

Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille

Présentée par

Jean-Philippe WILMET

**ÉTUDE PROTEOMIQUE DU RECEPTEUR P75^{NTR} DANS LE
CANCER DU SEIN**

Soutenue le 8 Juillet 2011 devant la commission d'examen :

Président du jury :	Dr. Florence PINET	Institut Pasteur Lille
Rapporteurs :	Pr. Jérôme LEMOINE	Université de Lyon
	Pr. Philippe BECUWE	Université de Nancy
Directeurs de Thèse :	Pr. Hubert HONDERMARCK	Université de Lille
	Pr. Xuefen LE BOURHIS	Université de Lille

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au sein du laboratoire INSERM U908, « Signalisation des facteurs de croissance dans le cancer du sein – Protéomique fonctionnelle », dirigé par le Professeur Hubert Hondermarck.

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

Je remercie vivement mon co-Directeur de thèse, Monsieur le Professeur Hubert Hondermarck pour m'avoir accueilli dans son équipe. Votre rigueur scientifique, votre soutien, ainsi que vos légendaires métaphores ont été essentiels à ma formation. Merci pour tout.

Je remercie également ma co-Directrice de thèse, Madame le Professeur Xuefen Le Bourhis pour sa patience et son investissement dans la réalisation de ces travaux et de ma formation.

Pour l'honneur qu'ils me font en faisant partie de ce jury, je remercie profondément Madame le Professeur Florence Pinet qui a accepté de le présider ainsi que Monsieur le Professeur Jérôme Lemoine et Monsieur le Professeur Philippe Becuwe qui ont bien voulu juger ce travail.

Je tiens également à remercier chaleureusement Madame le Docteur Ikram El Yazidi Belkoura pour m'avoir fait confiance à mes débuts, pour ses nombreux conseils, et pour tous les moments que l'on a partagé. Merci.

Un grand Merci à tous les membres du laboratoire qui m'ont accompagné pendant cette aventure :

Manue, merci pour nos discussions, ton écoute et tes conseils en toutes circonstances m'ont été précieux.

Christophe, un grand merci pour l'implication personnelle dont tu as fait preuve à mon égard, mais également pour nous avoir permis de travailler dans un labo flambant neuf !

Ingrid, merci de m'avoir (un peu) initié aux arcanes de la biologie moléculaire. Ta joie de vivre fait toujours plaisir à voir, ne change surtout pas !

Robert-Alain, bien que nos relations aient été compliquées, tu as tout mon respect scientifique.

Laura, les quelques mois où nous avons partagé notre bureau furent pour moi très enrichissants. Je te souhaite bonne chance pour la suite.

Nathalie, un grand merci pour ton aide technique et tes conseils avisés.

Je remercie également, Isabelle pour son implication, Valérie pour toutes mes commandes « urgentes », Emilie pour son organisation et son aide, ainsi que Véro qui nous fait briller le labo tous les jours !

Un grand merci à mes collègues et surtout ami(e)s thésard(e)s pour la bonne ambiance qu'il y a toujours eu entre nous et pour tous les bons moments partagés.

Cyril, mon compagnon de « galère » depuis le Master 2, ton flegme et ton abnégation forcent le respect. De connaissances nous sommes passés à collègues puis à amis. Bien que tu ne connaisses rien (ou pas grand-chose) au foot et malgré mes récurrentes raclées au Bad, notre amitié m'est très précieuse. Merci.

Elisa, tu m'as apporté l'Italie dans ton accent et ta bonne humeur. Nos discussions de « série-phile » furent mémorables, et je tiens à ajouter que ton cœur est immense malgré ta petite taille ! Buzzinga !

Léo, pour toi ce n'est que le début ! Le peu de temps que nous avons pu partager restera pour moi de très bons souvenirs. Garde le cap et bon courage pour la suite !

Je remercie le Docteur Yo Demont pour son amitié, ses conseils, les soirées et tout le reste. Malgré la distance, tout reste intact !

Je remercie le Docteur Stef Verbeke, alias « Maitresse », mes pauses clopes sont bien plus tristes depuis que tu es partie ! Nos discussions de tout et de rien me manquent !

Je remercie le Docteur Rod Romon pour nos débats vidéo-ludiques et de littérature japonaise. Je te souhaite de tout cœur le meilleur pour l'avenir.

Merci également à tous ceux qui m'ont accompagné d'une manière ou d'une autre : Elsa, pour sa joie de vivre ; Sam, pour ses montages photos ; Vaik, pour les parties de Lineage ; René, pour les soirées de décompression ; ainsi que Chann, Béné, Thomas et tous ceux que j'aurai oubliés.

Enfin, je terminerai en remerciant du fond du cœur mes parents qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans les moments difficiles et Laurane, sans qui rien ne serait pareil.

