphatiques par la libération de facteurs spécifiques comme le VEGF, ces vaisseaux favorisant la formation de métastases. Rappelons, par ailleurs, que les neurotrophines sont également décrites comme des facteurs angiogéniques (Kermani and Hempstead, 2007; Nico et al., 2008). Ainsi des tumeurs seraient potentiellement capables de stimuler leur propre innervation dans un processus similaire à l'angiogenèse et la lymphangiogenèse, ce processus est appelé par analogie, la néoneurogenèse (Entschladen et al., 2008).

Dans le cas du cancer du sein, les seules données disponibles concernent l'effet stimulateur de neurotransmetteurs (met-enkephaline, substance P, bombésine, dopamine, norepinephrine, histamine) sur la prolifération et/ou la migration de cellules de cancer du sein (Drell et al., 2003; Medina et al., 2008). Or, les conséquences d'une hyperinnervation tumorale seraient

Discussion et perspectives

une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses d'une part et une augmentation des métastases formées d'autre part. Ces effets seraient dus au relargage de neurotransmetteurs (norepinéphrine, dopamine, substance P...) agissant directement sur les cellules cancéreuses (Entschladen et al., 2004). Le sein étant un organe innervé, il serait intéressant de déterminer si les neurotrophines libérées par les cellules cancéreuses provoquent une hyperinnervation et le relargage de neurotransmetteurs responsables d'une progression du cancer.

- Les cellules souches cancéreuses

Le deuxième lien entre le système nerveux et la cancérogenèse mammaire vient de la découverte des cellules souches cancéreuses. Ces cellules, multipotentes et indifférenciées, sont proches des cellules de stade embryonnaire. Les rôles joués par les neurotrophines à la fois dans le développement embryonnaire du système nerveux et le cancer du sein nous laissent supposer qu'elles pourraient également agir sur les cellules souches cancéreuses mammaires. Les cellules souches de cancer du sein putatives résideraient dans une population $CD44^+/CD24^{low}$ (Al-Hajj et al., 2003) qu'il est possible de sélectionner par FACS notamment à partir d'effusions pleurales (Bauerschmitz et al., 2008). On pourrait imaginer étudier le rôle des neurotrophines dans ces cellules, en particulier en mesurant la modulation des capacités tumorigéniques des cellules souches cancéreuses mammaires.

En conclusion, mon travail de thèse apporte de nouvelles données sur les neurotrophines et leur rôle protumoral dans la cancérogenèse mammaire. Il ouvre de nombreuses perspectives et nous pouvons proposer d'orienter les recherches futures selon les axes suivant : (i) préciser le rôle de chaque NT dans le cancer du sein, existe-t-il une potentialisation, une synergie ou une gradation de leurs effets ? Quelle est l'implication de chaque NT dans la progression du cancer ? Quel est le rôle de TrkB-T1 ? ; (ii) étudier l'intérêt de cibler les NT en traitement du cancer du sein, existe-t-il une potentialisation de l'effet de drogues apoptogéniques par l'inhibition de la survie cellulaire induite par les NT ? ; (iii) étudier le rôle paracrine des neurotrophines sur les cellules du microenvironnement et dans les processus d'angiogenèse, de lymphangiogenèse et de néoneurogenèse ; (iiii) enfin, étudier l'effet des neurotrophines sur les cellules souches cancéreuses de sein.

Discussion et perspectives

Bibliographie

Bibliographie

Bibliographie

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.

Allendoerfer, K. L., Cabelli, R. J., Escandon, E., Kaplan, D. R., Nikolics, K. and Shatz, C. J. (1994). Regulation of neurotrophin receptors during the maturation of the mammalian visual system. *J Neurosci* **14**, 1795-811.

Allinen, M., Beroukhi, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A. et al. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* **6**, 17-32.

Amantea, D., Russo, R., Bagetta, G. and Corasaniti, M. T. (2005). From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res* **52**, 119-32.

Antoniou, A. C., Spurdle, A. B., Sinilnikova, O. M., Healey, S., Pooley, K. A., Schmutzler, R. K., Versmold, B., Engel, C., Meindl, A., Arnold, N. et al. (2008). Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* **82**, 937-48.

Aoyama, M., Asai, K., Shishikura, T., Kawamoto, T., Miyachi, T., Yokoi, T., Togari, H., Wada, Y., Kato, T. and Nakagawara, A. (2001). Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett* **164**, 51-60.

Aragona, M., Panetta, S., Silipigni, A. M., Romeo, D. L., Pastura, G., Mesiti, M., Cascinu, S. and La Torre, F. (2001). Nerve growth factor receptor immunoreactivity in breast cancer patients. *Cancer Invest* **19**, 692-7.

Arakawa, T., Haniu, M., Narhi, L. O., Miller, J. A., Talvenheimo, J., Philo, J. S., Chute, H. T., Matheson, C., Carnahan, J., Louis, J. C. et al. (1994). Formation of heterodimers from three neurotrophins, nerve growth factor, neurotrophin-3, and brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* **269**, 27833-9.

Arevalo, J. C., Conde, B., Hempstead, B. L., Chao, M. V., Martin-Zanca, D. and Perez, P. (2000). TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* **20**, 5908-16.

Arevalo, J. C., Waite, J., Rajagopal, R., Beyna, M., Chen, Z. Y., Lee, F. S. and Chao, M. V. (2006). Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron* **50**, 549-59.

Arevalo, J. C., Yano, H., Teng, K. K. and Chao, M. V. (2004). A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *Embo J* **23**, 2358-68.

Argani, P., Fritsch, M., Kadkol, S. S., Schuster, A., Beckwith, J. B. and Perlman, E. J. (2000). Detection of the ETV6-NTRK3 chimeric RNA of infantile fibrosarcoma/cellular

Bibliographie

congenital mesoblastic nephroma in paraffin-embedded tissue: application to challenging pediatric renal stromal tumors. *Mod Pathol* **13**, 29-36.

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

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.

Bachelder, R. E., Wendt, M. A. and Mercurio, A. M. (2002). Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res* **62**, 7203-6.

Banfield, M. J., Naylor, R. L., Robertson, A. G., Allen, S. J., Dawbarn, D. and Brady, R. L. (2001). Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5. *Structure* **9**, 1191-9.

Barde, Y. A., Edgar, D. and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* **1**, 549-53.

Bardelli, A., Parsons, D. W., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Saha, S., Markowitz, S., Willson, J. K., Parmigiani, G., Kinzler, K. W. et al. (2003). Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* **300**, 949.

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., 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., 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.

Bauerschmitz, G. J., Ranki, T., Kangasniemi, L., Ribacka, C., Eriksson, M., Porten, M., Herrmann, I., Ristimaki, A., Virkkunen, P., Tarkkanen, M. et al. (2008). Tissue-specific promoters active in CD44+CD24-/low breast cancer cells. *Cancer Res* **68**, 5533-9.

Bayas, A., Kruse, N., Moriabadi, N. F., Weber, F., Hummel, V., Wohleben, G., Gold, R., Toyka, K. V. and Rieckmann, P. (2003). Modulation of cytokine mRNA expression by brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells. *Neurosci Lett* **335**, 155-8.

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.

Bibliographie

Berninger, B., Garcia, D. E., Inagaki, N., Hahnel, C. and Lindholm, D. (1993). BDNF and NT-3 induce intracellular Ca²⁺ elevation in hippocampal neurones. *Neuroreport* **4**, 1303-6.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-6.

Bibel, M., Hoppe, E. and Barde, Y. A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *Embo J* **18**, 616-22.

Bieche, I., Champeme, M. H., Matifas, F., Cropp, C. S., Callahan, R. and Lidereau, R. (1993). Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. *Cancer Res* **53**, 1990-4.

Bieche, I., Khodja, A. and Lidereau, R. (1999). Deletion mapping of chromosomal region 1p32-pter in primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **24**, 255-63.

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

Biffo, S., Offenhauser, N., Carter, B. D. and Barde, Y. A. (1995). Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* **121**, 2461-70.

Bilderback, T. R., Gazula, V. R., Lisanti, M. P. and Dobrowsky, R. T. (1999). Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem* **274**, 257-63.

Bilderback, T. R., Grigsby, R. J. and Dobrowsky, R. T. (1997). Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae. *J Biol Chem* **272**, 10922-7.

Bissell, M. J. and Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* **1**, 46-54.

Blagosklonny, M. V. (2002). Oncogenic resistance to growth-limiting conditions. *Nat Rev Cancer* **2**, 221-5.

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.

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

Boeshore, K. L., Luckey, C. N., Zigmond, R. E. and Large, T. H. (1999). TrkB isoforms with distinct neurotrophin specificities are expressed in predominantly nonoverlapping populations of avian dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* **19**, 4739-47.

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

Bibliographie

Bourhis, X. L., Toillon, R. A., Boilly, B. and Hondermarck, H. (2000). Autocrine and paracrine growth inhibitors of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **60**, 251-8.

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., Tcherpakov, M., Williams, I. M., Futerman, A. H. and Fainzilber, M. (2002). Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* **277**, 9812-8.

Bresnahan, P. A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H. L., Brake, A. J., Barr, P. J. and Thomas, G. (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol* **111**, 2851-9.

Bronfman, F. C. (2007). Metalloproteases and gamma-secretase: new membrane partners regulating p75 neurotrophin receptor signaling? *J Neurochem* **103 Suppl 1**, 91-100.

Bronfman, F. C. and Fainzilber, M. (2004). Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep* **5**, 867-71.

Bronzetti, E., Artico, M., Forte, F., Pagliarella, G., Felici, L. M., D'Ambrosio, A., Vespasiani, G. and Bronzetti, B. (2008). A possible role of BDNF in prostate cancer detection. *Oncol Rep* **19**, 969-74.

Brunet, A., Datta, S. R. and Greenberg, M. E. (2001). Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 297-305.

Buck, M. (2008). A novel domain of BRCA1 interacts with p53 in breast cancer cells. *Cancer Lett.*

Caldon, C. E., Daly, R. J., Sutherland, R. L. and Musgrove, E. A. (2006). Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem* **97**, 261-74.

Campos, X., Munoz, Y., Selman, A., Yazigi, R., Moyano, L., Weinstein-Oppenheimer, C., Lara, H. E. and Romero, C. (2007). Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **104**, 168-75.

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

Carrer, H. F. and Cambiasso, M. J. (2002). Sexual differentiation of the brain: genes, estrogen, and neurotrophic factors. *Cell Mol Neurobiol* **22**, 479-500.

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.

Bibliographie

Chan, E., Mulkerin, D., Rothenberg, M., Holen, K. D., Lockhart, A. C., Thomas, J. and Berlin, J. (2008). A phase I trial of CEP-701 + gemcitabine in patients with advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Invest New Drugs* **26**, 241-7.

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, K., Elledge, S. J. and Hannon, G. J. (2006). Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries. *Nat Methods* **3**, 707-14.

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.

Chao, W. and D'Amore, P. A. (2008). IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 111-20.

Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Monville, F., Fekairi, S., Jacquemier, J., Birnbaum, D. and Bertucci, F. (2005). How to best classify breast cancer: conventional and novel classifications (review). *Int J Oncol* **27**, 1307-13.

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

Chiarenza, A., Lazarovici, P., Lempereur, L., Cantarella, G., Bianchi, A. and Bernardini, R. (2001). Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* **61**, 3002-8.

Chittka, A., Arevalo, J. C., Rodriguez-Guzman, M., Perez, P., Chao, M. V. and Sendtner, M. (2004). The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J Cell Biol* **164**, 985-96.

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.

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.

Cochin, S., Chaleur, C., Trombert, B. and Seffert, P. (2008). [Treatment of breast cancer between 1985 and 2005 at Saint-Etienne University Hospital: contribution of mammography screening. Retrospective study of 473 patients]. *Gynecol Obstet Fertil* **36**, 151-8.

Cohen, S., Levi-Montalcini, R. and Hamburger, V. (1954). A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**, 1014-8.

Bibliographie

Collins, C., Carducci, M. A., Eisenberger, M. A., Isaacs, J. T., Partin, A. W., Pili, R., Sinibaldi, V. J., Walczak, J. S. and Denmeade, S. R. (2007). Preclinical and clinical studies with the multi-kinase inhibitor CEP-701 as treatment for prostate cancer demonstrate the inadequacy of PSA response as a primary endpoint. *Cancer Biol Ther* **6**, 1360-7.

Conover, J. C., Erickson, J. T., Katz, D. M., Bianchi, L. M., Poueymirou, W. T., McClain, J., Pan, L., Helgren, M., Ip, N. Y., Boland, P. et al. (1995). Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4. *Nature* **375**, 235-8.

Corbit, K. C., Foster, D. A. and Rosner, M. R. (1999). Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* **19**, 4209-18.

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

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

Cox, A., Dunning, A. M., Garcia-Closas, M., Balasubramanian, S., Reed, M. W., Pooley, K. A., Scollen, S., Baynes, C., Ponder, B. A., Chanock, S. et al. (2007). A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nat Genet* **39**, 352-8.

Dalal, R. and Djakiew, D. (1997). Molecular characterization of neurotrophin expression and the corresponding tropomyosin receptor kinases (trks) in epithelial and stromal cells of the human prostate. *Mol Cell Endocrinol* **134**, 15-22.

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., Lazarovici, P., Ezersky, A., Nesland, J. M., Berner, A., Risberg, B., Trope, C. G., Kristensen, G. B., Goscinski, M., van de Putte, G. et al. (2001). Expression levels of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 in effusions and solid tumors of serous ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res* **7**, 3457-64.

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

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

Davies, H., Hunter, C., Smith, R., Stephens, P., Greenman, C., Bignell, G., Teague, J., Butler, A., Edkins, S., Stevens, C. et al. (2005). Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer. *Cancer Res* **65**, 7591-5.

Bibliographie

De Paula, D., Bentley, M. V. and Mahato, R. I. (2007). Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. *Rna* **13**, 431-56.

Dechant, G. and Barde, Y. A. (1997). Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 413-8.

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.

Dewan, M. Z., Ahmed, S., Iwasaki, Y., Ohba, K., Toi, M. and Yamamoto, N. (2006). Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacother* **60**, 273-6.

DiCicco-Bloom, E., Friedman, W. J. and Black, I. B. (1993). NT-3 stimulates sympathetic neuroblast proliferation by promoting precursor survival. *Neuron* **11**, 1101-11.

Dionne, C. A., Camoratto, A. M., Jani, J. P., Emerson, E., Neff, N., Vaught, J. L., Murakata, C., Djakiew, D., Lamb, J., Bova, S. et al. (1998). Cell cycle-independent death of prostate adenocarcinoma is induced by the trk tyrosine kinase inhibitor CEP-751 (KT6587). *Clin Cancer Res* **4**, 1887-98.

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.

Dolle, L., El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Nurcombe, V. and Hondermarck, H. (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* **22**, 5592-601.

Donovan, M. J., Hempstead, B., Huber, L. J., Kaplan, D., Tsoulfas, P., Chao, M., Parada, L. and Schofield, D. (1994). Identification of the neurotrophin receptors p75 and trk in a series of Wilms' tumors. *Am J Pathol* **145**, 792-801.

Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W. M., Clarke, M. F. and Wicha, M. S. (2003). Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* **36 Suppl 1**, 59-72.

Douma, S., Van Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., Van Garderen, E. and Peeper, D. S. (2004). Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* **430**, 1034-9.

Bibliographie

Drell, T. L. t., Joseph, J., Lang, K., Niggemann, B., Zaenker, K. S. and Entschladen, F. (2003). Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* **80**, 63-70.

Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R. and Greenberg, M. E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* **275**, 661-5.

Easton, D. F. Pooley, K. A. Dunning, A. M. Pharoah, P. D. Thompson, D. Ballinger, D. G. Struewing, J. P. Morrison, J. Field, H. Luben, R. et al. (2007). Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* **447**, 1087-93.

Edsjo, A., Lavenius, E., Nilsson, H., Hoehner, J. C., Simonsson, P., Culp, L. A., Martinsson, T., Larsson, C. and Pahlman, S. (2003). Expression of trkB in human neuroblastoma in relation to MYCN expression and retinoic acid treatment. *Lab Invest* **83**, 813-23.

Egan, M. F., Kojima, M., Callicott, J. H., Goldberg, T. E., Kolachana, B. S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M. et al. (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* **112**, 257-69.

Eggert, A., Grotzer, M. A., Ikegaki, N., Liu, X. G., Evans, A. E. and Brodeur, G. M. (2002). Expression of the neurotrophin receptor TrkA down-regulates expression and function of angiogenic stimulators in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cancer Res* **62**, 1802-8.

Eggert, A., Grotzer, M. A., Ikegaki, N., Zhao, H., Cnaan, A., Brodeur, G. M. and Evans, A. E. (2001). Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol* **19**, 689-96.

Eggert, A., Ikegaki, N., Liu, X. G. and Brodeur, G. M. (2000). Prognostic and biological role of neurotrophin-receptor TrkA and TrkB in neuroblastoma. *Klin Padiatr* **212**, 200-5.

Eguchi, M., Eguchi-Ishimae, M., Tojo, A., Morishita, K., Suzuki, K., Sato, Y., Kudoh, S., Tanaka, K., Setoyama, M., Nagamura, F. et al. (1999). Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). *Blood* **93**, 1355-63.

Eide, F. F., Vining, E. R., Eide, B. L., Zang, K., Wang, X. Y. and Reichardt, L. F. (1996). Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* **16**, 3123-9.

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.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K. and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**, 199-213.

Bibliographie

Elbashir, S. M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, 188-200.

Elenbaas, B., Spirio, L., Koerner, F., Fleming, M. D., Zimonjic, D. B., Donaher, J. L., Popescu, N. C., Hahn, W. C. and Weinberg, R. A. (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* **15**, 50-65.

Entschladen, F., Drell, T. L. t., Lang, K., Joseph, J. and Zaenker, K. S. (2004). Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *Lancet Oncol* **5**, 254-8.

Entschladen, F., Palm, D., Niggemann, B. and Zaenker, K. S. (2008). The cancer's nervous tooth: Considering the neuronal crosstalk within tumors. *Semin Cancer Biol* **18**, 171-5.

Ernfors, P., Lee, K. F. and Jaenisch, R. (1994a). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* **368**, 147-50.

Ernfors, P., Lee, K. F., Kucera, J. and Jaenisch, R. (1994b). Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* **77**, 503-12.

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.

Esseghir, S., Todd, S. K., Hunt, T., Poulson, R., Plaza-Menacho, I., Reis-Filho, J. S. and Isacke, C. M. (2007). 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* **67**, 11732-41.

Ethier, S. P. (1995). Growth factor synthesis and human breast cancer progression. *J Natl Cancer Inst* **87**, 964-73.

Eulalio, A., Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **132**, 9-14.

Faratian, D. and Bartlett, J. (2008). Predictive markers in breast cancer--the future. *Histopathology* **52**, 91-8.

Fearon, E. R. and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-67.

Feinberg, A. P. and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **4**, 143-53.

Festuccia, C., Gravina, G. L., Muzi, P., Pomante, R., Ventura, L., Ricevuto, E., Vicentini, C. and Bologna, M. (2007a). In vitro and in vivo effects of bicalutamide on the expression of TrkA and P75 neurotrophin receptors in prostate carcinoma. *Prostate* **67**, 1255-64.