RESUME

Le facteur de croissance neurotrophique NGF (Nerve Growth Factor) est un facteur mitogène et de survie pour les cellules de cancer du sein alors qu'il est sans effet sur la croissance des cellules épithéliales mammaires normales. Ce facteur de croissance agit sur ses cellules cibles par l'intermédiaire de deux récepteurs : TrkA, qui est un récepteur tyrosine kinase, et p75^{NTR}, dépourvu d'activité catalytique intrinsèque. Le NGF stimule la survie des cellules cancéreuses mammaires via p75^{NTR} en activant le facteur de transcription NF-κB. Au cours de mes travaux de thèse, je me suis tout d'abord appliqué à décrire les modifications du protéome induites par une surexpression de ce récepteur p75^{NTR}. Pour cela, nous avons établi une lignée cellulaire MCF-7 surexprimant stablement le récepteur p75^{NTR}. Par la suite, une étude par électrophorèse bidimensionnelle suivie par une analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF/TOF a été réalisée en comparant des cellules non stressées à des cellules induites en apoptose grâce à l'apoptogène TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing-ligand). Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence un certain nombre de protéines régulées par la présence de p75^{NTR} en condition d'apoptose comme les cytokératines 8, 18 et 19, la protéine chaperonne HSP27 ou bien encore la protéine ribosomale RPLP0. Ces résultats suggèrent l'importance d'une réorganisation de ces protéines afin que p75^{NTR} puisse effectuer son effet de survie. L'autre partie de mes travaux a consisté en une étude spécifique des partenaires de signalisation de p75^{NTR}. Pour ce faire, nous avons décidé d'appliquer la stratégie TAP-Tag (Tandem Affinity Purification-Tag), une approche de protéomique fonctionnelle, au récepteur membranaire p75^{NTR}. Une analyse différentielle de plusieurs conditions de culture par spectrométrie de masse de type nanoLC-MS/MS a abouti à l'obtention d'une liste de partenaires potentiels de signalisation de p75^{NTR} dans un contexte de survie cellulaire. Cependant, l'implication fonctionnelle de ces protéines doit être confirmée. L'ensemble de ces travaux a permis d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche pour comprendre à la fois les mécanismes cellulaires mis en œuvre lors de la survie des cellules cancéreuses mammaires, mais aussi les partenaires potentiels de signalisation du récepteur p75^{NTR}.

ABSTRACT

The growth factor NGF (nerve growth factor) is a mitogenic and survival factor for breast cancer cells but has no effect on normal epithelial mammary cell growth. This growth factor acts on breast cancer cells *via* two receptors : TrkA, a tyrosine kinase receptor, and p75^{NTR}, which has no catalytic activity. NGF promotes breast cancer cells survival *via* p75^{NTR} by activation of the transcriptional factor NF- κ B. In the first time of my thesis work, I have described the proteome modification induced by an overexpression of p75^{NTR} in apoptotic stress-induced breast cancer cells. We established a p75^{NTR} overexpressing MCF-7 cell line. Thus, we investigated, by two dimensional electrophoresis followed by MALDI-TOF/TOF based mass spectrometry analysis, the proteome modification induced by the pro-apoptotic agent TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing-ligand). We describe some proteins regulated by p75^{NTR} in an apoptosis condition like cytokeratin 8, 18 and 19, the HSP27 and the ribosomal protein RPLP0. These results show that the rearrangement of those proteins is associated to the survival effect of p75^{NTR} in breast cancer cells. In a second part, we tried to identify the specific proteins partners of p75^{NTR} for its survival pathway. For that, we applied the TAP-tag (tandem affinity purification tag) strategy, a functional proteomic approach, to the p75^{NTR} receptor. A differential analysis by nanoLC-MS/MS mass spectrometry was conducted and we obtained a list of potentials proteins partners of the p75^{NTR} activated survival pathway. The functional involvement of these proteins should be confirmed. Together, our work provides new data on the cellular mechanisms involved in the survival of breast cancer cells and also on the proteins partners implicated in p75^{NTR} signaling.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
SOMMAIRE DES FIGURES	5
SOMMAIRE DES TABLES.....	6
INTRODUCTION.....	7
I- GLANDE MAMMAIRE ET CANCER	9
A. GLANDE MAMMAIRE	9
1. Anatomie / histologie.....	9
2. Développement et contrôle	12
B. CANCER DU SEIN	13
1. Généralité / épidémiologie	13
2. Tumeurs mammaires.....	14
<i>a. Différents types de cancer</i>	<i>14</i>
<i>b. Différentes classifications</i>	<i>16</i>
3. Tumorigenèse	18
<i>a. Origine génétique</i>	<i>18</i>
<i>b. Origine cellulaire.....</i>	<i>21</i>
<i>c. Origine environnementale.....</i>	<i>23</i>
<i>d. Développement du cancer.....</i>	<i>24</i>
4. Cancer du sein et thérapie.....	25
<i>a. Ciblage des voies pro- et anti-apoptotique.....</i>	<i>26</i>
<i>b. Ciblage des voies de signalisation.....</i>	<i>27</i>
<i>c. Ciblage de l'angiogenèse</i>	<i>28</i>
II- RECEPTEUR P75^{NTR} ET SA SIGNALISATION	30
A. P75 ^{NTR}	30

1. Aspect génétique.....	30
2. Structure protéique.....	31
3. Différentes formes du récepteur.....	33
a. <i>Epissage alternatif</i>	33
b. <i>Protéolyse</i>	33
B. NEUTROPHINES ET P75 ^{NTR}	36
1. Neurotrophines	36
2. Liaison des neurotrophines au p75 ^{NTR}	37
C. SIGNALISATION DE P75 ^{NTR} ET PROTEINES ASSOCIEES.....	39
1. Voie pro-apoptotique.....	39
2. Voie anti-apoptotique	41
3. Autres voies.....	43
a. <i>Synthèse des céramides</i>	43
b. <i>Elongation des neurites et Rho A</i>	43
c. <i>Voie menant à l'arrêt du cycle cellulaire</i>	44
D. P75 ^{NTR} ET CO-RECEPTEURS.....	46
1. Récepteurs Trk	46
a. <i>Aspect génétique</i>	47
b. <i>Structures protéiques</i>	47
c. <i>Isoformes</i>	48
d. <i>p75^{NTR} et Trk</i>	52
2. La Sortiline.....	53
a. <i>Aspect génétique</i>	53
b. <i>Structure Protéique</i>	54
c. <i>p75^{NTR} et Sortiline</i>	55
3. NOGO et Lingo 1	56
a. <i>Aspect génétique</i>	56
b. <i>Structure protéique</i>	57
c. <i>Relation avec p75^{NTR}</i>	58
E. EFFETS DE P75 ^{NTR} DANS LES CANCERS.....	58
1. Effet anti-tumoral	59
2. Effet pro-tumoral.....	61
III-PROTEOMIQUE	63
A. GRANDES ETAPES DE LA PROTEOMIQUE.....	63

SOMMAIRE

1. Extraction/simplification	63
2. Séparation	65
3. Identification	66
4. Quantification	67
B. APPORT DE LA PROTEOMIQUE DANS L'ANALYSE DE LA SIGNALISATION D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE	72
OBJECTIFS DE LA THESE	75
CONTEXTE DE LA THESE	77
OBJECTIF DE LA THESE.....	77
RESULTATS	79
I- ARTICLE : « PROTEOME CHANGES INDUCED BY OVEREXPRESSION OF THE NEUROTROPHIN RECEPTOR P75^{NTR} IN BREAST CANCER CELLS »	81
II- STRATEGIE CIBLEE : LE TAP-TAG	115
A- PROBLEMATIQUE ET STRATEGIE.....	115
B- MATERIELS ET METHODES	117
C- RESULTATS.....	124
1- Etablissement de cellules surexprimant p75 ^{NTR} « taggé ».....	124
2- Influence de la surexpression de p75 ^{NTR}	127
3- Identification des partenaires de p75 ^{NTR} par TAP-tag.....	130
4- Identification des protéines par spectrométrie de masse.....	135
D- DISCUSSION.....	138
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	141
P75 ^{NTR} , PROGRESSION TUMORALE ET THERAPIES.....	143
P75 ^{NTR} : VERS UNE SIGNALISATION DYNAMIQUE.....	145
PROTEOMIQUE : PLACE DANS L'ANALYSE DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE	147
BIBLIOGRAPHIE.....	151

SOMMAIRE

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1. Anatomie et structure de la glande mammaire.....	10
Figure 2. Structure d'un lobe mammaire.....	11
Figure 3. Coupe histologique de la glande mammaire normale.....	11
Figure 4. Développement de la glande mammaire.....	13
Figure 5. Coupes histologiques des principaux types de cancer du sein.....	15
Figure 6. Les deux concepts de l'origine cellulaire du cancer du sein.....	22
Figure 7. Les étapes de la cancérisation mammaire.....	25
Figure 8. Représentation schématique du récepteur p75 ^{NTR}	31
Figure 9. Les différentes formes de p75 ^{NTR}	35
Figure 10. Association transmembranaire de p75 ^{NTR} et liaison des neurotrophines.....	38
Figure 11. Représentation schématique des voies de signalisation de p75 ^{NTR}	45
Figure 12. Liaison des neurotrophines aux récepteurs Trk.....	46
Figure 13. Représentation schématique des récepteurs Trk.....	48
Figure 14. Les isoformes de TrkA.....	49
Figure 15. Les isoformes de TrkB majoritaires.....	50
Figure 16. Les isoformes de TrkC.....	51
Figure 17. Représentation schématique de la sortiline.....	55
Figure 18. Représentation schématique des récepteurs Nogo et LINGO-1.....	57
Figure 19. Structure du récepteur p75 ^{NTR} doublement « taggé » et séquences en acides aminés des « tags ».....	116
Figure 20. Carte du vecteur d'expression pCTAP.....	118
Figure 21. Electrophorèse en gel d'agarose du produit de PCR.....	124
Figure 22. Electrophorèse en gel d'agarose sur les produits de PCR avec les amorces de p75 ^{NTR} sur les colonies transformées.....	125
Figure 23. Résultats du séquençage de p75 ^{NTR} contenu dans le vecteur d'expression pCTAP.....	126
Figure 24. Analyse de l'expression de p75 ^{NTR} par Western blot.....	127
Figure 25. Test de prolifération cellulaire.....	128