Bibliographie

- Festuccia, C., Muzi, P., Gravina, G. L., Millimaggi, D., Specia, S., Dolo, V., Ricevuto, E., Vicentini, C. and Bologna, M.** (2007b). 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.
- Friess, H., Zhu, Z. W., di Mola, F. F., Kulli, C., Graber, H. U., Andren-Sandberg, A., Zimmermann, A., Korc, M., Reinshagen, M. and Buchler, M. W.** (1999). Nerve growth factor and its high-affinity receptor in chronic pancreatitis. *Ann Surg* **230**, 615-24.
- Fryer, R. H., Kaplan, D. R. and Kromer, L. F.** (1997). Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* **148**, 616-27.
- Futreal, P. A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L. M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y. et al.** (1994). BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* **266**, 120-2.
- Gatenby, R. A. and Gillies, R. J.** (2008). A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**, 56-61.
- 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.
- Geiger, T. R. and Peeper, D. S.** (2007). Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis. *Cancer Res* **67**, 6221-9.
- Geldof, A. A., Van Haarst, E. P. and Newling, D. W.** (1998). Neurotrophic factors in prostate and prostatic cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **1**, 236-241.
- 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.
- Grabowski, P., Schindler, I., Anagnostopoulos, I., Foss, H. D., Riecken, E. O., Mansmann, U., Stein, H., Berger, G., Buhr, H. J. and Scherubl, H.** (2001). Neuroendocrine differentiation is a relevant prognostic factor in stage III-IV colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**, 405-11.
- Greco, A., Villa, R. and Pierotti, M. A.** (1996). Genomic organization of the human NTRK1 gene. *Oncogene* **13**, 2463-6.
- Grob, P. M., Ross, A. H., Koprowski, H. and Bothwell, M.** (1985). Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* **260**, 8044-9.
- Grotzer, M. A., Janss, A. J., Phillips, P. C. and Trojanowski, J. Q.** (2000). Neurotrophin receptor TrkC predicts good clinical outcome in medulloblastoma and other primitive neuroectodermal brain tumors. *Klin Padiatr* **212**, 196-9.
- Guiton, M., Gunn-Moore, F. J., Glass, D. J., Geis, D. R., Yancopoulos, G. D. and Tavare, 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.

Bibliographie

Haapasalo, A., Koponen, E., Hoppe, E., Wong, G. and Castren, E. (2001). Truncated trkB.T1 is dominant negative inhibitor of trkB.TK+-mediated cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 1352-8.

Hahn, W. C. and Weinberg, R. A. (2002). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* **347**, 1593-603.

Hainsworth, P. J., Raphael, K. L., Stillwell, R. G., Bennett, R. C. and Garson, O. M. (1992). Rearrangement of chromosome 1p in breast cancer correlates with poor prognostic features. *Br J Cancer* **66**, 131-5.

Hallbook, F. (1999). Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 616-21.

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.

Hartmann, M., Brigadski, T., Erdmann, K. S., Holtmann, B., Sendtner, M., Narz, F. and Lessmann, V. (2004). Truncated TrkB receptor-induced outgrowth of dendritic filopodia involves the p75 neurotrophin receptor. *J Cell Sci* **117**, 5803-14.

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.

Herlyn, M., Thurin, J., Balaban, G., Bennicelli, J. L., Herlyn, D., Elder, D. E., Bondi, E., Guerry, D., Nowell, P., Clark, W. H. et al. (1985). Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. *Cancer Res* **45**, 5670-6.

Herrmann, J. L., Menter, D. G., Hamada, J., Marchetti, D., Nakajima, M. and Nicolson, G. L. (1993). Mediation of NGF-stimulated extracellular matrix invasion by the human melanoma low-affinity p75 neurotrophin receptor: melanoma p75 functions independently of trkA. *Mol Biol Cell* **4**, 1205-16.

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

Ho, R., Eggert, A., Hishiki, T., Minturn, J. E., Ikegaki, N., Foster, P., Camoratto, A. M., Evans, A. E. and Brodeur, G. M. (2002). Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res* **62**, 6462-6.

Bibliographie

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.

Holgado-Madruga, M., Moscatello, D. K., Emler, D. R., Dieterich, R. and Wong, A. J. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12419-24.

Hoque, M. O., Feng, Q., Toure, P., Dem, A., Critchlow, C. W., Hawes, S. E., Wood, T., Jeronimo, C., Rosenbaum, E., Stern, J. et al. (2006). Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol* **24**, 4262-9.

Hu, M., Yao, J., Cai, L., Bachman, K. E., van den Brule, F., Velculescu, V. and Polyak, K. (2005). Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet* **37**, 899-905.

Hu, Z., Fan, C., Oh, D. S., Marron, J. S., He, X., Qaqish, B. F., Livasy, C., Carey, L. A., Reynolds, E., Dressler, L. et al. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* **7**, 96.

Huang, Y. and Sheikh, M. S. (2007). TRAIL death receptors and cancer therapeutics. *Toxicol Appl Pharmacol* **224**, 284-9.

Huber, L. J. and Chao, M. V. (1995). A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation. *J Neurosci Res* **40**, 557-63.

Hutvagner, G. and Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 22-32.

Ibanez, C. F. (2002). Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF. *Trends Neurosci* **25**, 284-6.

Imagawa, W., Pedchenko, V. K., Helber, J. and Zhang, H. (2002). Hormone/growth factor interactions mediating epithelial/stromal communication in mammary gland development and carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **80**, 213-30.

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. 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.

Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V. and Nordheim, A. (1993). Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *Embo J* **12**, 5097-104.

Bibliographie

- Jansen, P., Giehl, K., Nyengaard, J. R., Teng, K., Liubinski, O., Sjoegaard, S. S., Breiderhoff, T., Gotthardt, M., Lin, F., Eilers, A. et al.** (2007). Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci* **10**, 1449-57.
- Jarvinen, T. A. and Liu, E. T.** (2006). Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase IIalpha (TOP2A) genes--molecular basis for combination chemotherapy in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* **6**, 579-602.
- Jin, H., Pan, Y., He, L., Zhai, H., Li, X., Zhao, L., Sun, L., Liu, J., Hong, L., Song, J. et al.** (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. et al.** (2007b). p75 neurotrophin receptor suppresses the proliferation of human gastric cancer cells. *Neoplasia* **9**, 471-8.
- Jin, W., Yun, C., Hobbie, A., Martin, M. J., Sorensen, P. H. and Kim, S. J.** (2007c). Cellular transformation and activation of the phosphoinositide-3-kinase-Akt cascade by the ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase requires c-Src. *Cancer Res* **67**, 3192-200.
- 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., Farinas, I., Backus, C. and Reichardt, L. F.** (1994). Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell* **76**, 989-99.
- 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.
- Jungbluth, S., Bailey, K. and Barde, Y. A.** (1994). Purification and characterisation of a brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-3 (BDNF/NT-3) heterodimer. *Eur J Biochem* **221**, 677-85.
- Kao, S., Jaiswal, R. K., Kolch, W. and Landreth, G. E.** (2001). Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* **276**, 18169-77.
- Kaplan, D. R., Matsumoto, K., Lucarelli, E. and Thiele, C. J.** (1993). Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. Eukaryotic Signal Transduction Group. *Neuron* **11**, 321-31.
- Kaplan, D. R. and Miller, F. D.** (1997). Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 213-21.
- Kappel, S., Matthes, Y., Kaufmann, M. and Strebhardt, K.** (2007). Silencing of mammalian genes by tetracycline-inducible shRNA expression. *Nat Protoc* **2**, 3257-69.
- 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

Bibliographie

neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* **50**, 219-32.

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

Kermani, P. and Hempstead, B. (2007). Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* **17**, 140-3.

Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, V. V., Misgeld, T., Klinkert, W. E., Kolbeck, R., Hoppe, E., Oropeza-Wekerle, R. L., Bartke, I. et al. (1999). Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* **189**, 865-70.

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.

Khursigara, G., Orlinick, J. R. and Chao, M. V. (1999). Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* **274**, 2597-600.

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.

Kim, J. Y., Sutton, M. E., Lu, D. J., Cho, T. A., Goumnerova, L. C., Goritchenko, L., Kaufman, J. R., Lam, K. K., Billet, A. L., Tarbell, N. J. et al. (1999). Activation of neurotrophin-3 receptor TrkC induces apoptosis in medulloblastomas. *Cancer Res* **59**, 711-9.

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.

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., Silos-Santiago, I., Smeyne, R. J., Lira, S. A., Brambilla, R., Bryant, S., Zhang, L., Snider, W. D. and Barbacid, M. (1994). Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene trkC eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature* **368**, 249-51.

Klein, R., Smeyne, R. J., Wurst, W., Long, L. K., Auerbach, B. A., Joyner, A. L. and Barbacid, M. (1993). Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* **75**, 113-22.

Bibliographie

Knezevich, S. R., McFadden, D. E., Tao, W., Lim, J. F. and Sorensen, P. H. (1998). A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nat Genet* **18**, 184-7.

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

Knusel, B., Rabin, S. J., Hefti, F. and Kaplan, D. R. (1994). Regulated neurotrophin receptor responsiveness during neuronal migration and early differentiation. *J Neurosci* **14**, 1542-54.

Koch, A., Scherr, M., Breyer, B., Mancini, A., Kardinal, C., Battmer, K., Eder, M. and Tamura, T. (2008). Inhibition of Abl tyrosine kinase enhances nerve growth factor-mediated signaling in Bcr-Abl transformed cells via the alteration of signaling complex and the receptor turnover. *Oncogene*.

Kogner, P., Barbany, G., Dominici, C., Castello, M. A., Raschella, G. and Persson, H. (1993). Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res* **53**, 2044-50.

Kolbeck, R., Jungbluth, S. and Barde, Y. A. (1994). Characterisation of neurotrophin dimers and monomers. *Eur J Biochem* **225**, 995-1003.

Krygier, S. and Djakiew, D. (2002). Neurotrophin receptor p75(NTR) suppresses growth and nerve growth factor-mediated metastasis of human prostate cancer cells. *Int J Cancer* **98**, 1-7.

Kuruvilla, R., Zweifel, L. S., Glebova, N. O., Lonze, B. E., Valdez, G., Ye, H. and Ginty, D. D. (2004). A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell* **118**, 243-55.

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

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.

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.

Lancaster, J. M., Wooster, R., Mangion, J., Phelan, C. M., Cochran, C., Gumbs, C., Seal, S., Barfoot, R., Collins, N., Bignell, G. et al. (1996). BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nat Genet* **13**, 238-40.

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.

Bibliographie

Lannon, C. L., Martin, M. J., Tognon, C. E., Jin, W., Kim, S. J. and Sorensen, P. H. (2004). A highly conserved NTRK3 C-terminal sequence in the ETV6-NTRK3 oncoprotein binds the phosphotyrosine binding domain of insulin receptor substrate-1: an essential interaction for transformation. *J Biol Chem* **279**, 6225-34.

LeBlanc, H. N. and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* **10**, 66-75.

Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K. and Hempstead, B. L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**, 1945-8.

Lehmann, U., Hasemeier, B., Christgen, M., Muller, M., Romermann, D., Langer, F. and Kreipe, H. (2008). Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol* **214**, 17-24.

Lewis, C. E. and Hughes, R. (2007). Inflammation and breast cancer. Microenvironmental factors regulating macrophage function in breast tumours: hypoxia and angiopoietin-2. *Breast Cancer Res* **9**, 209.

Li, Z., Jaboin, J., Dennis, P. A. and Thiele, C. J. (2005). 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* **65**, 2070-5.

Li, Z., Tognon, C. E., Godinho, F. J., Yasaitis, L., Hock, H., Herschkowitz, J. I., Lannon, C. L., Cho, E., Kim, S. J., Bronson, R. T. et al. (2007a). ETV6-NTRK3 fusion oncogene initiates breast cancer from committed mammary progenitors via activation of AP1 complex. *Cancer Cell* **12**, 542-58.

Li, Z., Zhang, J., Liu, Z., Woo, C. W. and Thiele, C. J. (2007b). 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* **14**, 318-26.

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.

Lin, E. Y. and Pollard, J. W. (2007). Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res* **67**, 5064-6.

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.

Liu, Q., Schwaller, J., Kutok, J., Cain, D., Aster, J. C., Williams, I. R. and Gilliland, D. G. (2000). Signal transduction and transforming properties of the TEL-TRKC fusions associated with t(12;15)(p13;q25) in congenital fibrosarcoma and acute myelogenous leukemia. *Embo J* **19**, 1827-38.

Liu, X., Ernfors, P., Wu, H. and Jaenisch, R. (1995). Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature* **375**, 238-41.

Bibliographie

Lu, B., Pang, P. T. and Woo, N. H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* **6**, 603-14.

Lu, S. H., Zhou, Y., Que, H. P. and Liu, S. J. (2003). Peptidergic innervation of human esophageal and cardiac carcinoma. *World J Gastroenterol* **9**, 399-403.

Luo, Y., Zhou, H., Krueger, J., Kaplan, C., Lee, S. H., Dolman, C., Markowitz, D., Wu, W., Liu, C., Reisfeld, R. A. et al. (2006). Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J Clin Invest* **116**, 2132-2141.

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.

Makkerh, J. P., Ceni, C., Auld, D. S., Vaillancourt, F., Dorval, G. and Barker, P. A. (2005). p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep* **6**, 936-41.

Mamidipudi, V., Li, X. and Wooten, M. W. (2002). Identification of interleukin 1 receptor-associated kinase as a conserved component in the p75-neurotrophin receptor activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* **277**, 28010-8.

Mamidipudi, V., Lin, C., Seibenhener, M. L. and Wooten, M. W. (2004). Regulation of interleukin receptor-associated kinase (IRAK) phosphorylation and signaling by iota protein kinase C. *J Biol Chem* **279**, 4161-5.

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.

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

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

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.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P. and Zamore, P. D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**, 607-20.

Bibliographie

Matsumoto, K., Wada, R. K., Yamashiro, J. M., Kaplan, D. R. and Thiele, C. J. (1995). Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* **55**, 1798-806.

McDonald, N. Q. and Hendrickson, W. A. (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* **73**, 421-4.

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.

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

Medina, V., Croci, M., Crescenti, E., Mohamad, N., Sanchez-Jimenez, F., Massari, N., Nunez, M., Cricco, G., Martin, G., Bergoc, R. et al. (2008). The role of histamine in human mammary carcinogenesis: H3 and H4 receptors as potential therapeutic targets for breast cancer treatment. *Cancer Biol Ther* **7**, 28-35.

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

Mercurio, A. M., Lipscomb, E. A. and Bachelder, R. E. (2005). Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**, 283-90.

Metcalfe, K. A., Foulkes, W. D., Kim-Sing, C., Ainsworth, P., Rosen, B., Armel, S., Poll, A., Eisen, A., Gilchrist, D., Chudley, A. et al. (2008). Family history as a predictor of uptake of cancer preventive procedures by women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Clin Genet* **73**, 474-9.

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

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

Micera, A., Lambiase, A., Stampachiacchiere, B., Bonini, S., Bonini, S. and Levi-Schaffer, F. (2007). Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA(NGFR) and p75(NTR), two receptors one fate. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 245-56.

Middlemas, D. S., Lindberg, R. A. and Hunter, T. (1991). trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* **11**, 143-53.

Miknyoczki, S. J., Lang, D., Huang, L., Klein-Szanto, A. J., Dionne, C. A. and Ruggeri, B. A. (1999). Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal

Bibliographie

adenocarcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *Int J Cancer* **81**, 417-27.

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.

Minichiello, L., Casagrande, F., Tatche, R. S., Stucky, C. L., Postigo, A., Lewin, G. R., Davies, A. M. and Klein, R. (1998). Point mutation in trkB causes loss of NT4-dependent neurons without major effects on diverse BDNF responses. *Neuron* **21**, 335-45.

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

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

Moasser, M. M. (2007b). Targeting the function of the HER2 oncogene in human cancer therapeutics. *Oncogene* **26**, 6577-92.

Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J. and Wolfman, A. (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* **260**, 1658-61.

Morrison, K. B., Tognon, C. E., Garnett, M. J., Deal, C. and Sorensen, P. H. (2002). ETV6-NTRK3 transformation requires insulin-like growth factor 1 receptor signaling and is associated with constitutive IRS-1 tyrosine phosphorylation. *Oncogene* **21**, 5684-95.

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

Mukai, J., Hachiya, T., Shoji-Hoshino, S., Kimura, M. T., Nadano, D., Suvanto, P., Hanaoka, T., Li, Y., Irie, S., Greene, L. A. et al. (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.

Mulero-Navarro, S. and Esteller, M. (2008). Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now. *Crit Rev Oncol Hematol*.

Mullan, P. B. and Millikan, R. C. (2007). Molecular subtyping of breast cancer: opportunities for new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci* **64**, 3219-32.

Muller, G., Storz, P., Bourteele, S., Doppler, H., Pfizenmaier, K., Mischak, H., Philipp, A., Kaiser, C. and Kolch, W. (1998). Regulation of Raf-1 kinase by TNF via its second messenger ceramide and cross-talk with mitogenic signalling. *Embo J* **17**, 732-42.

Bibliographie

- Murakami, Y. S., Brothman, A. R., Leach, R. J. and White, R. L.** (1995). Suppression of malignant phenotype in a human prostate cancer cell line by fragments of normal chromosomal region 17q. *Cancer Res* **55**, 3389-94.
- 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.
- Nagao, A., Zhao, X., Takegami, T., Nakagawa, H., Matsui, S., Matsunaga, T. and Ishigaki, Y.** (2008). Multiple shRNA expressions in a single plasmid vector improve RNAi against the XPA gene. *Biochem Biophys Res Commun* **370**, 301-5.
- Nakagawara, A., Azar, C. G., Scavarda, N. J. and Brodeur, G. M.** (1994). Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* **14**, 759-67.
- 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.
- 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.
- Nico, B., Mangieri, D., Benagiano, V., Crivellato, E. and Ribatti, D.** (2008). Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc Res* **75**, 135-41.
- Nusinzon, I. and Horvath, C. M.** (2006). Positive and negative regulation of the innate antiviral response and beta interferon gene expression by deacetylation. *Mol Cell Biol* **26**, 3106-13.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T. E. et al.** (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.
- Odegaard, E., Staff, A. C., Abeler, V. M., Kopolovic, J., Onsrud, M., Lazarovici, P. and Davidson, B.** (2007). The activated nerve growth factor receptor p-TrkA is selectively expressed in advanced-stage ovarian carcinoma. *Hum Pathol* **38**, 140-6.
- Oelmann, E., Sreter, L., Schuller, I., Serve, H., Koenigsmann, M., Wiedenmann, B., Oberberg, D., Reufi, B., Thiel, E. and Berdel, W. E.** (1995). Nerve growth factor stimulates clonal growth of human lung cancer cell lines and a human glioblastoma cell line expressing high-affinity nerve growth factor binding sites involving tyrosine kinase signaling. *Cancer Res* **55**, 2212-9.

Bibliographie

Offenhauser, N., Muzio, V. and Biffo, S. (2002). BDNF binding to truncated trkB.T1 does not affect gene expression. *Neuroreport* **13**, 1189-93.

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.

Ohira, K., Shimizu, K. and Hayashi, M. (1999). Change of expression of full-length and truncated TrkB_s in the developing monkey central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* **112**, 21-9.

Okada, Y., Eibl, G., Guha, S., Duffy, J. P., Reber, H. A. and Hines, O. J. (2004). Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells. *Clin Exp Metastasis* **21**, 285-92.

Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E. and Lisanti, M. P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* **273**, 5419-22.