Figure 26. Représentation graphique des résultats des tests de migration et d'invasion MOCK <i>versus</i> TAP.....	128
Figure 27. Test de survie sur les cellules stables MOCK et TAP.....	129
Figure 28. Test d'activité de la caspase-9 sur les cellules stables TAP.....	130
Figure 29. Schéma de principe de la double purification par TAP-tag.....	131
Figure 30. Analyse de p75 ^{NTR} dans les différentes fractions du TAP-tag par Western blot.....	131
Figure 31. Analyse par Western blot de TRADD dans les différentes fractions issues du TAP-tag.....	132
Figure 32. Visualisation des protéines issues de la purification par TAP-tag.....	134
Figure 33. Séquence en acides aminés de p75 ^{NTR}	135
Figure 34. Spectre MS2 d'un des peptides ayant conduit à l'identification de p75 ^{NTR}	136

SOMMAIRE DES TABLES

Table 1. Classification des stades de cancer du sein.....	16
Table 2. Classification moléculaire des cancers du sein.....	17
Table 3. Caractéristiques des neurotrophines.....	36
Table 4. Caractéristiques des récepteurs Trk humains.....	47
Table 5. Caractéristiques de la sortiline.....	54
Table 6. Caractéristiques des récepteurs Nogo et LINGO-1.....	56
Table 7. Identification de p75 ^{NTR} après interrogation de la base de données Mascot Sprot 0508.....	135
Table 8. Tableau récapitulatif des protéines identifiées par spectrométrie de masse dans les bandes différentielles observées sur le gel coloré au bleu de Coomassie Colloïdal.....	137
Table 9. Avancement des validations biochimiques par Western blot.....	138

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I- GLANDE MAMMAIRE ET CANCER

A. GLANDE MAMMAIRE

La glande mammaire a des aspects différents bien évidemment en fonction du sexe, puisqu'elle reste immature et non fonctionnelle chez l'homme, mais également en fonction de l'âge chez la femme. C'est une glande exocrine qui se développe continuellement au cours de la vie et qui assure la sécrétion lactée suite à la parturition.

1. Anatomie / histologie

Le sein est un organe sexuel secondaire pair, situé à la face antéro-supérieure du tronc et principalement constitué d'un tissu grasseux. Il repose au niveau de la cage thoracique sur les muscles pectoraux, à l'aide de ligaments que l'on appelle ligaments de Cooper. La glande mammaire est constituée d'une structure tubulo-alvéolaire comprenant une dizaine de canaux galactophoriques au départ du mamelon, aboutissant par dichotomie à 10 à 20 lobes mammaires irréguliers (Figure 1). La peau qui entoure ce mamelon, appelée aréole, est pigmentée et contient des glandes sébacées (glandes de Morgani). Lors de la grossesse, ces glandes se trouveront hypertrophiées, prenant alors le nom de tubercule de Montgomery. Il semblerait que la sécrétion de ces glandes ait un rôle protecteur du mamelon lors de l'allaitement. La glande mammaire est structurée par deux tissus distincts que sont les canaux excréteurs et le tissu conjonctif, et se trouve enfouie dans le tissu grasseux. Chaque lobe de la glande mammaire est drainé par un canal unique, le canal galactophore, assurant le transport des sécrétions lactées à la surface au niveau du mamelon par une dilatation appelée sinus lactifère. Le mamelon est parcouru par des travées de muscles lisses orientées parallèlement aux canaux galactophores et circulairement près de la base.

Chaque lobe de la glande mammaire est constitué de 20 à 40 lobules comprenant chacun un canal intermédiaire se jetant dans le même canal lactifère. En allant plus loin dans l'arborescence, on peut se rendre compte que chaque lobule est constitué de 10 à 100 alvéoles, chacune ayant une canalicule qui lui est propre. Il est à noter que les alvéoles contiennent des cellules myoépithéliales permettant la contraction de ces dernières et ainsi la propulsion des sécrétions lactées (Figure 2). Concernant l'irrigation et l'innervation de la glande mammaire, elles se font de façon antéro-supérieure, externe, et inféro-interne par des branches axillaires, intercostales et internes qui convergent vers la région aréolo-mamelonnaire.