Olivier, M., Langerod, A., Carrieri, P., Bergh, J., Klaar, S., Eyfjord, J., Theillet, C., Rodriguez, C., Lidereau, R., Bieche, I. et al. (2006). The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* **12**, 1157-67.

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.

Orimo, A. and Weinberg, R. A. (2006). Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* **5**, 1597-601.

Orimo, A. and Weinberg, R. A. (2007). Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors. *Cancer Biol Ther* **6**, 618-9.

Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. and Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**, 948-58.

Paddison, P. J., Caudy, A. A., Sachidanandam, R. and Hannon, G. J. (2004). Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells. *Methods Mol Biol* **265**, 85-100.

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.

Bibliographie

- Pearse, R. N., Swendeman, S. L., Li, Y., Raffi, D. and Hempstead, B. L.** (2005). A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* **105**, 4429-36.
- Pei, Y. and Tuschl, T.** (2006). On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods* **3**, 670-6.
- Perez-Pinera, P., Hernandez, T., Garcia-Suarez, O., de Carlos, F., Germana, A., Del Valle, M., Astudillo, A. and Vega, J. A.** (2007). The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Mol Cell Biochem* **295**, 19-26.
- Perez, P., Coll, P. M., Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D. and Chao, M. V.** (1995). NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol Cell Neurosci* **6**, 97-105.
- 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. et al.** (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-52.
- Pflug, B. and Djakiew, D.** (1998). Expression of p75^{NTR} in a human prostate epithelial tumor cell line reduces nerve growth factor-induced cell growth by activation of programmed cell death. *Mol Carcinog* **23**, 106-14.
- Pflug, B. R., Onoda, M., Lynch, J. H. and Djakiew, D.** (1992). Reduced expression of the low affinity nerve growth factor receptor in benign and malignant human prostate tissue and loss of expression in four human metastatic prostate tumor cell lines. *Cancer Res* **52**, 5403-6.
- Pierotti, M. A. and Greco, A.** (2006). Oncogenic rearrangements of the NTRK1/NGF receptor. *Cancer Lett* **232**, 90-8.
- Pollard, J. W.** (2008). Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol*.
- Polyak, K.** (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* **117**, 3155-63.
- 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.
- 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 Robison, R. C.** (1993). Heterodimers of the neurotrophic factors: formation, isolation, and differential stability. *Biochemistry* **32**, 13350-6.
- Rangasamy, D., Tremethick, D. J. and Greaves, I. K.** (2008). Gene knockdown by ecdysone-based inducible RNAi in stable mammalian cell lines. *Nat Protoc* **3**, 79-88.

Bibliographie

Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1545-64.

Renne, C., Minner, S., Kuppers, R., Hansmann, M. L. and Brauninger, A. (2008). Autocrine NGFbeta/TRKA signalling is an important survival factor for Hodgkin lymphoma derived cell lines. *Leuk Res* **32**, 163-7.

Renne, C., Willenbrock, K., Kuppers, R., Hansmann, M. L. and Brauninger, A. (2005). Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* **105**, 4051-9.

Ricci, A., Felici, L., Mariotta, S., Mannino, F., Schmid, G., Terzano, C., Cardillo, G., Amenta, F. and Bronzetti, E. (2004). Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**, 12-9.

Ricci, A., Graziano, P., Mariotta, S., Cardillo, G., Sposato, B., Terzano, C. and Bronzetti, E. (2005). Neurotrophin system expression in human pulmonary carcinoid tumors. *Growth Factors* **23**, 303-12.

Ricci, A., Greco, S., Mariotta, S., Felici, L., Amenta, F. and Bronzetti, E. (2000). Neurotrophin and neurotrophin receptor expression in alveolar macrophages: an immunocytochemical study. *Growth Factors* **18**, 193-202.

Ricci, A., Greco, S., Mariotta, S., Felici, L., Bronzetti, E., Cavazzana, A., Cardillo, G., Amenta, F., Bisetti, A. and Barbolini, G. (2001). Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**, 439-46.

Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C. M., Blendy, J. A. and Ginty, D. D. (1999). Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* **286**, 2358-61.

Robinson, R. C., Radziejewski, C., Spraggon, G., Greenwald, J., Kostura, M. R., Burtnick, L. D., Stuart, D. I., Choe, S. and Jones, E. Y. (1999). The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. *Protein Sci* **8**, 2589-97.

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.

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.

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.

Bibliographie

- Ross, A. H., Grob, P., Bothwell, M., Elder, D. E., Ernst, C. S., Marano, N., Ghrist, B. F., Slemp, C. C., Herlyn, M., Atkinson, B. et al.** (1984). Characterization of nerve growth factor receptor in neural crest tumors using monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6681-5.
- Roux, P. P. and Barker, P. A.** (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* **67**, 203-33.
- Roux, P. P., Bhakar, A. L., Kennedy, T. E. and Barker, P. A.** (2001). The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* **276**, 23097-104.
- Roy, P. G. and Thompson, A. M.** (2006). Cyclin D1 and breast cancer. *Breast* **15**, 718-27.
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P. G. et al.** (1992). Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* **360**, 689-92.
- Sakamoto, Y., Kitajima, Y., Edakuni, G., Sasatomi, E., Mori, M., Kitahara, K. and Miyazaki, K.** (2001). Expression of Trk tyrosine kinase receptor is a biologic marker for cell proliferation and perineural invasion of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep* **8**, 477-84.
- 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.
- Sang, N., Zhang, J., Marcheselli, V., Bazan, N. G. and Chen, C.** (2005). Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. *J Neurosci* **25**, 9858-70.
- Sariola, H.** (2001). The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1061-6.
- Schneider, M. B., Standop, J., Ulrich, A., Wittel, U., Friess, H., Andren-Sandberg, A. and Pour, P. M.** (2001). Expression of nerve growth factors in pancreatic neural tissue and pancreatic cancer. *J Histochem Cytochem* **49**, 1205-10.
- Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, R., Barde, Y. A. and Schwab, M. E.** (1994). Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* **367**, 170-3.
- Schulte, J. H., Schramm, A., Klein-Hitpass, L., Klenk, M., Wessels, H., Hauffa, B. P., Eils, J., Eils, R., Brodeur, G. M., Schweigerer, L. et al.** (2005). Microarray analysis reveals differential gene expression patterns and regulation of single target genes contributing

Bibliographie

to the opposing phenotype of TrkA- and TrkB-expressing neuroblastomas. *Oncogene* **24**, 165-77.

Schweigreiter, R. (2006). The dual nature of neurotrophins. *Bioessays* **28**, 583-94.

Sclabas, G. M., Fujioka, S., Schmidt, C., Li, Z., Frederick, W. A., Yang, W., Yokoi, K., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., Hess, K. R. et al. (2005). Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* **11**, 440-9.

Sehgal, A., Patil, N. and Chao, M. (1988). A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene. *Mol Cell Biol* **8**, 3160-7.

Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., Chretien, M. and Murphy, R. A. (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* **314** (Pt 3), 951-60.

Seifert, P., Benedic, M. and Effert, P. (2002). Nerve fibers in tumors of the human urinary bladder. *Virchows Arch* **440**, 291-7.

Seifert, P. and Spitznas, M. (2002). Axons in human choroidal melanoma suggest the participation of nerves in the control of these tumors. *Am J Ophthalmol* **133**, 711-3.

Shah, J. K., Garner, H. R., White, M. A., Shames, D. S. and Minna, J. D. (2007). siRNA: siRNA Information Resource, a web-based tool for siRNA sequence design and analysis and an open access siRNA database. *BMC Bioinformatics* **8**, 178.

Sharma, S. V., Gajowniczek, P., Way, I. P., Lee, D. Y., Jiang, J., Yuza, Y., Classon, M., Haber, D. A. and Settleman, J. (2006). A common signaling cascade may underlie "addiction" to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes. *Cancer Cell* **10**, 425-35.

Sharma, S. V. and Settleman, J. (2007). Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev* **21**, 3214-31.

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.

Simpkins, J. W., Green, P. S., Gridley, K. E., Singh, M., de Fiebre, N. C. and Rajakumar, G. (1997). Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. *Am J Med* **103**, 19S-25S.

Bibliographie

Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. and McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177-82.

Smalley, M. and Ashworth, A. (2003). Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer* **3**, 832-44.

Smeyne, R. J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L. K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S. A. and Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* **368**, 246-9.

Smith, C. A., Farrah, T. and Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**, 959-62.

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

Snove, O., Jr. and Rossi, J. J. (2006). Expressing short hairpin RNAs in vivo. *Nat Methods* **3**, 689-95.

Sohrabji, F. and Lewis, D. K. (2006). Estrogen-BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol* **27**, 404-14.

Sohrabji, F., Miranda, R. C. and Toran-Allerand, C. D. (1994). Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptor mRNAs in adult sensory neurons. *J Neurosci* **14**, 459-71.

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

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. et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10869-74.

Sorlie, T., Wang, Y., Xiao, C., Johnsen, H., Naume, B., Samaha, R. R. and Borresen-Dale, A. L. (2006). Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics* **7**, 127.

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

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

Bibliographie

Stacey, S. N., Manolescu, A., Sulem, P., Rafnar, T., Gudmundsson, J., Gudjonsson, S. A., Masson, G., Jakobsdottir, M., Thorlacius, S., Helgason, A. et al. (2007). Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Genet* **39**, 865-9.

Stephens, P., Edkins, S., Davies, H., Greenman, C., Cox, C., Hunter, C., Bignell, G., Teague, J., Smith, R., Stevens, C. et al. (2005). A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer. *Nat Genet* **37**, 590-2.

Sternlicht, M. D. (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* **8**, 201.

Sternlicht, M. D., Kouros-Mehr, H., Lu, P. and Werb, Z. (2006). Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* **74**, 365-81.

Stingl, J. and Caldas, C. (2007). Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* **7**, 791-9.

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.

Strohmaier, C., Carter, B. D., Urfer, R., Barde, Y. A. and Dechant, G. (1996). A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *Embo J* **15**, 3332-7.

Szyf, M., Pakneshan, P. and Rabbani, S. A. (2004). DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol* **68**, 1187-97.

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

Tacconelli, A., Farina, A. R., Cappabianca, L., Gulino, A. and Mackay, A. R. (2005a). Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. *Fut Oncol* **1**, 689-698.

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

Tafer, H., Ameres, S. L., Obernosterer, G., Gebeshuber, C. A., Schroeder, R., Martinez, J. and Hofacker, I. L. (2008). The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nat Biotechnol* **26**, 578-83.

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.

Bibliographie

- Taniuchi, M., Johnson, E. M., Jr., Roach, P. J. and Lawrence, J. C., Jr.** (1986). Phosphorylation of nerve growth factor receptor proteins in sympathetic neurons and PC12 cells. In vitro phosphorylation by the cAMP-independent protein kinase FA/GSK-3. *J Biol Chem* **261**, 13342-9.
- Tauszig-Delamasure, S., Yu, L. Y., Cabrera, J. R., Bouzas-Rodriguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M. C., Arumae, U. and Mehlen, P.** (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13361-6.
- 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. et al.** (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* **25**, 5455-63.
- Teng, K. K. and Hempstead, B. L.** (2004). Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci* **61**, 35-48.
- Thompson, D. and Easton, D.** (2004). The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 221-36.
- Tlsty, T. D., Crawford, Y. G., Holst, C. R., Fordyce, C. A., Zhang, J., McDermott, K., Kozakiewicz, K. and Gauthier, M. L.** (2004). Genetic and epigenetic changes in mammary epithelial cells may mimic early events in carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 263-74.
- Togon, C., Garnett, M., Kenward, E., Kay, R., Morrison, K. and Sorensen, P. H.** (2001). The chimeric protein tyrosine kinase ETV6-NTRK3 requires both Ras-Erk1/2 and PI3-kinase-Akt signaling for fibroblast transformation. *Cancer Res* **61**, 8909-16.
- Togon, C., Knezevich, S. R., Huntsman, D., Roskelley, C. D., Melnyk, N., Mathers, J. A., Becker, L., Carneiro, F., MacPherson, N., Horsman, D. et al.** (2002). Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell* **2**, 367-76.
- 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*.
- Tsoufas, P., Stephens, R. M., Kaplan, D. R. and Parada, L. F.** (1996). TrkC isoforms with inserts in the kinase domain show impaired signaling responses. *J Biol Chem* **271**, 5691-7.
- Ultsch, M. H., Wiesmann, C., Simmons, L. C., Henrich, J., Yang, M., Reilly, D., Bass, S. H. and de Vos, A. M.** (1999). Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J Mol Biol* **290**, 149-59.
- Underwood, C. K., Reid, K., May, L. M., Bartlett, P. F. and Coulson, E. J.** (2008). Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase. *Mol Cell Neurosci* **37**, 346-58.

Bibliographie

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.

Vaillant, A. R., Mazzoni, I., Tudan, C., Boudreau, M., Kaplan, D. R. and Miller, F. D. (1999). Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J Cell Biol* **146**, 955-66.

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

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

Vogel, C. L. and Franco, S. X. (2003). Clinical experience with trastuzumab (herceptin). *Breast J* **9**, 452-62.

Wai, D. H., Knezevich, S. R., Lucas, T., Jansen, B., Kay, R. J. and Sorensen, P. H. (2000). The ETV6-NTRK3 gene fusion encodes a chimeric protein tyrosine kinase that transforms NIH3T3 cells. *Oncogene* **19**, 906-15.

Wakeling, A. E. (2005). Inhibitors of growth factor signalling. *Endocr Relat Cancer* **12 Suppl 1**, S183-7.

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

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

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

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

Bibliographie

- 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.
- Weinstein, I. B.** (2002). Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* **297**, 63-4.
- Wen, C. J., Xue, B., Qin, W. X., Yu, M., Zhang, M. Y., Zhao, D. H., Gao, X., Gu, J. R. and Li, C. J.** (2004). hNRAGE, a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation. *FEBS Lett* **564**, 171-6.
- Wiesmann, C., Ultsch, M. H., Bass, S. H. and de Vos, A. M.** (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* **401**, 184-8.
- Wiwanitkit, V.** (2007). Structure of human BRCA2-RAD51 by molecular docking study. *Arch Gynecol Obstet* **276**, 625-7.
- Wood, L. D., Calhoun, E. S., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Powell, S. M., Riggins, G. J., Wang, T. L., Yan, H., Gazdar, A. et al.** (2006). Somatic mutations of GUCY2F, EPHA3, and NTRK3 in human cancers. *Hum Mutat* **27**, 1060-1.
- 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., Zhou, G., Seibenhener, M. L. and Coleman, E. S.** (1994). A role for zeta protein kinase C in nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Cell Growth Differ* **5**, 395-403.
- Xiao, Z. Y., Wang, Y. D. and Chen, X. P.** (2006). [Effect of brain-derived neurotrophic factor on in vitro metastasis of hepatocellular carcinoma cell line HepG2]. *Ai Zheng* **25**, 287-91.
- Yacoubian, T. A. and Lo, D. C.** (2000). Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat Neurosci* **3**, 342-9.
- Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S., Nakatani, A., Ikeuchi, T. and Hatanaka, H.** (1997). Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J Biol Chem* **272**, 30334-9.
- Yamashita, T. and Tohyama, M.** (2003). The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* **6**, 461-7.
- Yamashita, T., Tucker, K. L. and Barde, Y. A.** (1999). Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* **24**, 585-93.
- Yang, N., Coukos, G. and Zhang, L.** (2008). MicroRNA epigenetic alterations in human cancer: one step forward in diagnosis and treatment. *Int J Cancer* **122**, 963-8.

Bibliographie

- Yang, Z. F., Ho, D. W., Lam, C. T., Luk, J. M., Lum, C. T., Yu, W. C., Poon, R. T. and Fan, S. T.** (2005). Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **65**, 219-25.
- Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J. J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C. A. et al.** (1999). TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* **274**, 30202-8.
- Yeiser, E. C., Rutkoski, N. J., Naito, A., Inoue, J. and Carter, B. D.** (2004). Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in *traf6*^{-/-} mice. *J Neurosci* **24**, 10521-9.
- Yoo, J. Y., Kim, J. H., Kim, J., Huang, J. H., Zhang, S. N., Kang, Y. A., Kim, H. and Yun, C. O.** (2008). Short hairpin RNA-expressing oncolytic adenovirus-mediated inhibition of IL-8: effects on antiangiogenesis and tumor growth inhibition. *Gene Ther* **15**, 635-51.
- 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, X., Liu, L., Cai, B., He, Y. and Wan, X.** (2008). Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TrkB in human ovarian cancer. *Cancer Sci* **99**, 543-52.
- Yuanlong, H., Haifeng, J., Xiaoyin, Z., Jialin, S., Jie, L., Li, Y., Huahong, X., Jiugang, S., Yanglin, P., Kaichun, W. et al.** (2008). The inhibitory effect of p75 neurotrophin receptor on growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.*
- Zamore, P. D. and Haley, B.** (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* **309**, 1519-24.
- Zhou, H., Summers, S. A., Birnbaum, M. J. and Pittman, R. N.** (1998). Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **273**, 16568-75.
- Zhu, Z., Friess, H., diMola, F. F., Zimmermann, A., Graber, H. U., Korc, M. and Buchler, M. W.** (1999). Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol* **17**, 2419-28.
- Zhu, Z., Kleeff, J., Kayed, H., Wang, L., Korc, M., Buchler, M. W. and Friess, H.** (2002). Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog* **35**, 138-47.
- Zhu, Z. W., Friess, H., Wang, L., Bogardus, T., Korc, M., Kleeff, J. and Buchler, M. W.** (2001). Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* **7**, 105-12.
- Zundel, W., Swiersz, L. M. and Giaccia, A.** (2000). Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* **20**, 1507-14.

Bibliographie

Chapitre 4 : Annexes

Annexes

Article 3 : TrkA overexpression promotes growth and metastasis of breast cancer cells

Cet article décrit la caractérisation biologique d'un modèle de cellules de cancer du sein surexprimant stablement TrkA. Il est actuellement en révision dans le journal *Oncogene*. Cette étude montre que les cellules surexprimant TrkA présentent des caractéristiques d'agressivité accrues *in vitro* (augmentation de la prolifération, de la survie et de l'invasion) et en modèle animal (augmentation de la croissance tumorale et des métastases). Les phénotypes observés résulteraient essentiellement de l'activation des voies PI3K/Akt et ERK/P38 MAP Kinase.

Annexe 1 : Article supplémentaire

TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells

C Lagadec¹, E Adriaenssens, S Meignan, E Vanhecke, R Romon, R-A Toillon, B Oxombre², H Hondermarck and X Le Bourhis

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

Corresponding author: Xuefen Le Bourhis, INSERM U908 (JE 2488), Bâtiment SN3, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Phone: 33 (0)3 20 43 45 81; Fax: 33 (0)3 20 43 40 38; Email: xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr

Footnotes: ¹present address: Department of Radiation Oncology, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, USA. ²present address: Laboratoire d'Immunologie - EA 2686, Faculté de médecine H. Warembourg, Lille, France.

Running title: TrkA overexpression enhances breast tumor aggressivity

Keywords: neurotrophins, tyrosine kinase receptors, anoikis.

Abstract

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

Introduction

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

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

et al., 1999), lung (Ricci *et al.*, 2001), pancreatic (Zhu *et al.*, 1999), prostate (Weeraratna *et al.*, 2000) and ovarian carcinomas (Davidson *et al.*, 2003).

In breast cancer cells, we have shown that NGF acts as an autocrine growth factor to stimulate cell proliferation and survival (Dolle *et al.*, 2003). Interestingly, NGF cooperates with p185 (HER2) to stimulate breast cancer cell growth (Tagliabue *et al.*, 2000), and Tamoxifen, the commonly used drug in hormonotherapy, inhibits the proliferative effects of NGF (Chiarenza *et al.*, 2001). More recently, we have shown that NGF is expressed in the majority of human breast tumors, especially in epithelial cancer cells. Moreover, anti-NGF antibodies and small interfering RNA against NGF strongly inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer cells xenografted in immunodeficient mice (Adriaenssens *et al.*, 2008). These *in vitro* and *in vivo* results suggest that NGF may be actively involved in mammary tumor development. In agreement with this hypothesis, high levels of activated TrkA (phospho-TrkA) are observed in breast cancer effusions compared to primary cancers (Davidson *et al.*, 2004). Unfortunately, commonly used breast cancer cell lines express relatively low levels of TrkA compared to tumor biopsies (Descamps *et al.*, 2001a). In this study, we first showed that breast tumor biopsies expressed high levels of TrkA and phospho-TrkA compared to normal biopsies, and then stably transfected TrkA in MDA-MB-231 human breast cancer cells to determine the functional importance of TrkA overexpression. Our results show that TrkA overexpression increased cell growth both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, TrkA overexpression strongly enhanced anoikis resistance, leading to increased metastatic spread of breast cancer cells to vital organs such as lung, liver and brain.

Results

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

TrkA expression in breast biopsies was first quantified by real time RT-PCR (Figure 1A). TrkA was expressed in normal biopsies with levels roughly equivalent to those detected in MDA-MB-231 breast cancer cell line. In contrast, the levels of TrkA mRNA in tumor biopsies were about 10 to 140-fold higher than that in normal samples. The high level of TrkA expression in breast tumor biopsies was further confirmed by Western blot analysis (Figure 1B). Moreover, phospho-TrkA (pTrkA) was detected in the majority of cancer biopsies while it was undetectable in normal ones; no strict correlation was observed between the levels of TrkA and pTrkA in these samples. We then extended our analysis by immunochemical staining of breast tissue microarrays (Figure 1C and D). The staining intensities for TrkA and pTrkA were significantly elevated in cancer biopsies compared to normal tissues. Of note, TrkA immunostaining was especially observed in cancer epithelial cells.

Generation of TrkA overexpressing cells

Commonly used breast cancer cell lines express relatively low levels of TrkA compared to tumor biopsies (Figure 1A; Descamps et al., 2001a). Only the TrkA1 isoform is expressed in breast cancers (data not shown), so in order to determine the functional importance of TrkA overexpression in breast cancer development, we transfected MDA-MB-231 breast cancer cells with either pcDNA3.1-hygro/TrkA expression vector or pcDNA3.1-hygro empty vector. Cells resistant to hygromycin were expanded and maintained as pools or single clones. Similar increase of TrkA mRNA and proteins was found in pooled cells and the two selected clones (Figure 2 A and B). Interestingly, an increase of pTrkA was also observed in TrkA

overexpressing cells, indicating that TrkA was activated following its overexpression (Figure 2B).

TrkA overexpression promotes cell growth, migration, invasion and survival

The incidence of TrkA overexpression on cell behavior was determined both in the pooled and the 2 selected clones with similar results. To clarify the presentation, only results with pooled cells are shown (Figure 3). On standard cell culture plastic, TrkA overexpression resulted in accelerated cell growth by 2-fold after 6 days of culture (Figure 3A). When cell migration was evaluated using Transwell Boyden chamber, TrkA overexpression induced a 2-fold increase of cell migration to the bottom chamber than did the empty-vector transfected cells. (Figure 3B). Similar results were obtained using wound healing method (Figure 3C). The invasive capacities of the cells were assessed using Transwells with filters coated with Matrigel and were found to be also enhanced in TrkA overexpressing cells (Figure 3D). Such an increase in migration and invasion was not due to differences in cell growth as cells showed comparable growth rates in short time culture (Figure 3A). As increased migration could be the result of modified capacity of cell adhesion, we then evaluated the adhesive abilities of cells in fibronectin-, collagen- and Matrigel-coated plastic. No significant differences were detected between control (empty-vector transfected) and TrkA overexpressing cells (data not shown). To determine whether TrkA can stimulate anchorage-independent cell survival, we cultured cells on poly-HEMA coated-wells that effectively inhibit cell attachment. In suspension, empty-vector transfected cells underwent cell death rapidly, resulting in more than 80% of cell death after 120 h of culture (Figure 3F). In contrast, TrkA overexpressing cells could survive and proliferate as large spheroid aggregates in suspension, resulting in a 2-fold increase of cells by 36 h of culture. Of note, during different times of culture, the

viability of TrkA overexpressing cells remained superior or similar to that at the beginning of the experiment (Figure 3E and F). The enhanced survival of TrkA overexpressing cells was further supported by a soft-agar assay (Figure 3G and H), which reinforced the fact that TrkA overexpression bypasses the need for anchorage. Finally, TrkA overexpression enhanced resistance of cells to TRAIL-induced apoptosis (Figure 3I).

Surprisingly, although exogenous NGF further stimulated cell growth, migration and invasion in TrkA-overexpressing cells, it did not modify resistance to either anoikis or apoptosis (Figure 3). These differential effects of NGF on migration and anoikis were also observed when TrkA was overexpressed in MCF-7 breast cancer cells (Supplementary data Figure 1). Since we have previously shown that NGF can stimulate growth of breast cancer cells both *in vitro* and *in vivo* via an autocrine loop (Dolle *et al.*, 2003; Adriaenssens *et al.*, 2008), we then determined if the effects of TrkA overexpression were due to the activation of the autocrine loop. No modification of NGF expression was observed in TrkA overexpressing MDA-MB-231 cells (data not shown). Neutralizing anti-NGF antibody partially inhibited migration of TrkA overexpressing MDA-MB-231 cells, but had no effect on anoikis resistance; similar results were obtained in MCF-7 cells (Supplementary data Figure 1). These data suggest that NGF produced by breast cancer cells is sufficient to stimulate TrkA-induced migration but not TrkA-enhanced anoikis resistance. Together, whatever the involvement of NGF, TrkA overexpression increased cell growth, invasion as well as survival in breast cancer cells.

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

To determine the molecular effects of TrkA overexpression and the downstream signaling pathways, we analyzed migration, anoikis and colony formation in soft agar by using different pharmacological inhibitors (TrkA tyrosine kinase inhibitor K252a, PI3K inhibitor LY294002, Akt inhibitor III, MEK inhibitor U0126 and p38 MAP kinase inhibitor II). As shown in Figure 4A, the levels of phospho-Akt (pAkt), phospho-ERK (pERK) and phospho-p38 (pp38) MAP kinases were found to be elevated in TrkA overexpressing cells compared to mock cells. Inhibition of TrkA phosphorylation by K252a strongly reduced the levels of pAkt, pERK and pp38 MAP kinases without modifying the levels of corresponding proteins. This implies that overexpressed TrkA was functional in signal transduction by activating PI3K-Akt and ERK/p38 MAP kinases. Moreover, inhibition of PI3K and Akt decreased ERK phosphorylation without any effect on p38 MAP kinase.

Reduced migration, anoikis resistance and colony formation were observed in TrkA overexpressing cells (Figure 4B-D; Supplementary Figure 2A), indicating that phosphorylated TrkA is responsible for the observed biological effects in TrkA overexpressing cells. TrkA overexpression-induced migration, anoikis resistance were abolished in the presence of PI3K-Akt and ERK MAP inhibitors (Figure 4B and C; Supplementary Figure 2B and C). Interestingly, PI3K-Akt seemed to be crucial for colony formation in soft agar as cells did not survive in the presence of LY294002 or Akt inhibitor III (Figure 4D). ERK inhibition affected the basal growth but had no effect on TrkA-stimulated growth in soft agar. In contrast, inhibition of p38 MAP kinase only abolished TrkA overexpression-stimulated colony formation (Figure 4D).

TrkA overexpression accelerates tumor growth by enhancing cell proliferation and angiogenesis

MDA-MB-231 cells were subcutaneously injected into SCID mice. All animals formed tumor at the site of injection, but the tumor growth rates were quite different: tumors formed by TrkA overexpressing cells were palpable 2 weeks after injection, and attained a size of 2 cm³ at about 5 weeks post-injection. In contrast, empty vector transfected cells formed palpable tumors with a latency of 5 weeks and took 10 weeks to form tumors of similar size (2 cm³) (Figure 5A). To determine whether apoptosis, cell proliferation and angiogenesis were modified in tumors formed by TrkA overexpressing cells, we then performed TUNEL assay, immuno-staining of PCNA and vWF which are markers of apoptosis, cell proliferation and angiogenesis, respectively. No differences in TUNEL-positive cells were observed between tumors formed by empty vector transfected and TrkA overexpressing cells. In contrast, 3- and 2.5-fold increases of PCNA- and vWF-positive cells were found in TrkA overexpressing tumor sections (Figure 5B). These data indicated that accelerated tumor growth was due to the enhanced proliferation of TrkA overexpressing cells and increased angiogenesis.

TrkA overexpression promotes tumor metastasis by enhancing anoikis resistance

In order to evaluate metastasis *in vivo*, we generated MDA-MB-231 cells (overexpressing TrkA or not) stably expressing GFP. The GFP-positive cells exhibited the same levels of TrkA and similar *in vitro* properties (proliferation, migration and survival) compared to their parental counterparts (Data not shown). Metastatic potentials of the GFP-positive cells were then evaluated after subcutaneous injection into SCID mice. Individual tumor burden per organ was measured by quantifying GFP-positive cells using FACS (Figure 6; Supplementary

Figure 3). All animals formed lung and liver metastases; however, TrkA overexpression induced 2- and 3-fold increases of metastatic burden in lungs and livers, respectively. Interestingly, only three animals among eight bearing empty vector transfected cells developed brain metastases with a low tumor burden, as metastatic (GFP-positive) cells were found to be inferior to 0.2%. In contrast, 9/9 animals receiving TrkA overexpressing cells developed brain metastasis with an average tumor burden 25-fold higher than control animals (Figure 6, Table 1). Histological analysis of tumor sections showed the predominance of micrometastatic foci and confirmed the increased metastases of TrkA overexpression in lung, liver and brain. We then attempted to determine the mechanism of TrkA-driven metastasis. For this, TrkA overexpressing cells derived from lung of 9 animals were isolated and cultured separately to evaluate their behavior in terms of growth, migration and resistance to TRAIL-induced apoptosis, as well as resistance to anoikis (Figure 7). As shown in Figure 7A, the levels of TrkA and pTrkA in recovered metastatic TrkA overexpressing cells were slightly increased compared to cells before injection. No modifications in cell growth, migration and resistance to TRAIL-induced apoptosis were observed compared to TrkA overexpressing cells before injection into mice (Figure 7B-D). In contrast, the recovered metastatic TrkA overexpressing cells exhibited enhanced anoikis resistance compared to parental TrkA overexpressing cells. More importantly, TrkA inhibition with K252a totally abolished anoikis resistance of these metastatic cells (Figure 7E and F). Thus, TrkA overexpression-induced anoikis resistance was essential for the enhancement of lung metastasis.

Discussion

We first showed that TrkA was overexpressed in human breast cancer biopsies compared to normal breast tissues with levels of phospho-TrkA also higher in breast cancer biopsies. TrkA can be activated following mutation, overexpression or binding to NGF. On one hand, no mutations have been found either in breast cancer biopsies or in breast cancer cell lines including MDA-MB-231 and MCF-7 (data not shown). On the other hand, the majority of breast cancers express NGF (Adriaenssens *et al.*, 2008) which may activate TrkA in an autocrine manner. To determine the incidence of TrkA overexpression in breast cancer biology, we stably transfected MDA-MB-231 breast cancer cells with the full length TrkA isoform cDNA (the only TrkA isoform found in these cells). We showed that TrkA overexpressing cells (pooled and separated clones) exhibited increased cell proliferation, migration, invasion as well as survival. These results were further confirmed using another prototypic breast cancer cell line MCF-7. However, we had previously shown that upon NGF stimulation, endogenous TrkA is only involved in cell proliferation but not in survival of breast cancer cells (Descamps *et al.*, 2001b), this may be explained by the fact that a relatively low level of endogenous TrkA is not sufficient to activate survival pathways. Accordingly, in TrkA overexpressing cells, tyrosine receptor signaling pathways are constitutively activated, as revealed by the high levels of phospho-Akt, phospho-ERK and phospho-p38. Moreover, both PI3K-Akt pathway and ERK MAP kinase are essential in TrkA-stimulated migration and survival. Apart from PI3K-Akt and ERK pathways, p38 MAP kinase is also shown to be implicated in the survival of TrkA overexpressing cells when cultured in suspension or soft agar. This is somewhat surprising, as p38 MAP kinase is generally considered as a pro-apoptotic kinase (Wada and Penninger, 2004). However, it has been reported that p38 MAP kinase can

act in concert with ERK to mediate H-ras-induced mobility and invasion of MCF-10A human breast epithelial cells (Kim *et al.*, 2003). In fibroblast, p38 MAP kinase can also activate the pro-survival PI3K-Akt pathway (Horowitz *et al.*, 2004). Therefore, the consequences of p38 MAP kinase activation may vary according to cell context.

TrkA overexpression promoted not only cell growth *in vitro*, but accelerated also primary tumor growth *in vivo* in SCID mice. The enhanced primary tumor growth was found to be associated with increased cell proliferation and angiogenesis. These data together with our previous findings showing that inhibition of TrkA by tyrosine inhibitor K252a efficiently inhibits tumor growth and angiogenesis (Adriaenssens *et al.*, 2008) prompted us to suggest a model in which relatively low endogenous TrkA and NGF are sufficient to sustain tumor growth *via* an autocrine loop. However this loop is probably suboptimal as TrkA overexpression enables stronger signaling resulting in enhanced tumor growth and angiogenesis. NGF has already been shown to stimulate angiogenesis (Cantarella *et al.*, 2002). In addition, a correlative analysis suggests a role of NGF in ovarian cancer angiogenesis (Davidson *et al.*, 2003). It is not yet known if NGF can exert a direct and/or indirect action, as NGF can also induce the expression of pro-angiogenic factors such as VEGF (Campos *et al.*, 2007). Clearly, it needs to be clarified how TrkA overexpressing tumor cells can stimulate tumor angiogenesis, but our present findings show that TrkA impact in breast carcinogenesis may also encompass angiogenesis.

Another important finding of our work is the increased anoikis resistance in TrkA overexpressing cells. Anoikis is defined as apoptosis caused by lack of cell adhesion (Frisch and Screatton, 2001; Grossmann, 2002). However, the corresponding molecular mechanisms are not totally elucidated. We have shown that the PI3K-Akt pathway and ERK MAP kinase are essential for TrkA overexpressing breast cancer

cells to resist to anoikis. Surprisingly, anoikis resistance is independent of NGF action, as neither exogenous NGF nor neutralizing anti-NGF can modify anoikis resistance in both control and TrkA overexpressing cells. It has been recently found that in mouse embryo fibroblasts transformed by the ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase, an intact insulin-like growth factor I receptor axis is essential for suppression of anoikis (Martin *et al.*, 2006). Similarly, TrkB suppresses anoikis in rat intestinal epithelial cells through activation of the PI3K-Akt pathway (Douma *et al.*, 2004; Geiger and Peeper, 2007). In contrast, suppression of anoikis in ovarian carcinoma cells through E-cadherin-mediated activation of ErbB1 requires induction of the Ras-ERK1/2 cascade but not PI3K-Akt (Shen and Kramer, 2004). Moreover, other pathways such as Janus-activated kinase-signal transducers and activators of transcription-3 signaling are also implicated in anchorage-independent growth (Zhang *et al.*, 2006). It is therefore likely that cell context is important for determining the exact molecular mechanisms used for this process (Frisch and Sreaton, 2001; Grossmann, 2002). The common theme is that the activation of tyrosine kinases may be critical for suppression of anoikis in tumor cells. Acquisition of resistance to anoikis may allow survival of cancer cells during systemic circulation and facilitate tumor dormancy or metastasis in distant organs. Accordingly, a functional genomic screening for genes that suppress anoikis leads to the identification of neurotrophic receptor TrkB as an oncoprotein associated with metastatic capacity (Douma *et al.*, 2004). Overexpression of TrkB renders normal intestinal epithelial cells anoikis resistant and highly tumorigenic. Moreover, TrkB overexpressing cells form highly invasive and metastatic tumors in nude mice. To our knowledge, we are the first to show that TrkA overexpression can promote breast tumor metastasis by enhancing anoikis resistance. However, given the complexity of metastatic process, cancer

cells must acquire a series of traits that enable them to overcome multiple barriers erected by normal tissues. The observed enhancement in cell migration and invasion may also potentiate metastasis of TrkA overexpressing cells. Therefore, the enhanced signaling of TrkA following its overexpression can endow cancer cells with various capacities for metastasis. Our findings provide also molecular mechanisms for the observation that pleural effusions of breast cancers present high levels of pTrkA compared to corresponding primary tumors (Davidson *et al.*, 2004).

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

Materials and Methods

Human breast biopsies and animals

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

Cell culture, transfection and generation of TrkA overexpressing cancer cells

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

cells were selected by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The selected cells expressed similar levels of GFP, and presented the same properties as their parental cells in terms of TrkA expression, cell morphology, migration and growth.

Quantitative real-time PCR

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

TrkA isoforms were determined using specific PCR as described by Tacconelli et al (2004).

Western blot analysis

The proteins were separated by SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes (Whatman, Germany). Blots were blocked and then probed with antibodies against TrkA (1:500 dilution, cell signalling), phospho-TrkA (1:1,000 dilution; Santa Cruz Biotechnology), Akt (1:1,000 dilution; Cell Signaling), phospho-Akt (Ser473; 1:400 dilution; Cell Signaling), extracellular signal-regulated kinase

(ERK; 1:1,000 dilution; Cell Signaling), phospho-ERK (Tyr204; 1:1000 dilution; Cell Signaling), p38 (1:1,000 dilution, Cell Signaling), phospho-p38 (1:1,000 dilution, Cell Signaling) and β -actin (1:5,000 dilution; Sigma). After washing, the blots were incubated with horseradish peroxidase–conjugated secondary antibodies and visualized by Western pico signal reagent (Pierce).

Assays of cell behaviour in culture

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

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

Wound-healing assay. Cells were plated onto a 35 mm culture dish and allowed to form a confluent monolayer then wounded using a pipette tip. Cells were then treated

with 200 ng/ml NGF for further 24 h in EMEM containing 0.1% FCS. Wounded cultures were photographed at the beginning and the end of the experiment.

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

Anoikis assay. Cells were seeded on poly-HEMA (15 mg/ml, Sigma)-coated 96 wells plates (1×10^5 cells/well) in EMEM 1% FCS and cultured in the presence or absence of NGF (200 ng/ml) for different periods of time. Cell viability was analyzed by MTS assay (Promega) according to the user manual.

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

Apoptosis analysis. Cells were starved in serum-free medium (12 h) and then pretreated with 200 ng/ml NGF (1 h) before treatment with 5 ng/ml TRAIL in the presence of NGF for 6 h. Apoptosis was determined by morphological analysis as previously described (Lagadec *et al.*, 2008).