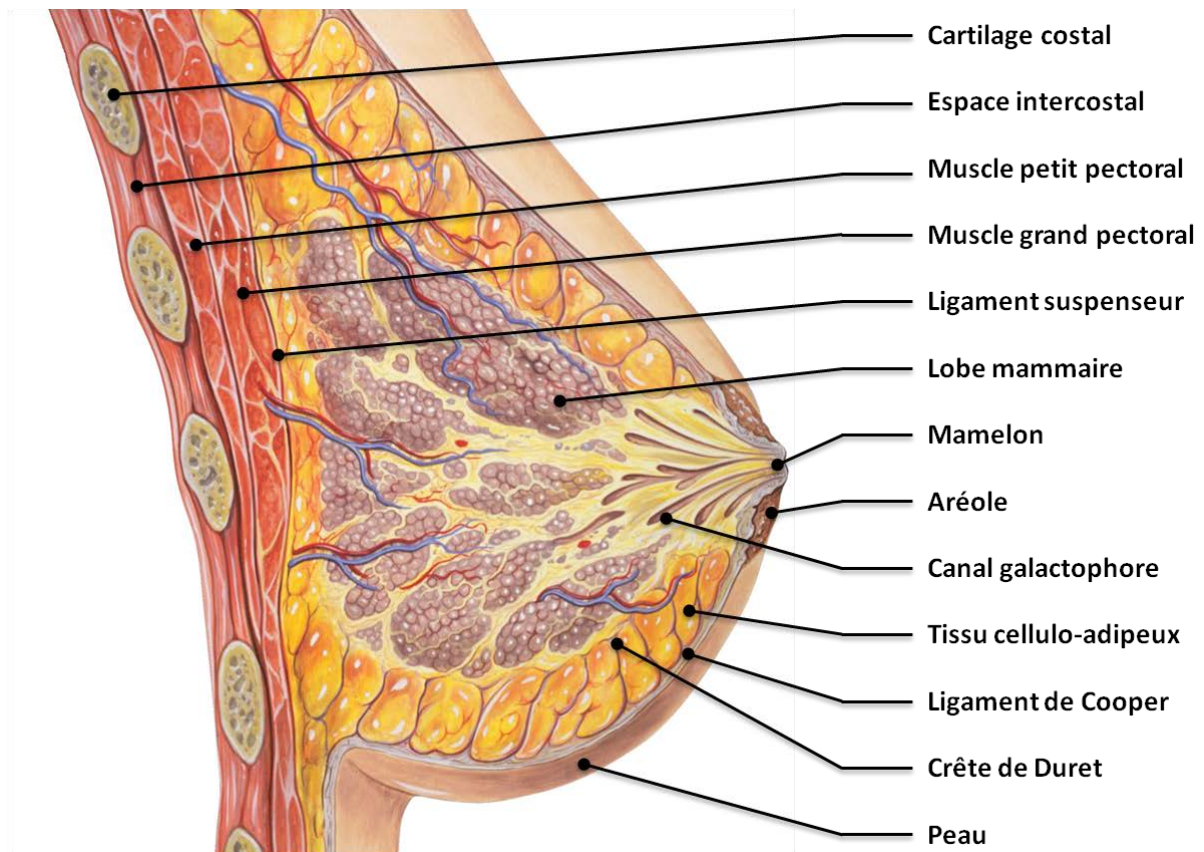


Figure 1. Anatomie et structure de la glande mammaire. Représentation schématique de la glande mammaire vue en coupe sagittale. La glande mammaire est une masse de tissu glandulaire, de couleur blanc-bleuâtre, de forme circulaire, qui est située à la face antérieure des muscles pectoraux. Elle se compose d'une dizaine de canaux galactophores à l'origine d'une arborescence aboutissant dans 10 à 20 lobes mammaires, permettant la sécrétion lactée au niveau du mamelon. Sa face antérieure se compose d'un tissu cellulo-adipeux qui double la peau excepté au niveau de l'aréole et du mamelon. Ce tissu présente des lamelles conjonctives (ligaments de Cooper) qui attachent, via des crêtes fibro-glandulaires (crêtes de Duret), la glande au derme. Enfin, à sa face postérieure se trouve le ligament suspenseur du sein, tissu cellulo-adipeux. (Medical Illustrations by Patrick Lynch, <http://patricklynch.net/portfolios/medical-illustration/index.html>)

D'un point de vue histologique, la glande mammaire est composée de plusieurs types cellulaires distincts en terme de morphologie mais également en terme de fonctionnalité. En effet, si le système canalaire représente la composante fonctionnelle, il reste minoritaire face au tissu fibro-adipeux qui constitue la majeure partie du sein. L'ensemble de ce système canalaire est constitué de deux couches cellulaires : une couche interne constituée de cellules épithéliales, pouvant sécréter le lait lors de la phase de lactation, entourée par une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales fusiformes contractiles. Ces deux couches cellulaires reposent sur une membrane basale qui est entourée de stroma, ou tissu palléal, constitué de matrice extracellulaire (principalement des fibres de collagène), de cellules fibroblastiques, d'adipocytes et de vaisseaux sanguins indispensables à l'irrigation de l'épithélium mammaire (Figure 3).