Pharmacological inhibition. Specific inhibition was performed with 10 nM K252a, 15 μM LY294002, 15 μM Akt inhibitor III, 10 μM U0126, or 10 μM p38 inhibitor II, all from Calbiochem. Control cells were treated with DMSO at 1:1000 dilution.

Tumor growth in SCID mice

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

calculating the volume as $\frac{\pi}{6} lw \frac{(l+w)}{2}$.

Immunohistochemistry and TUNEL staining

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

with Dako Glycergel (Dakocytomation). All sections were washed (3x5 min) with washing buffer (pH 7.6) after each step. Substitution of the primary antibody with PBS was used negative control. For terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) assay, tissue sections were rehydrated and then incubated with proteinase K for 30 min at 37°C. Apoptotic cells were detected by the TUNEL assay *in situ* cell death detection kit (Roche Molecular Biochemicals) according to the manufacturer's instructions. Positive TUNEL staining was visualized using SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets (Sigma-Aldrich).

Computer-assisted image analysis

The immunostained cells were quantitatively analyzed using a computer-assisted image analysis system as previously described (Jallal *et al.*, 2007). Briefly, images of stained sections were captured with an Olympus digital camera and processed using Photoshop CS3 extended edition (Adobe System). The total pixel areas (in pixel square) of stained cells and of all cells were quantified by the software. The percentages of stained cells in the microscopic field were then calculated.

Assessment of metastasis

GFP-positive cells were subcutaneously injected into flanks (2×10^6 cells/flank) of 8-weeks-old SCID mice as described above. Once the average tumor size approached 2 cm^3 , the mice were sacrificed and their lung, liver and brain were removed for further analysis. The organs were cut to 2 parts: one half for histological analysis, the other half was digested with enzymes (2.5 mg/ml trypsin, 0.5 mg/ml collagenase XI, 0.5 mg/ml hyaluronidase) for 1 h at 37°C before quantification of metastatic cells (GFP-positive) by FACS analysis. Cultured GFP-positive MDA-MB-231 cells were

used as positive control. Cells derived from lung, liver and brain of a mice injected with GFP-negative MDA-MB-231 cells were used as negative control. To recultivate metastatic cells from lungs, enzymatic digests were washed once in 10 ml EMEM 10% FCS and seeded in cell culture dishes in EMEM 10% FCS with 800 µg/ml hygromycin for 2-3 weeks. Selected tumor cells were confirmed after examination of GFP expression under fluorescent microscopy.

Statistical analysis

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

Acknowledgments

Grant support: INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2006), le Ministère de l'Education Nationale and la Région Nord/Pas-de-Calais plus the FEDER. Chann Lagadec was the recipient of a fellowship from l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

References

- Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, Mougel A, Page A, Romon R et al. (2008). Nerve Growth Factor is a Potential Molecular Target in Breast Cancer. *Cancer Res* **68**:346-351.
- Campos X, Munoz Y, Selman A, Yazigi R, Moyano L, Weinstein-Oppenheim C et al. (2007). Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **104**:168-175.
- Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P et al. (2002). Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *Faseb J* **16**:1307-1309.
- Chao MV. (1994). The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* **25**:1373-1385.
- Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, Cantarella G, Bianchi A, Bernardini R. (2001). Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* **61**:3002-3008.
- Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Ann Florenes V, Nielsen S, Nesland JM. (2004). Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* **83**:119-128.
- Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Nesland JM, Skrede M, Risberg B et al. (2003). Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**:2248-2259.
- Descamps S, Pawlowski V, Revillion F, Hornez L, Hebbar M, Boilly B et al. (2001a). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res* **61**:4337-4340.

- Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V et al. (2001b). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* **276**:17864-17870.
- Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V, Hondermarck H. (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* **22**:5592-5601.
- Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, Peeper DS. (2004). Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* **430**:1034-1039.
- Frisch SM, Screaton RA. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **13**:555-562.
- Geiger TR, Peeper DS. (2007). Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis. *Cancer Res* **67**:6221-6229.
- Grossmann J. (2002). Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* **7**:247-260.
- Horowitz JC, Lee DY, Waghray M, Keshamouni VG, Thomas PE, Zhang H et al. (2004). Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *J Biol Chem* **279**:1359-1367.
- Jallal H, Valentino ML, Chen G, Boschelli F, Ali S, Rabbani SA. (2007). A Src/Abl kinase inhibitor, SKI-606, blocks breast cancer invasion, growth, and metastasis in vitro and in vivo. *Cancer Res* **67**:1580-1588.

- Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P et al. (2006). Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* **116**:1561-1570.
- Kim MS, Lee EJ, Kim HR, Moon A. (2003). p38 kinase is a key signaling molecule for H-Ras-induced cell motility and invasive phenotype in human breast epithelial cells. *Cancer Res* **63**:5454-5461.
- Lagadec C, Adriaenssens E, Toillon RA, Chopin V, Romon R, Van Coppenolle F et al. (2007). Tamoxifen and TRAIL synergistically induce apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* **27**:1472-1477.
- Martin MJ, Melnyk N, Pollard M, Bowden M, Leong H, Podor TJ et al. (2006). The insulin-like growth factor I receptor is required for Akt activation and suppression of anoikis in cells transformed by the ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* **26**:1754-1769.
- McGregor LM, McCune BK, Graff JR, McDowell PR, Romans KE, Yancopoulos GD et al. (1999). Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:4540-4545.
- Mercurio AM, Lipscomb EA, Bachelder, RE. (2005). Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**:283-290.
- Mukai J, Suvant P, Sato TA. (2003). Nerve growth factor-dependent regulation of NADE-induced apoptosis. *Vitam Horm* **66**:385-402.
- Reichardt LF. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**:1545-1564.
- Ricci A, Greco S, Mariotta S, Felici L, Bronzetti E, Cavazzana A et al. (2001). Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**:439-446.

- Sawaki M, Ito Y, Tada K, Mizunuma N, Takahashi S, Horikoshi N et al. (2004). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in heavily pretreated patients with HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Tumori* **90**:40-43.
- Shen X, Kramer RH. (2004). Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor. *Am J Pathol* **165**:1315-1329.
- Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Desantis G, Tessitore A, Vetuschci A et al. (2004). TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* **6**:347-360.
- Tagliabue E, Castiglioni F, Ghirelli C, Modugno M, Asnaghi L, Somenzi G et al. (2000). Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* **275**:5388-5394.
- Toillon RA, Magne N, Laios I, Castadot P, Kinnaert E, Van Houtte P et al. (2007). Estrogens decrease gamma-ray-induced senescence and maintain cell cycle progression in breast cancer cells independently of p53. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **67**:1187-1200.
- Ursini-Siegel J, Schade B, Cardiff RD, Muller WJ. (2007). Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nat Rev Cancer* **7**:389-397.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L et al. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **20**:719-726.
- Wada T, Penninger JM. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**:2838-2849.
- Weeraratna AT, Arnold JT, George DJ, DeMarzo A, Isaacs JT. (2000). Rational basis for Trk inhibition therapy for prostate cancer. *Prostate* **45**:140-148.

Zhang W, Zong CS, Hermanto U, Lopez-Bergami P, Ronai Z, Wang LH. (2006).

RACK1 recruits STAT3 specifically to insulin and insulin-like growth factor 1 receptors for activation, which is important for regulating anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol* **26**:413-424.

Zhu Z, Friess H, diMola FF, Zimmermann A, Graber HU, Korc M et al. (1999). Nerve

growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol* **17**:2419-2428.

Legends

Figure 1

Detection of TrkA and phospho-TrkA (pTrkA) in breast biopsies. **(A)** Quantitative PCR detection of TrkA mRNA in breast biopsies. Eight normal breast tissues and 14 tumor biopsies (mainly infiltrating ductal carcinomas) were used. Levels of TrkA mRNA in individual samples are expressed as relative quantity compared to that expressed by mock MDA-MB-231 breast cancer cells. **(B)** Western blot analysis of TrkA and pTrkA. Cancer biopsies used are infiltrating lobular carcinomas (IL), infiltrating ductal carcinomas (ID) and infiltrating mixed carcinomas (IM). **(C)** and **(D)**, TrkA **(C)** and pTrkA **(D)** staining of breast cancer tissue microarrays. Breast cancer tissue microarrays (Cliniscience) included 10 normal breast samples and 37 tumor breast samples (2 ductal carcinomas *in situ*, 3 infiltrating lobular carcinomas, 32 infiltrating ductal carcinomas). Representative staining of normal tissue, infiltrating lobular carcinoma and infiltrating ductal carcinoma are shown. Histograms represent mean of results from 2 independent experiments. *, $p < 0.01$, significant difference compared to normal breast tissues.

Figure 2

Generation of TrkA overexpressing cells. MDA-MB-231 cells were stably transfected with pcDNA3.1 expression vector containing the full length sequence of TrkA cDNA. Cells were selected as pools and/or single clones. **(A)** Real time RT-PCR quantification of TrkA mRNA. Normalization was performed with RPLP0 gene expression. * $p < 0.01$, TrkA overexpressing *versus* mock cells. **(B)** Western blots of TrkA and pTrkA. Mock, pools of empty vector-transfected cells; TrkA, pools of cells

overexpressing TrkA; c1, TrkA overexpressing clone 1; c2, TrkA overexpressing clone 2.

Figure 3

Pleiotropic *in vitro* effects of TrkA overexpression. **(A)** Growth assay on standard culture plastic. Cells were cultured with or without NGF for different periods of time. **(B)** Migration assay using Transwells. Cells were treated with NGF for 6 h. **(C)** Representative photographs of wound-healing assay. Cells were treated with NGF for 24 h. **(D)** Matrigel invasion assay using Transwells. Cells were treated with NGF for 16 h. **(E and F)** Anoikis assay. Cells were seeded in poly-HEMA-coated 96-wells plates and cultured with or without NGF for different periods of time. Cell viability was determined by MTS. **(G and H)** Colony formation in soft agar. Cells were treated with NGF at the beginning of the experiments. Colonies of more than 50 cells were counted after 3 weeks of culture. **(I)** Resistance to apoptosis induction by TRAIL. All results are mean of at least 3 independent experiments. * $p < 0.01$, TrkA overexpressing *versus* mock cells; ¥, $p < 0.01$, NGF-treated *versus* NGF-non treated mock cells; #, $p < 0.01$, NGF-treated *versus* NGF-non treated TrkA overexpressing cells.

Figure 4

Involvement of PI3K-Akt and ERK/p38 MAP Kinases in TrkA-mediated biological effects. **(A)** Cells were treated in EMEM serum free-medium for 30 min with specific pharmacologic inhibitors. Lysates were made and subjected to immunoblot using the indicated antibodies. **(B)** Migration assay using Transwells in the presence of different inhibitors for 6 h. **(C)** Anoikis assay in the presence of different inhibitors for 72 h. Anoikis resistance was quantified by MTS. **(D)** Colony formation in soft agar in

the presence of different inhibitors for 3 weeks. For B-D, results are mean of 3 independent experiments. *, $p < 0.01$, inhibitors-treated *versus* untreated TrkA overexpressing cells.

Figure 5

Xenograft tumor growth in SCID mice. **(A)** Cells (2×10^6) were subcutaneously injected into mice (9 mice per group). Tumor growth was monitored weekly until mean tumor volume approached 2 cm^3 . Results are mean of 3 independent experiments. *, $p < 0.01$, TrkA overexpressing *versus* mock cells. **(B)** Paraffin sections from tumors were stained using TUNEL, anti-PCNA or anti-vWF antibodies. *, $p < 0.01$, TrkA overexpressing *versus* mock cells.

Figure 6

Metastasis assessment in lung, liver and brain. GFP-mock or GFP-TrkA overexpressing cells were subcutaneously injected into SCID mice. When tumor volume approached 2 cm^3 , mice were sacrificed; lung, liver and brain were removed and digested with trypsin, collagenase XI and hyaluronidase to obtain individual cells. Metastasis was quantified by FACS analysis of GFP-positive cells. Histograms represent mean of results from 8 mice injected with mock cells and 9 mice injected with TrkA overexpressing cells. *, $p < 0.01$, TrkA overexpressing *versus* mock cells. Paraffin sections of lung, liver and brain were stained with nuclear red and picroindigo carmine. Arrows indicate metastatic cells.

Figure 7

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

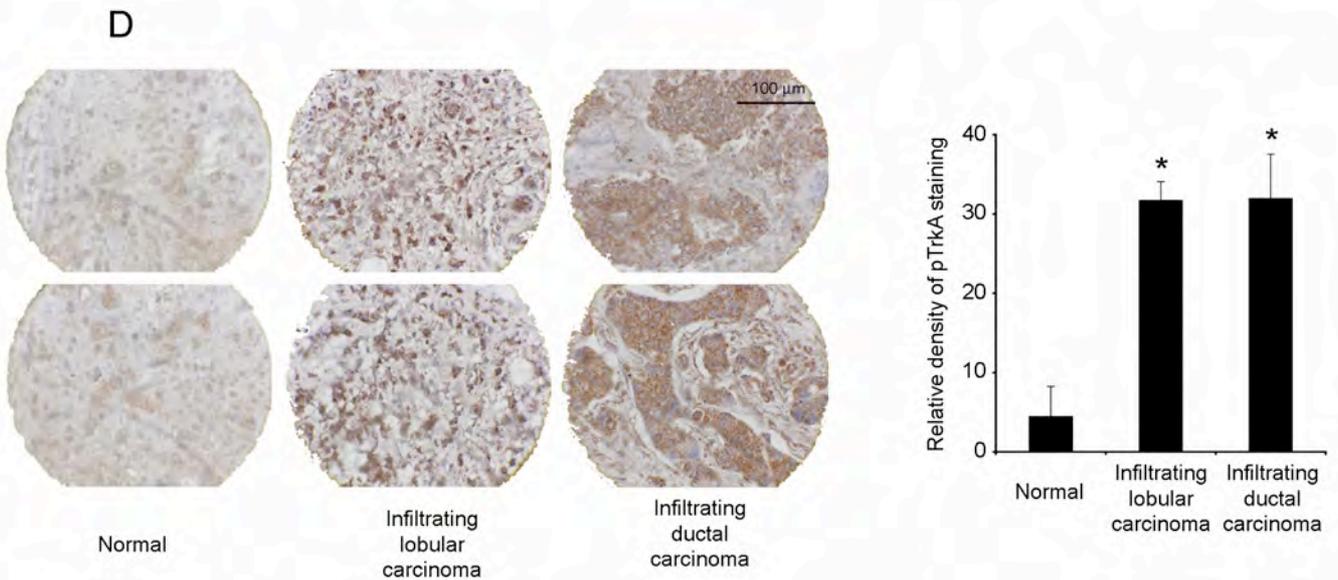
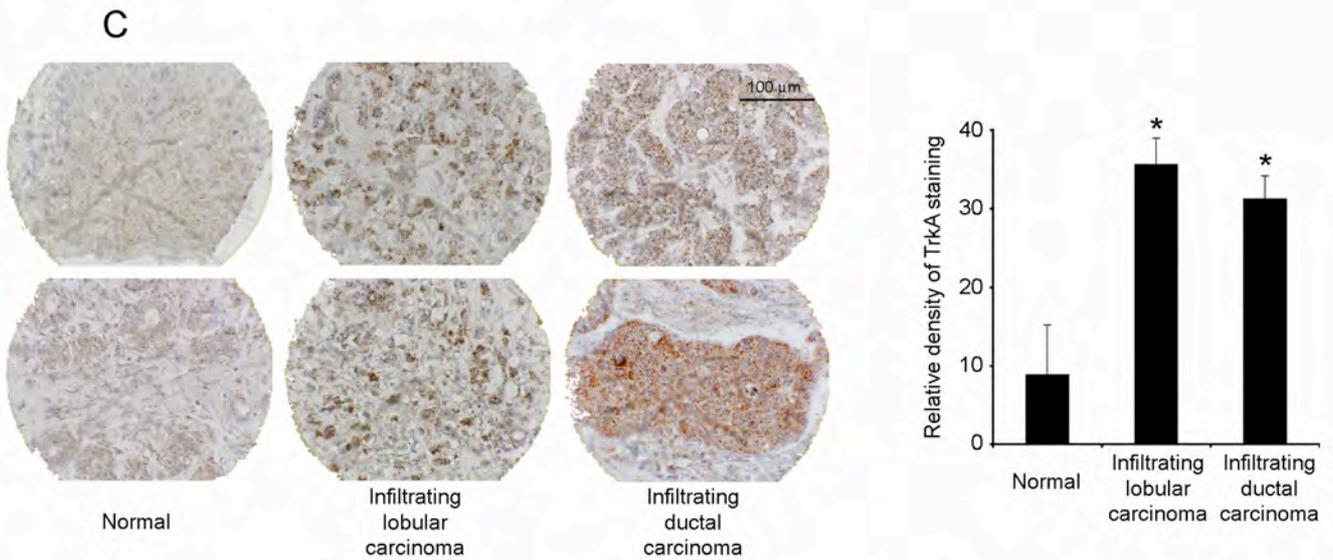
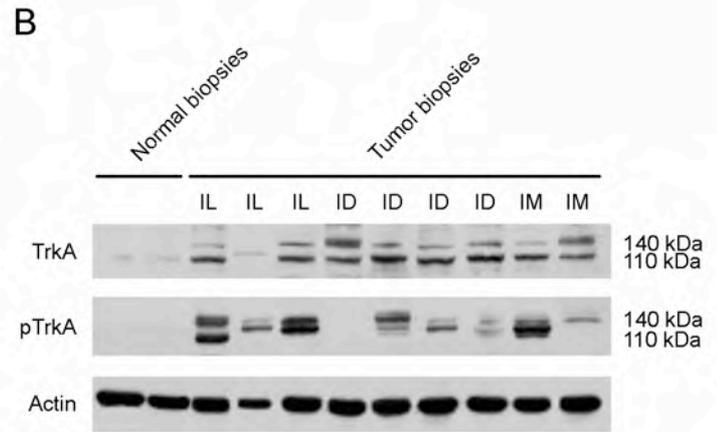
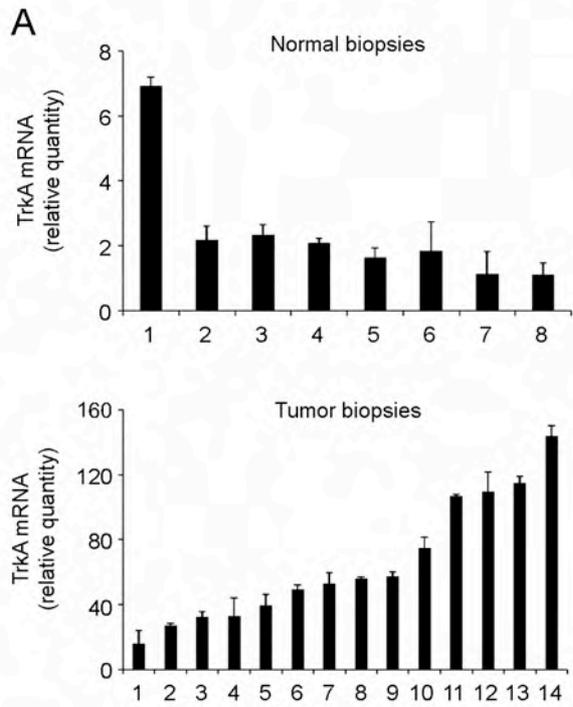
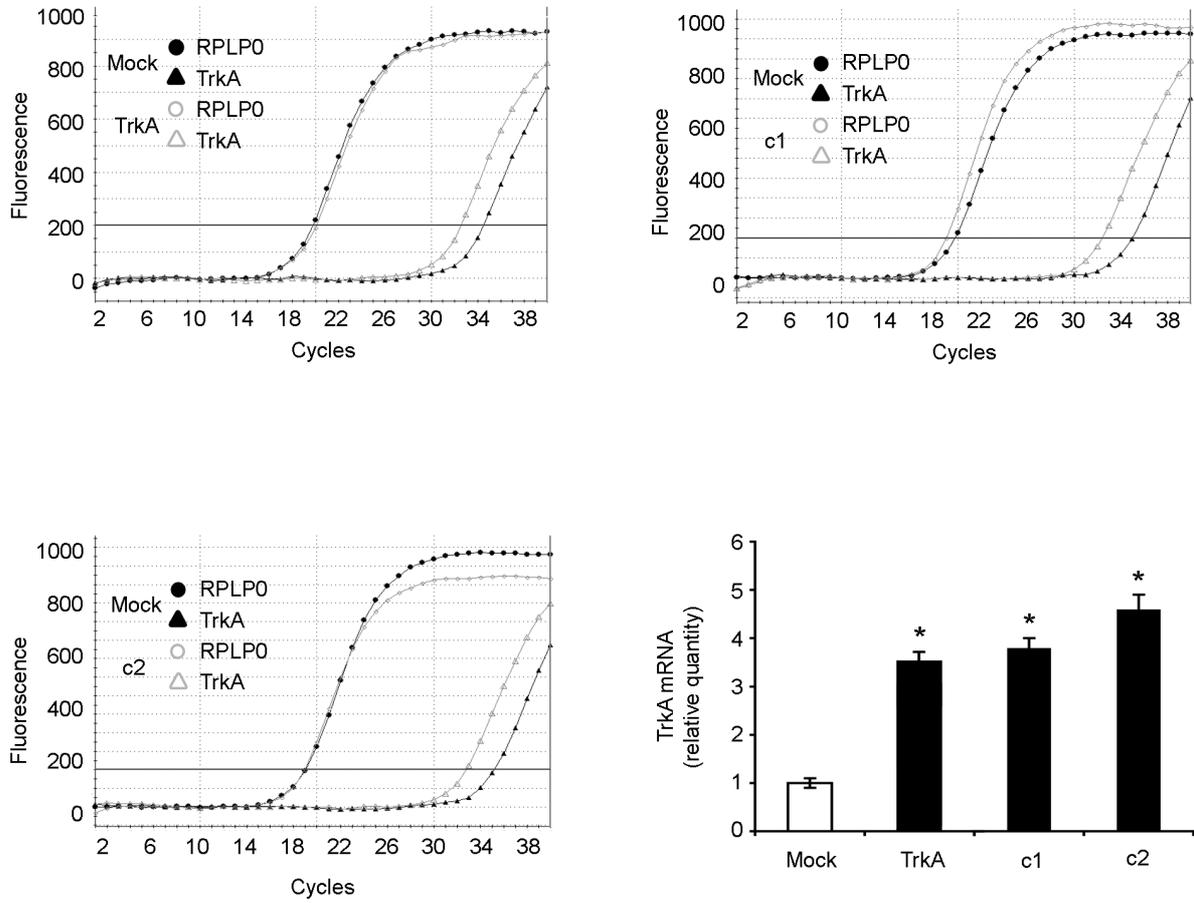