INTRODUCTION

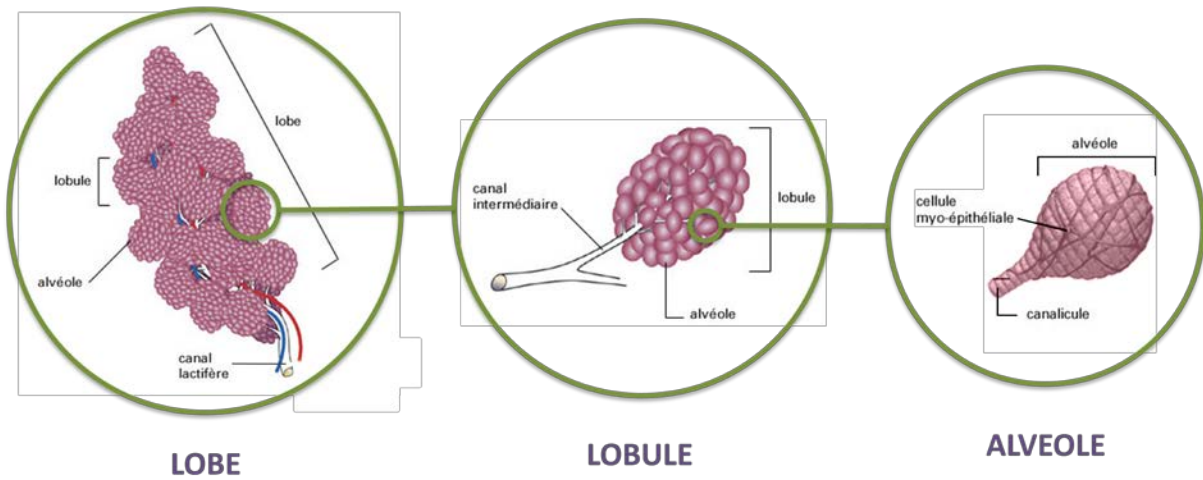


Figure 2. Structure d'un lobe mammaire. Représentation schématique de la structure du lobe mammaire. Un lobe mammaire comporte 20 à 40 lobules eux mêmes composés de 10 à 100 alvéoles chacun. Les alvéoles possèdent un épithélium sécrétoire qui éjecte la sécrétion lactée dans les canalicules puis dans les canaux galactophores grâce à la contraction des cellules myoépithéliales. Adapté de www.santeallaitementmaternel.com.

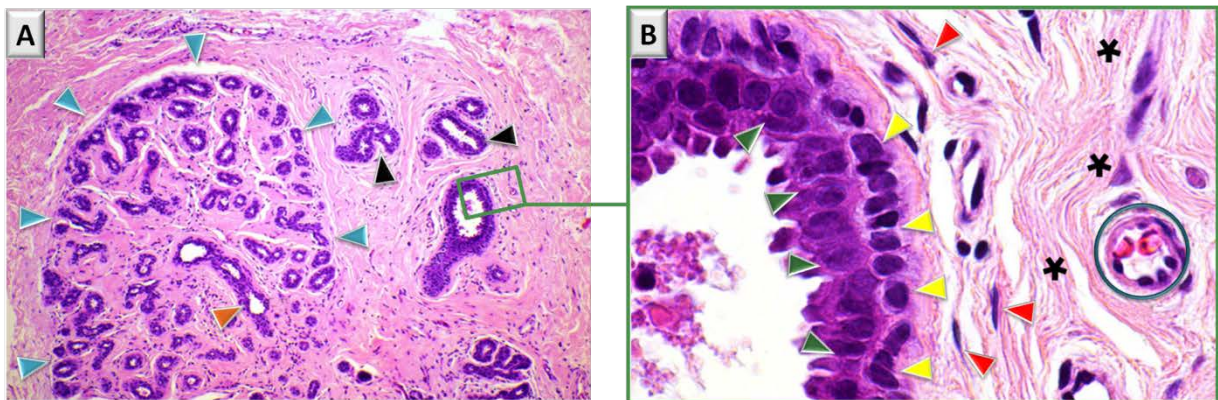


Figure 3. Coupe histologique de la glande mammaire normale. **A.** Lobule mammaire post-pubertaire hors lactation. Les pointes de flèches bleues délimitent le lobule et la flèche orange indique le canal terminal alvéolaire menant au réseau canalaire (flèches noires). **B.** Agrandissement de la coupe A (rectangle vert). Les flèches jaunes indiquent les cellules myoépithéliales du canal, les flèches vertes montrent l'assise de cellules épithéliales du canal, les flèches rouges indiquent les fibroblastes péricanalaires parallèles à la lame basale, les astérisques représentent les fibres de collagène et le cercle bleu une artériole. Adapté de *Biology of the mammary gland* : <http://mammary.nih.gov>.

2. Développement et contrôle

La glande mammaire est un organe en constante évolution chez la femme, de la puberté à la ménopause. De 8 à 10 mm de diamètre à la naissance, la glande mammaire atteint 10 à 11 cm de haut pour 5 à 6 cm de profondeur sur 12 à 13 cm de largeur à la puberté. Elle augmente de taille souvent dans la période prémenstruelle et surtout lors de la grossesse et de l'allaitement. Au moment de la puberté, sous l'influence des stéroïdes sexuels (œstrogènes et progestérone), de l'hormone de croissance (GH) et de corticoïdes, survient une phase de croissance des canaux et du stroma. Cependant, les alvéoles restent peu développées et la majeure partie de l'augmentation de volume de la glande mammaire est due aux dépôts lipidiques. Ce ne sera qu'au cours de la grossesse que ces alvéoles subiront une croissance active, prenant la place du tissu adipeux. Lors de la gestation, les concentrations plasmatiques d'œstrogènes, de progestérone et d'hormone lactogène placentaire (hPL) sont élevées. La prolifération des cellules souches épithéliales situées à l'extrémité des canaux est sous l'influence directe de ces taux élevés d'œstrogènes et de progestérone. Cette prolifération est également assurée par l'intervention d'autres facteurs de croissance comme le TGF α (transforming growth factor), le MDGF-1 (mammary derived growth factor), l'IGF-1 (insulin growth factor) et l'EGF (epidermal growth factor). A la fin de la grossesse, la lactation est permise par la polarisation des cellules épithéliales alvéolaires qui deviennent alors fonctionnelles. Jusqu'à l'accouchement, la lactation est inhibée grâce à l'action négative de la progestérone sur la prolactine. Après l'accouchement, l'élimination du placenta a pour effet de renverser la balance progestérone/prolactine, permettant ainsi la production de lait. L'éjection du lait est assurée par le réflexe de succion au niveau du mamelon. Cette succion a tout d'abord pour effet de maintenir la sécrétion de prolactine par l'adénohypophyse, mais également la sécrétion d'ocytocine, nécessaire à la contraction des cellules myoépithéliales lors de l'éjection du lait. Après l'allaitement, on assiste à l'involution de la glande grâce à des processus d'apoptose des cellules épithéliales, myoépithéliales et des fibroblastes (Figure 4).