Figure 1

A



B

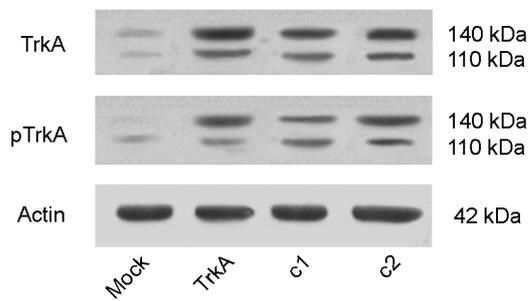


Figure 2

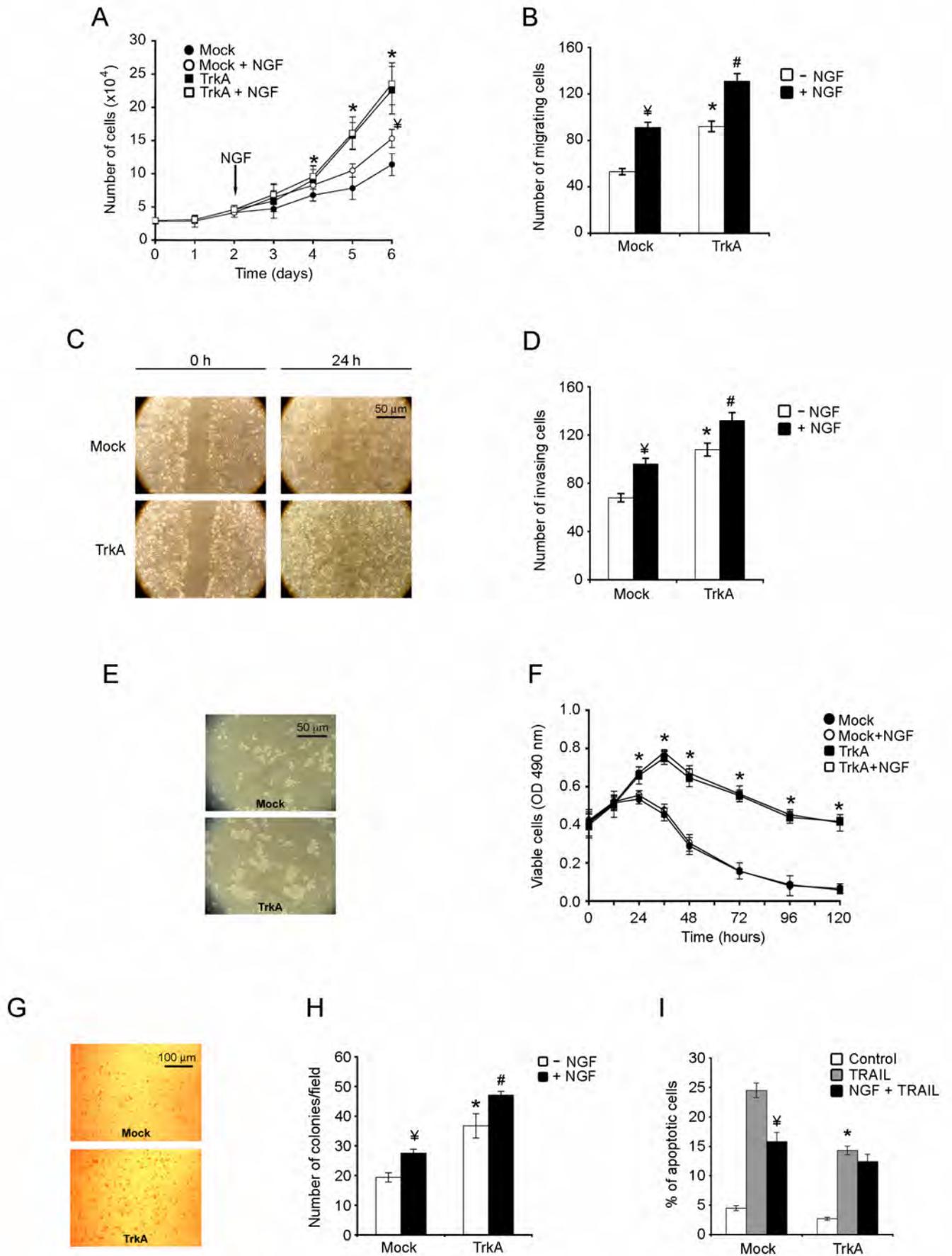


Figure 3

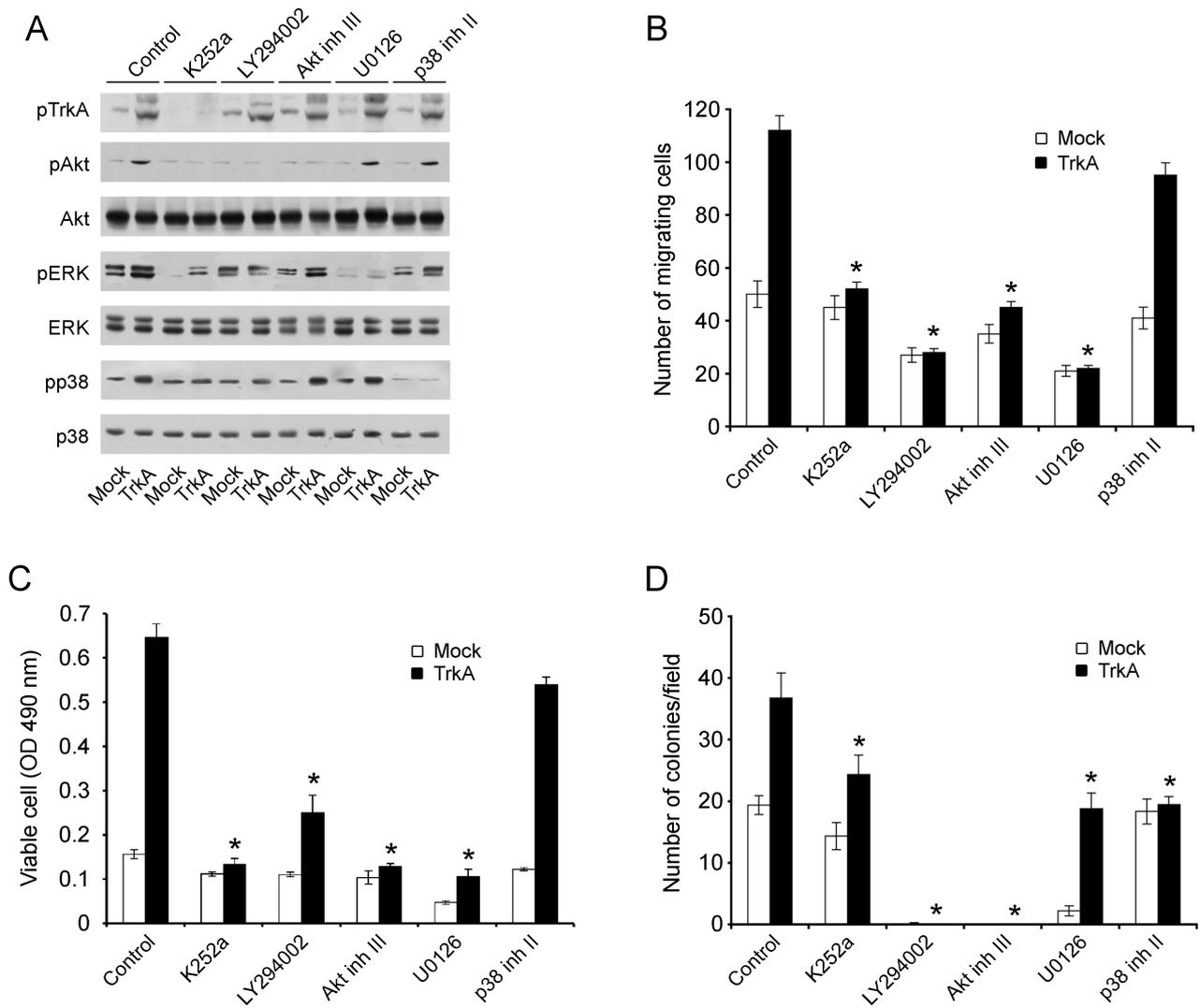
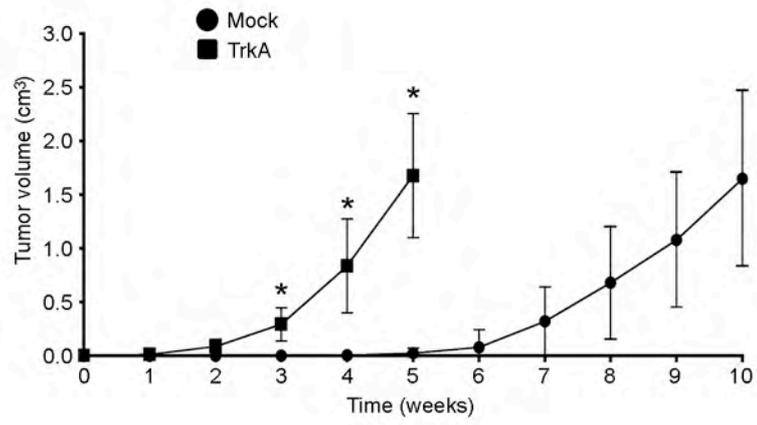


Figure 4

A



B

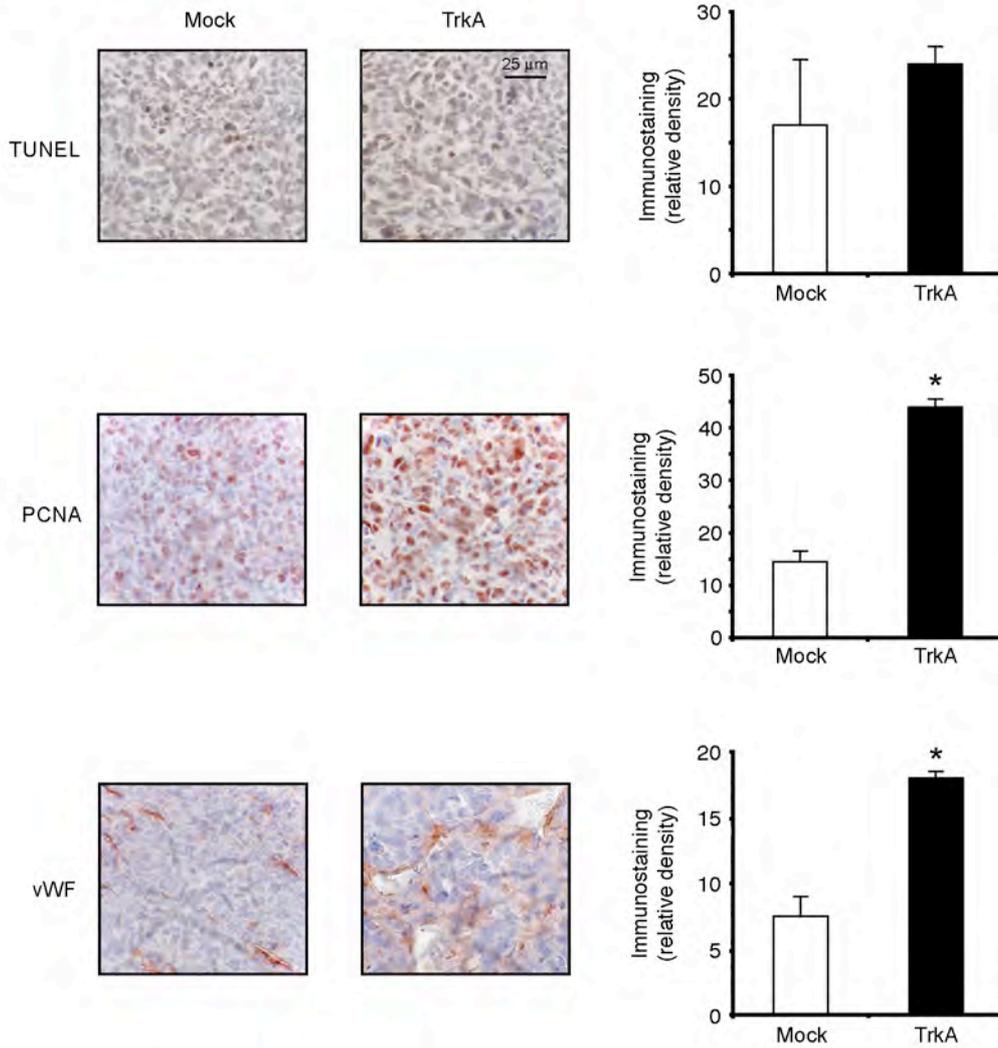


Figure 5

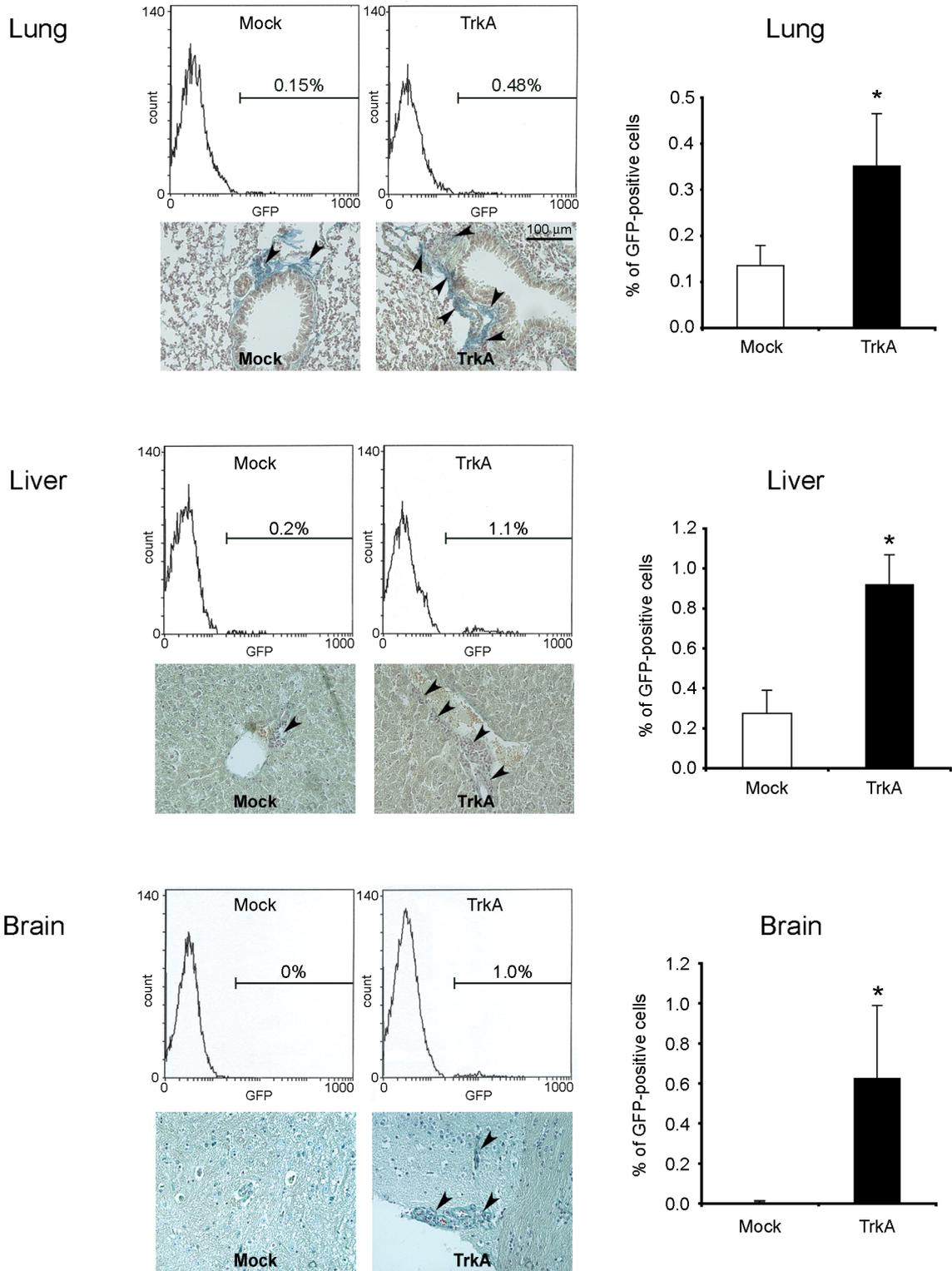


Figure 6

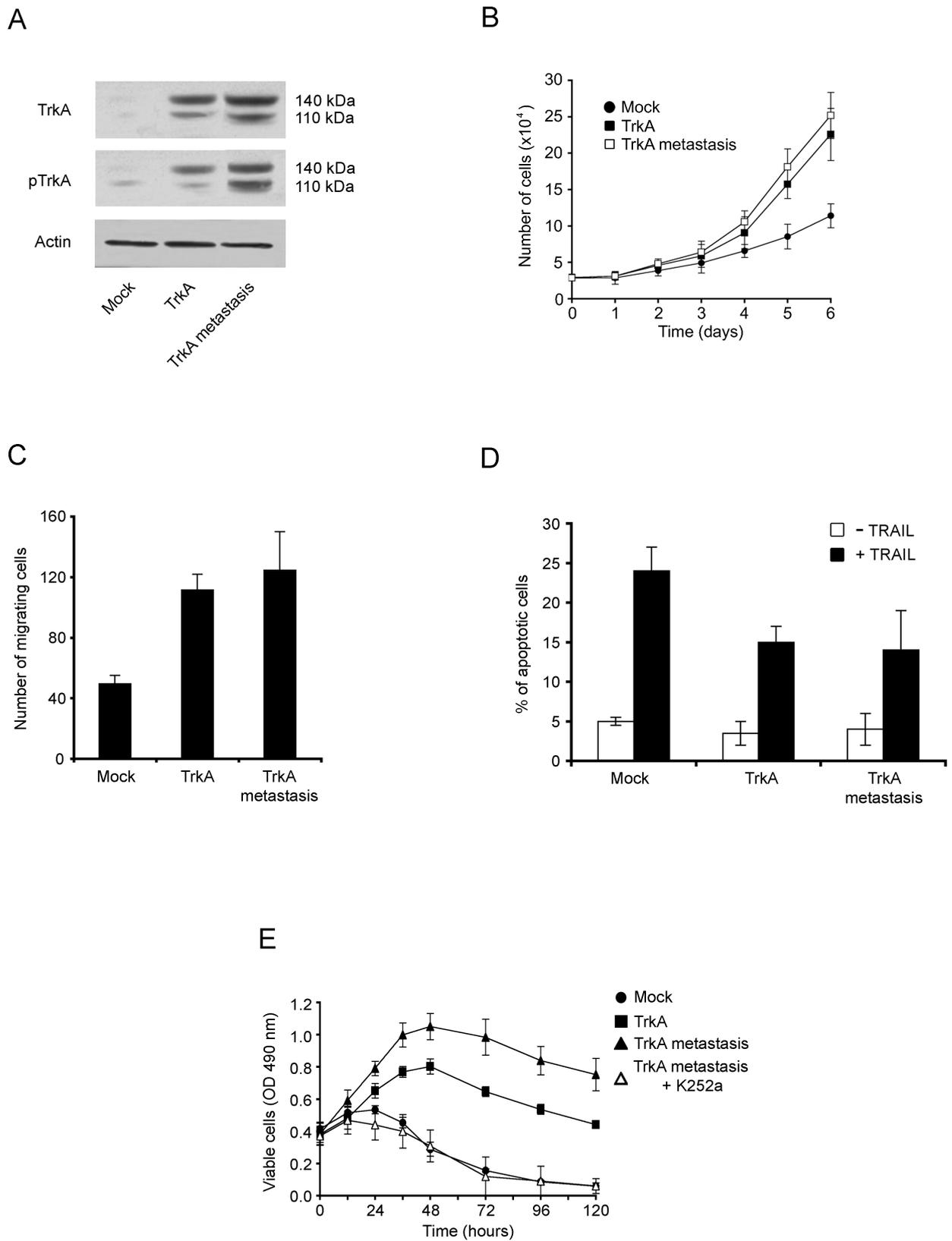
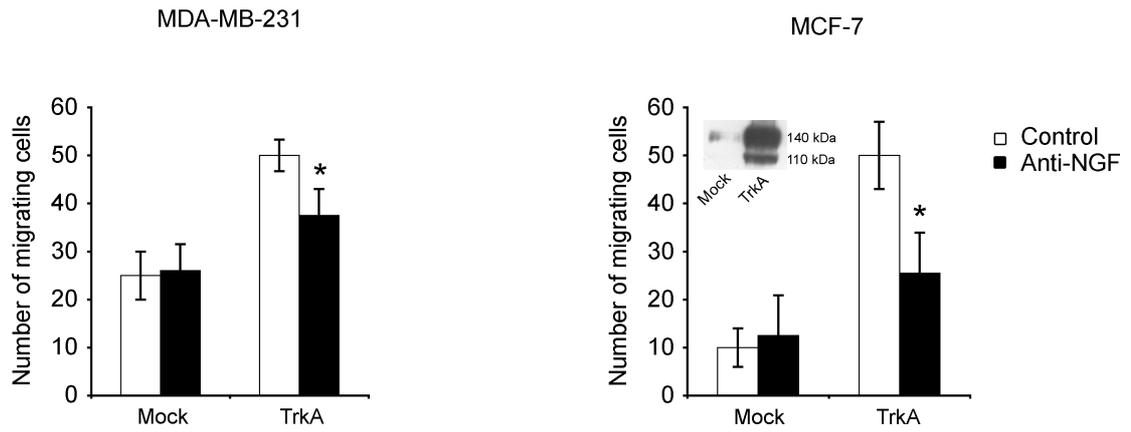
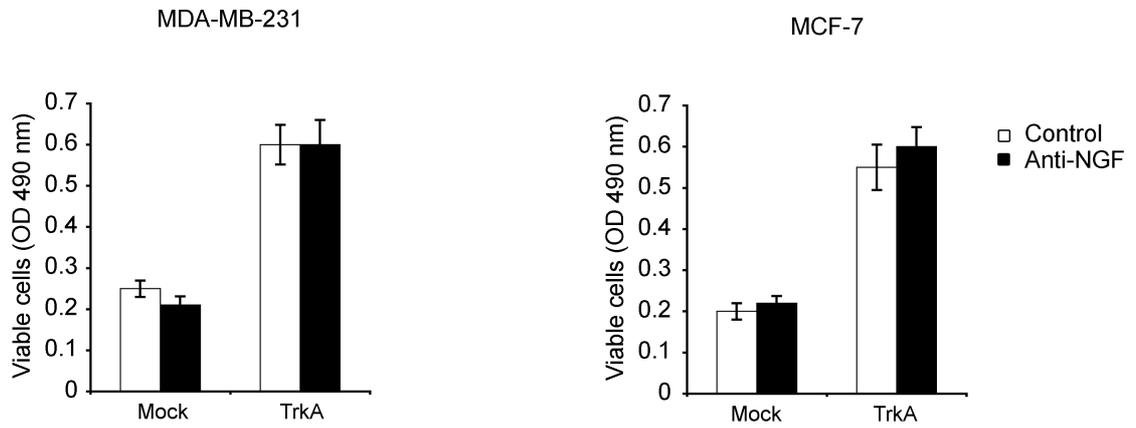


Figure 7

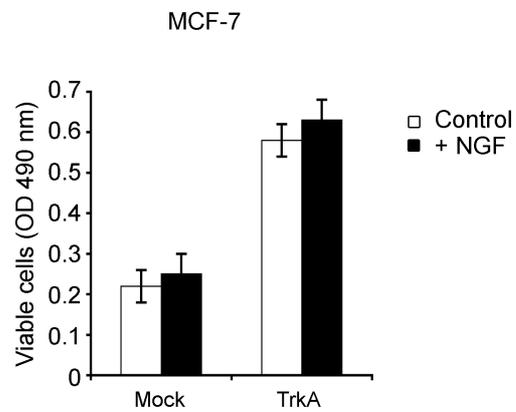
A



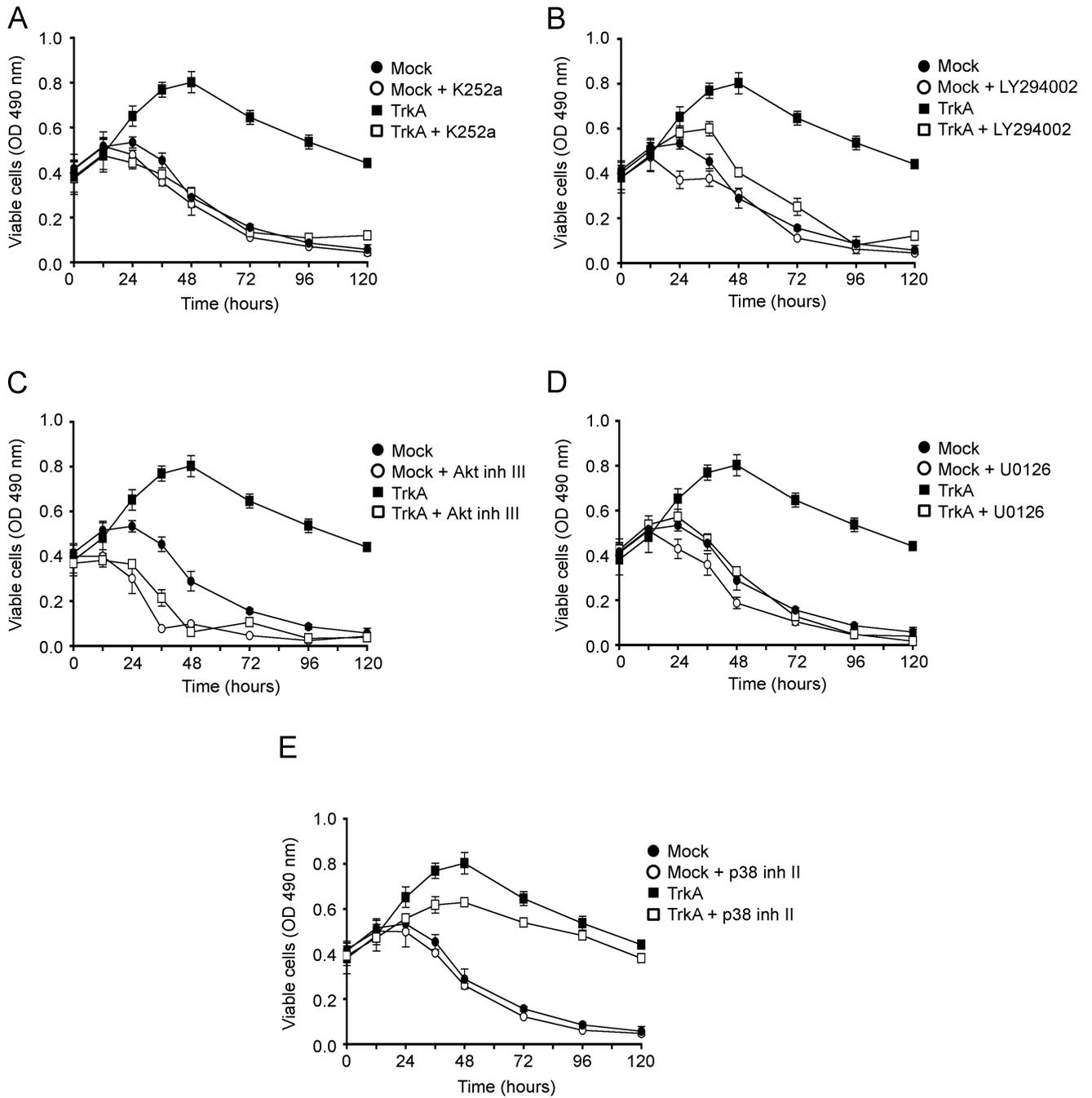
B



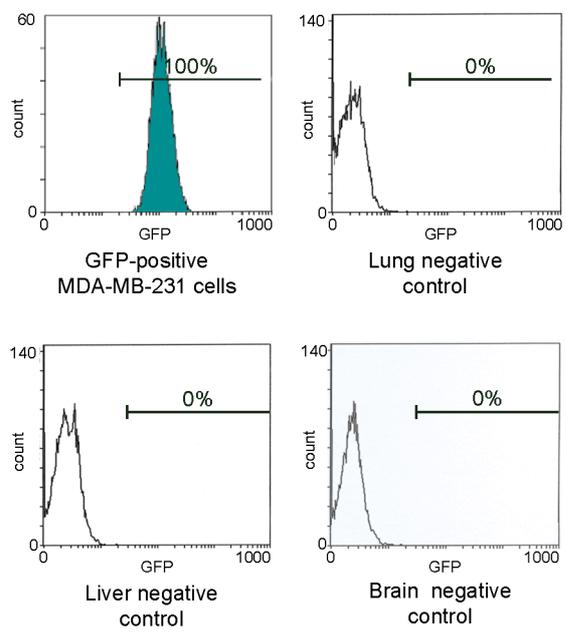
C



Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3

Supplementary data

Legend to Supplementary Figure 1

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

Legend to Supplementary Figure 2

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

Legend to Supplementary Figure 3

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

**Valorisation des compétences, le nouveau
chapitre de la thèse**

Annexe 2 : Nouveau chapitre de la thèse

Annexe 2 : Nouveau chapitre de la thèse

Ce travail est une synthèse et une réflexion sur mes travaux de recherche. Il constitue le programme « valorisation des compétences, un nouveau chapitre de la thèse » réalisé avec le soutien et l'accompagnement de l'association Bernard Grégory. Il a pour vocation de valoriser l'expérience acquise au cours de la préparation du doctorat sur le marché du travail, qu'il s'agisse du secteur privé ou public. La thèse est ici résumée de façon à être accessible à tout public. J'y ai ensuite exposé le contexte, le déroulement et les différents enjeux de ma thèse. Un bilan financier a été réalisé. J'ai enfin détaillé les différentes compétences développées lors de mon travail de thèse. Ce travail effectué d'avril à juillet 2007 a été soutenu en public à la fin de ma 3^{ème} année de thèse avant l'obtention de mon financement ARC pour une 4^{ème} année de thèse, par conséquent celle-ci n'y figure pas.

PRÉSENTATION & CONTEXTE GÉNÉRAL de la THÈSE

Grâce à un DUT, je me suis familiarisée avec divers aspects de la biologie médicale qui m'intéressaient, c'est-à-dire le côté technique et expérimental corrélé à une recherche intellectuelle. Un stage en oncologie a fini de me séduire et de me convaincre d'effectuer une thèse dans la recherche fondamentale en cancérologie. Lors de ma formation universitaire, j'ai été intéressée par la biologie cellulaire et la biologie moléculaire et par la génétique. J'ai alors entrepris d'effectuer mon DEA dans un laboratoire de cancérologie qui proposait une combinaison de biologie cellulaire et moléculaire. L'équipe du Pr. Hubert Hondemarc offrait une expertise dans tous ces domaines et me permettait d'acquérir les compétences techniques et scientifiques que je recherchais. J'ai accepté de m'investir dans un sujet qui s'est avéré passionnant dans une équipe jeune, dynamique et très à l'écoute. J'ai ensuite débuté ma thèse proprement dite sur un sujet neuf mais en relation directe avec le sujet originel de l'équipe.

DESCRIPTION du PROJET de THÈSE

Ma thèse se déroule dans le cadre de l'école doctorale biologie santé de Lille, au sein du laboratoire INSERM-ERI-8 JE-2488 de l'université Lille 1. J'y étudie « l'expression et les effets biologiques des neurotrophines (NT) dans le cancer du sein ».

L'équipe du Pr Hondemarc travaille particulièrement sur l'implication d'un facteur de croissance appelé Nerve Growth factor (NGF) dans le cancer du sein. Le NGF agit sur la

Annexe 2 : Nouveau chapitre de la thèse

cancérisation en stimulant fortement la croissance des cellules de cancer du sein, celle-ci passe à la fois par une multiplication accrue et par une survie face à des drogues anticancéreuses. De tels résultats nous ont conduits à supposer des rôles tout aussi importants joués par les autres membres de la famille des neurotrophines dans le cancer du sein. Ma thèse a donc pour objectif de déterminer l'expression ainsi que les effets biologiques des 3 autres neurotrophines dans le cancer du sein. La mise en place de mon sujet, nouveau dans le laboratoire, a d'abord nécessité de nombreuses mises au point et j'ai alors pu démontrer l'implication de 2 autres neurotrophines dans la survie des cellules de cancer du sein. Ainsi ma thèse contribue-t-elle à définir le rôle des neurotrophines dans la cancérisation de la glande mammaire.

Enjeux médicaux

Les facteurs de croissance orchestrent la progression tumorale et donc la cancérisation, et une étude approfondie de leur mécanisme d'action est nécessaire pour une meilleure compréhension de la cancérogenèse mammaire et la conception de stratégies thérapeutiques innovantes. Par ailleurs, malgré les progrès considérables en terme de diagnostic et de traitements du cancer du sein, il reste une cause majeure de décès et 42 000 nouveaux cas sont référencés tous les ans en France. La mise en évidence de marqueurs précoces (sanguins ou urinaires) d'apparition d'une tumeur est donc un enjeu essentiel lorsque l'on sait qu'aujourd'hui seule la mammographie (radiographie) permet aux cliniciens de détecter l'émergence d'une tumeur mammaire. Les thérapies utilisées sont encore très agressives et rarement ciblées au niveau de la tumeur (chimiothérapie, radiothérapie). C'est pourquoi la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques présentes dans toutes les tumeurs mammaires est indispensable. Ma démarche s'inscrit dans cette voie et a pour objectif de déterminer l'implication des neurotrophines et leur intérêt potentiel comme marqueur et/ou cible thérapeutique dans le cancer du sein.

Contexte de ma thèse

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mon DEA puis ma thèse a pour thématique les facteurs de croissance dans le cancer du sein. Mon arrivée au laboratoire en septembre 2003 coïncide avec la labellisation de l'équipe par l'INSERM (décembre 2003) et donc à une harmonisation des thématiques du laboratoire autour du NGF puis des neurotrophines. En effet, jusqu'alors

Annexe 2 : Nouveau chapitre de la thèse

le laboratoire s'organisait autour de 3 thématiques dans le cancer du sein, l'étude des facteurs de croissance en général, du gène H19 et de la mort cellulaire (apoptose).

Le laboratoire réorganisé scientifiquement et administrativement a décroché une labellisation « Ligue contre le cancer » depuis janvier 2005. Il fait également partie de la Cancéropole Nord-Ouest et de l'IFR 147 : « Protéomique et Glycobiologie ». Nous disposons de nombreux équipements sur le site, j'ai notamment utilisé très régulièrement l'appareil de PCR en temps réel puis le nanoDrop du Pr Delannoy (laboratoire de glycobiologie, C9, USTL).

Organisation du laboratoire :

Directeur du laboratoire et de ma thèse : Pr Hubert Hondermarck.

Professeurs	2	Maîtres de conférence	5	Personnels techniques	2
Doctorants	6	Masters Recherche	2		

Sur un plan international, les neurotrophines et leurs récepteurs sont très étudiés notamment pour leur propriétés de maintien des fonctions neuronales et donc pour leur intérêt dans les maladies neurodégénératives (Alzheimer). En revanche, malgré la découverte de leur implication dans bon nombre de cancers non neuronaux (prostate, pancréas, ovaire...), leur mode d'action dans ces modèles reste peu étudié et donc peu connu. Dans le cancer du sein, seule l'influence du NGF est à ce jour analysée (5 équipes dans le monde, Etats-Unis, Israël, Italie, Japon, Turquie), et personne n'a encore publié sur le rôle des autres neurotrophines dans cette pathologie. C'est pourquoi la concurrence est très rude et des collaborations directes s'avèrent difficiles.

DÉROULEMENT, GESTION & COÛT de la THÈSE

Préparation et cadrage du projet

J'ai débuté mon DEA, alors que le laboratoire entamait une réorientation des thématiques, par l'étude des effets de l'inhibition du NGF à la fois en modèle cellulaire (*in vitro*) et en modèle animal (*in vivo*). Mon travail de DEA s'est inscrit dans la continuité des travaux précédents sur le NGF sous la direction du directeur de laboratoire, le Pr. Hubert Hondermarck et de mon co-encadrant, le Dr Eric Adriaenssens. Puis, j'ai entrepris l'étude des

Annexe 2 : Nouveau chapitre de la thèse

autres neurotrophines dans le cancer du sein, c'est donc sur un sujet neuf et inexploré que j'ai débuté ma thèse.

Mon projet de thèse comportait 2 grandes questions étroitement liées : des réponses obtenues à la première découlait l'étude entreprise pour répondre à la deuxième.

- Les autres neurotrophines sont-elles exprimées par les cellules cancéreuses et normales de sein ?

- Les autres neurotrophines ont-elles des effets biologiques sur les cellules de cancer du sein ?

Avant mon arrivée au laboratoire, aucune étude n'avait été menée au sein de l'équipe, et aucune publication ne traitait de ce sujet. Cependant, la littérature décrivait des situations analogues, c'est-à-dire une intervention des NT autres que le NGF, dans d'autres modèles comme les cancers de la prostate, des ovaires ou du pancréas. L'exploration de l'implication éventuelle des autres neurotrophines dans le sein était un travail long et assez risqué. Seules les études faites dans les autres modèles permettaient d'espérer des résultats exploitables et publiables.

Dans un premier temps, j'ai défini, grâce à une recherche bibliographique et le concours de mes encadrants, les techniques utiles à l'exploration de l'expression des neurotrophines dans le modèle du cancer du sein. La mise en place des techniques souvent innovantes (PCR en temps réel, puces à ADN, spectrométrie de masse,...) a requis les compétences de nombreux chercheurs et thésards qui m'ont aidés à les adapter à mon étude. Cette première grande exploration sollicitait également l'utilisation de matériel biologique spécifique comme des biopsies tumorales et normales de sein. Une collaboration avec des partenaires hospitaliers existait déjà et sera mise à profit pour mon projet.

Pour réaliser ce projet, les moyens mis à notre disposition étaient les suivants :

- pour mon financement : une Allocation du Ministère de la Recherche
- pour le projet et le laboratoire: l'INSERM, la Ligue contre le Cancer et l'Université Lille 1

Conduite du projet

Au cours de mon DEA, j'avais des réunions de travail hebdomadaires avec mes tuteurs. Ils m'ont apporté leurs connaissances scientifiques spécialisées, indispensables au bon

Annexe 2 : Nouveau chapitre de la thèse

déroulement de mon travail notamment pour l'analyse des résultats, la proposition des expériences suivantes et la réorientation du projet. Lors de ces réunions, nous avons convenu d'une réorientation de mon sujet de DEA car la question du rôle des autres membres de la famille du NGF devenait récurrente. En début de thèse, nos réunions étaient tout aussi fréquentes, conséquence de la mise en place d'un nouveau sujet. Puis elles se sont espacées au fil du temps et de l'acquisition de mon autonomie pour devenir des discussions scientifiques (nouvelles stratégies) bi ou trimestrielles en fin de thèse. Nous avons notamment décidé au cours de ma 2^{ème} année de thèse que j'affinerais l'étude des effets biologiques sur les 2 NT les plus exprimées dans le cancer du sein.

En parallèle, j'ai exposé mes résultats à la fois lors des réunions hebdomadaires de l'équipe environ une fois tous les 2 mois ainsi que lors des « labmeetings » annuels dont la particularité est de convier des intervenants extérieurs. Enfin, pour valoriser mes travaux, j'ai eu l'occasion de les présenter à 2 reprises dans des congrès internationaux et nationaux. Les problèmes rencontrés ont essentiellement été techniques et ont pu être résolus grâce à l'utilisation d'appareils (NanoDrop, Fastprep,...) et la compétence de chercheurs d'autres laboratoires.

Evaluation / Estimation du coût consolidé du projet

A ce jour, mon projet s'est déroulé sur 3 ans et je l'estime à 170 000 euros.

Annexe 2 : Nouveau chapitre de la thèse

<u>Ressources humaines</u>	
Doctorante, temps plein, Allocation MRT, 3ans	60 000 €
Personnel mobilisé	48 000 €
<u>Matériels et Prestations</u>	
Equipements (PSM, étuve, paillasse, four a hybridation....)	10 000 €
Fonctionnement, consommables dont	45 000 €
- <i>culture cellulaire</i>	- 6 000 €
- <i>PCR en temps réel</i>	- 4 000 €
- <i>plastiques</i>	- 8 000 €
Prestations externes dont	2 000 €
- <i>formations de l'école doctorale</i>	920 €
Déplacements (participation à 2 congrès)	900 €
<u>Coût infrastructures</u>	
Bâtiment, Entretien, Electricité, Eau, Téléphone	3 500 €
Maintenance des appareils	600 €
TOTAL	170 000 €

Personnel mobilisé sur 3 ans.

- Hubert Hondermarck, professeur et directeur du laboratoire, 20% du salaire brut soit 31800 € / 3 ans
- Eric Adriaenssens, enseignant-chercheur, 10% du salaire brut soit 9180 € / 3 ans
- Autres personnels du laboratoire (techniciens, secrétaire, thésards,...)

EXPERTISE SCIENTIFIQUE TECHNIQUE ET APPLIQUEE

Expertise scientifique

Au cours de ma thèse, j'ai acquis une expertise scientifique en

- Biologie des cellules cancéreuses en particulier dans le système mammaire
- Signalisation des facteurs de croissance
- Biologie moléculaire, régulation des gènes

Compétences techniques

La mise en place de mon sujet a mobilisé de nombreuses compétences techniques :

- En culture cellulaire : mise en place de cultures cellulaires dont cultures primaires de cellules normales de sein, tests biologiques (croissance cellulaire, prolifération, survie, migration), transfections transitoires et stables.
- En biologie moléculaire : RT-PCR, PCR en temps réel, puces à ARN, extraction d'acides nucléiques notamment de tissus, clonage, techniques d'ARN interférence (*in vitro* et *in vivo*).
- En biochimie : Western-Blot, Immunocytochimie, Immunohistochimie
- En expérimentation animale, technique de tumorigenèse en souris SCID et nude: préparation du matériel biologique nécessaire aux manipulations, aide au moment de l'injection des cellules puis suivi de la croissance tumorale et récupération du matériel biologique lors du sacrifice des animaux.

Autres compétences acquises et savoir-faire

Les compétences que j'ai acquises tant sur le plan professionnel qu'humain depuis la mise en place de mon projet novateur jusqu'au terme de sa réalisation peuvent s'organiser en 6 groupes : l'organisation et la gestion de projet, le travail en équipe et les collaborations, la communication, le sens de la procédure, la veille scientifique et technologique, et, la formation et les encadrements. Je terminerai en décrivant les qualités personnelles que ce travail a développées.

✓ Organisation / gestion de projet

J'ai mis à profit mon sens de l'organisation en menant à bien les expériences, dans une succession logique, et notamment en terme de :

- Gestion prévisionnelle

Ma thèse s'est déroulée sur 3 ans. Je me suis fixé des objectifs à court terme (réalisation des expériences, analyse des résultats, proposition de nouvelles manipulations) sans oublier la finalité à long terme de la thèse. Cela m'a obligée à me projeter dans l'avenir, à explorer une direction et à en abandonner d'autres, donc à m'adapter.

Annexe 2 : Nouveau chapitre de la thèse

- Gestion financière et suivi des coûts

La gestion financière d'un projet est une part importante du travail de chercheur ; les compétences de négociation, de persuasion et de communication s'y affirment. J'ai géré la faisabilité des expériences en fonction du budget imparti, c'est-à-dire que j'ai :

- Fait établir des devis, négocié les prix, mis en concurrence les fournisseurs pour obtenir la meilleure offre.
- Géré les commandes, les stocks, les délais de livraison.

✓ Travail en équipe / Collaborations

Je me suis impliquée dans la vie du laboratoire en respectant son organisation interne :

- Participation aux réunions hebdomadaires du laboratoire,
- Respect des plannings de réservation des appareils et des emplois du temps de chacun au sein des différents laboratoires,
- Participation aux corvées de nettoyage,
- Respect du travail des autres.

Tenir compte des autres m'a aussi permis de tempérer mes enthousiasmes et de relativiser.

✓ Communication

La communication et la valorisation de mon travail lors de réunions scientifiques en groupe restreint ou en congrès auprès d'un public spécialiste ou non averti ont constitué une partie essentielle de ma thèse.

En ce qui concerne les congrès et séminaires scientifiques :

- Exposé de mes travaux à 2 reprises lors d'un congrès national et, en anglais, lors d'un congrès international
- Séminaires en anglais 1 fois par an avec des intervenants extérieurs
- Réunion bimestrielle du laboratoire en anglais

Concernant la pratique de l'anglais, j'ai suivi des cours pendant ma formation doctorale. Durant ma thèse, j'ai été amené à communiquer mes résultats en anglais (réunions, séminaires, congrès) et aussi à rédiger des articles pour publication et des résumés en vue de sélection aux congrès.

J'ai également participé à des séminaires rassemblant des doctorants de divers horizons scientifiques (Bilan de compétences, valorisation des compétences, nouveau chapitre de la thèse grâce à l'Association Bernard Gregory). Pour véhiculer et valoriser les résultats de mes

Annexe 2 : Nouveau chapitre de la thèse

recherches, il a fallu mettre mes connaissances à la portée des autres ce qui a développé mon sens pédagogique. De plus, les présentations orales m'ont appris à prendre la parole en public, c'est-à-dire à poser ma voix et à capter l'attention. Cela s'est révélé bénéfique lors de mes enseignements.

La rédaction de projets ou de demande de financement est un autre type de communication indispensable au chercheur. J'ai monté des dossiers de demande et obtenu le financement d'équipements et d'une 4^{ème} année de thèse auprès d'associations (ARC, FRM, Ligue contre le cancer). Pour y parvenir, la synthèse et la rigueur scientifique sont indispensables, tout autant que la capacité de vulgarisation du contenu de la recherche.

✓ Sens de la procédure

Le travail expérimental que j'ai effectué durant ma thèse m'a amenée à utiliser du matériel biologique fragile comme des cellules en culture, des biopsies mammaires ou des souris immunodéficientes ainsi que des produits chimiques toxiques et cancérigènes. Cette utilisation nécessite de la part du manipulateur une grande concentration, et exige de suivre une procédure précise et rigoureuse où l'approximation est impossible. Par exemple, les souris que j'ai manipulées n'ont pas de système immunitaire, c'est pourquoi il faut les prémunir de toute contamination extérieure. Nous suivons alors une procédure définie d'habillement (blouse, charlotte, surchaussures, gants,...), de décontamination et de stérilisation.

✓ Veille scientifique et technologique

Grâce à une lecture suivie de la bibliographie internationale, aux conférences et aux congrès auxquels j'ai participé, et aux nombreuses discussions scientifiques avec les membres des laboratoires, j'ai approfondi et développé mes connaissances théoriques et techniques dans mon domaine de recherche.

✓ Formation / Encadrement

- Enseignements : Je suis intervenue dans un module de biologie des cellules cancéreuses niveau M1 (3 TD de 2h + 4 TP de 5h). Je me suis adaptée au niveau demandé puis j'ai recherché, agencé et structuré les informations à transmettre. Pendant mes interventions, je me suis appliquée à expliquer les données de façon claire et précise. Cette expérience a développé mon sens de la pédagogie, de l'organisation ainsi que ma capacité à m'adapter et à transmettre mes connaissances.

Annexe 2 : Nouveau chapitre de la thèse

- Encadrement de stagiaires : J'ai pris part à la formation des nouveaux arrivants au laboratoire en coordonnant leur travail et en les formant à diverses techniques (culture cellulaire, biologie moléculaire). Je les ai aussi accompagnés dans la rédaction des mémoires et la préparation de leurs présentations orales.

✓ Qualités personnelles

La thèse est pour moi une véritable aventure humaine, passionnante quoiqu'éprouvante.

Ce travail m'a permis de révéler mes qualités personnelles et d'en développer d'autres:

- Autonomie et esprit d'initiative : j'ai réalisé mes expériences avec une grande liberté et une grande indépendance tout au long de ma thèse.
- Curiosité et Ouverture d'esprit: Le travail de recherche nécessite d'être au fait des nouveautés technologiques et des avancées dans son domaine. J'ai également pris conscience, grâce aux enseignements, qu'il était primordial de ne pas perdre sa culture générale scientifique à force de spécialisation.
- Dynamisme et Persévérance : Je me savais volontaire et les 3 années de thèse ont développé ce côté de ma personnalité. Je me suis, en effet, investie avec enthousiasme et de façon constante pour mener à terme mes travaux.
- Résistance au stress : Faire face à la pression subie en thèse (course aux résultats, publication, soutenance dans les temps impartis, ...) m'a contraint à canaliser mes émotions et à mieux dominer le stress.
- Pédagogie : Les séances de TD et TP et les encadrements de stagiaires m'ont appris à transmettre un savoir.

RESULTATS et IMPACTS DE LA THESE

Dans le domaine de la recherche, mes travaux de DEA puis de thèse ont participé à l'amélioration des connaissances fondamentales et à la compréhension du processus de cancérisation de la glande mammaire lié à la famille des neurotrophines. Ma thèse a permis de discriminer l'expression de chaque neurotrophine et de leurs récepteurs dans les cellules cancéreuses et normales de sein ainsi que dans des biopsies mammaires. Biologiquement, les neurotrophines exprimées agissent comme facteur de survie sur les cellules cancéreuses de sein et ont donc un impact sur la croissance tumorale. Au sein de l'équipe, mon travail de thèse a répondu aux objectifs fixés par l'INSERM en terme d'élargissement de la thématique

Annexe 2 : Nouveau chapitre de la thèse

aux autres neurotrophines. Sur un plan personnel, la thèse m'a appris à gérer un projet professionnel en tenant compte des impératifs, des budgets imposés, de pratiques et procédures spécifiques. J'ai atteint les objectifs imposés par ma thèse en apportant des réponses précises aux hypothèses scientifiques. La publication d'articles, quant à elle, n'est pas terminée.

En terme de projet professionnel, je m'intéresse particulièrement à la biologie médicale et à la santé publique (maladies génétiques, régulation de gènes, thérapie). Cela pourrait être dans le domaine de la recherche fondamentale ou de la recherche appliquée. Je vise un poste où je pourrais mettre à profit l'expertise scientifique acquise, l'encadrement d'équipe et la capacité à gérer un projet. C'est pourquoi, je ferai le maximum pour intégrer soit un organisme de recherche publique comme l'Université, le CNRS ou l'INSERM, soit le service « recherche et développement » d'une société privée de type laboratoire pharmaceutique.

Annexe 2 : Nouveau chapitre de la thèse

Résumé

Le laboratoire avait précédemment montré le rôle mitogène et anti-apoptotique du NGF pour les cellules de cancer du sein *via* l'activation de ses récepteurs TrkA et p75^{NTR}. Dans le présent travail, nous montrons que le NGF (nerve growth factor) est exprimé par une large majorité de biopsies cancéreuses mammaires et nous apportons la démonstration définitive de son rôle dans la croissance du cancer du sein *in vivo* en modèle préclinique. Ces nouvelles données indiquent que le NGF peut être présenté comme une cible thérapeutique potentielle dans le cancer du sein. Ces résultats nous ont amené à nous intéresser aux autres membres de la famille du NGF, les neurotrophines brain-derived neurotrophic factor (BDNF, NT-3 et NT-4/5) qui exercent leurs effets en se liant aux récepteurs à activité tyrosine kinase TrkB et TrkC ainsi qu'au récepteur commun aux neurotrophines, p75^{NTR}. Nous montrons pour la première fois l'expression et la sécrétion du BDNF et de la NT-4/5 par les cellules de cancer du sein. L'étude de leurs récepteurs indique que TrkB est présent sous une forme tronquée sans domaine kinasique intracellulaire appelée TrkB-T1 dont le rôle reste à déterminer, nous confirmons par ailleurs la présence de p75^{NTR} et montrons qu'il est régulé positivement par les œstrogènes. En revanche, la NT-3 et son récepteur TrkC sont peu ou pas détectés dans le cancer du sein. La stimulation exogène des cellules de cancer du sein par le BDNF et la NT-4/5 leur confère une résistance à l'apoptose *via* la stimulation du récepteur p75^{NTR}. De plus, à l'aide d'anticorps bloquant, nous avons mis en évidence que le BDNF et la NT-4/5 libérés sont biologiquement actifs puisque leur inhibition augmente le nombre de cellules apoptotiques *in vitro* et dans des souris porteuses de tumeurs mammaires. Le BDNF et la NT-4/5 sont donc des facteurs de survie dans les cellules de cancer du sein. L'ensemble de ce travail a permis de mieux comprendre le rôle pro-tumoral de cette famille de facteurs de croissance dans la cancérogenèse mammaire.

Mots clés : Cancer du sein, facteurs de croissance, neurotrophines, apoptose.

Abstract

The laboratory had previously shown the mitogenic and anti-apoptotic roles of NGF for breast cancer cells through activation of its tyrosine kinase receptors TrkA and the neurotrophin receptor p75^{NTR}. In this work, we show that NGF (nerve growth factor) is expressed by a large majority of breast cancer biopsies and we bring the demonstration of its role in the growth of breast cancer *in vivo* using a preclinical model. These new data indicate that NGF can be considered as a potential therapeutic target in breast cancer. These results led us to study the other members of NGF family, the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor (BDNF, NT-3 and NT-4/5) which act by binding to the tyrosine kinase receptors TrkB and TrkC and to p75^{NTR}. We show for the first time the expression and secretion of BDNF and NT-4/5 by breast cancer cells. The study of their receptors indicates that TrkB is present in a truncated form without intracellular kinase domain called TrkB-T1, whose role remains to be determined, we also confirm the presence of p75^{NTR} and show that it is positively regulated by estrogen. In contrast, NT-3 and its receptor TrkC were not detected in breast cancer cells. The exogenous stimulation of breast cancer cells by the BDNF and NT-4/5 confers resistance to apoptosis *via* stimulation of p75^{NTR}. In addition, using blocking antibodies, we highlighted that the BDNF and NT-4/5 released are biologically active since their inhibition increases the number of apoptotic cancer cells *in vitro* and in mice carrying breast tumor xenografts. In conclusion, BDNF and NT-4/5 are survival factors for breast cancer cells. This work has led to a better comprehension of the pro-tumour role of neurotrophins in breast cancer.