INTRODUCTION

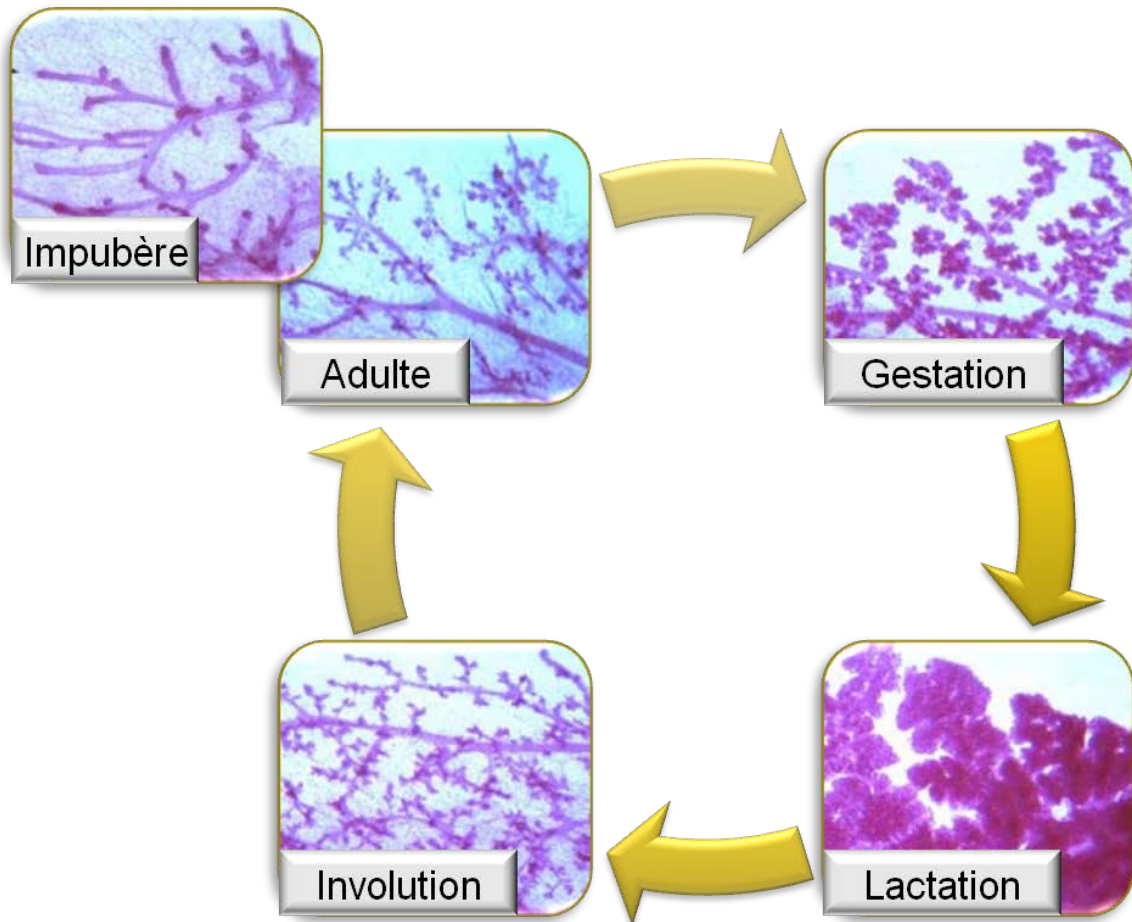


Figure 4. Développement de la glande mammaire. A la puberté, la glande mammaire subit l'effet de nombreuses hormones et facteurs de croissance provoquant un développement de l'arborescence et des alvéoles. Lors d'une grossesse, les cellules épithéliales des alvéoles prolifèrent et se différencient en cellules productrices de lait. Après l'allaitement, le sevrage entraîne la disparition de ces cellules et l'involution de la glande. Photos de glandes mammaires murines issues de *Biology of the mammary gland* : <http://mammary.nih.gov>.

B. CANCER DU SEIN

1. Généralité / épidémiologie

A l'échelle planétaire, le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez les femmes avec 1 150 000 nouveaux cas et 410 000 décès par an (World cancer report, OMS, 2008). Plus de la moitié des cas, environ 600 000, est diagnostiquée dans les pays en voie de développement, et le demi million restant l'est en Europe et en Amérique du nord. Le cancer du sein est un cancer à bon pronostic puisque le taux de survie à 5 ans dans les pays industrialisés est de 85%. Cependant, ce taux tombe à 50-60% dans les pays non encore

développés. Le cancer du sein est majoritairement féminin, mais il est à noter que ce cancer peut aussi toucher les hommes (1% des cancers du sein).

A l'échelle nationale, le cancer du sein est le premier cancer féminin en terme d'incidence, et on estime aujourd'hui qu'une femme sur 9 pourra le développer avant 75 ans. 52 500 nouveaux cas ont été estimés en France métropolitaine en 2010. Cette incidence a fortement augmentée depuis le début des années 1990. Cette augmentation peut en partie s'expliquer par l'action combinée des campagnes massives de dépistage et de l'amélioration des techniques de diagnostic. Il demeure aussi la première cause de mortalité par cancer chez les femmes avec 11 000 décès en 2010. Cependant, la mortalité reste assez stable malgré l'augmentation de l'incidence, grâce à la prise en charge précoce des patientes et à l'amélioration des thérapeutiques. Le taux de survie à 5 ans reste supérieur à 80% dans notre pays.

Le cancer du sein est une pathologie à évolution lente puisqu'il faut compter environ 6 à 8 ans pour obtenir une tumeur de 1 cm³ (seuil détectable en mammographie classique) à partir d'une seule cellule. Cependant, durant cette période dite infra-clinique, la tumeur évolue et peut passer d'un stade *in situ* (non invasif) à un stade invasif qui mènera, *via* les voies lymphatiques ou sanguines, à la formation de métastases. Dans le cas du cancer du sein, ces métastases seront principalement pulmonaires, hépatiques, cérébrales et osseuses.

2. Tumeurs mammaires

a. Différents types de cancer

Les tumeurs de seins peuvent être appelées bénignes dans les cas où elles sont bien délimitées et encapsulées. Leur croissance est alors lente et locale, et elles ne récidivent pas après exérèse. La tumeur de sein bénigne la plus fréquente est l'adénofibrome, le plus souvent découvert avant 30 ans. L'autre catégorie de tumeurs mammaires, qualifiée de maligne, est au contraire mal délimitée et non-encapsulée. Ces tumeurs sont constituées de cellules à croissance rapide qui tendent à infiltrer et détruire les tissus adjacents. La grande majorité des tumeurs malignes (plus de 95% des cas) sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire qu'elles sont issues de la cancérisation de l'épithélium glandulaire, que ce soit à partir des cellules des canaux (cancer canalaire) ou des cellules des lobes (cancer lobulaire). Les adénocarcinomes peuvent être classés en 3 catégories en fonction de leur capacité d'infiltration du tissu environnant (Figure 5).

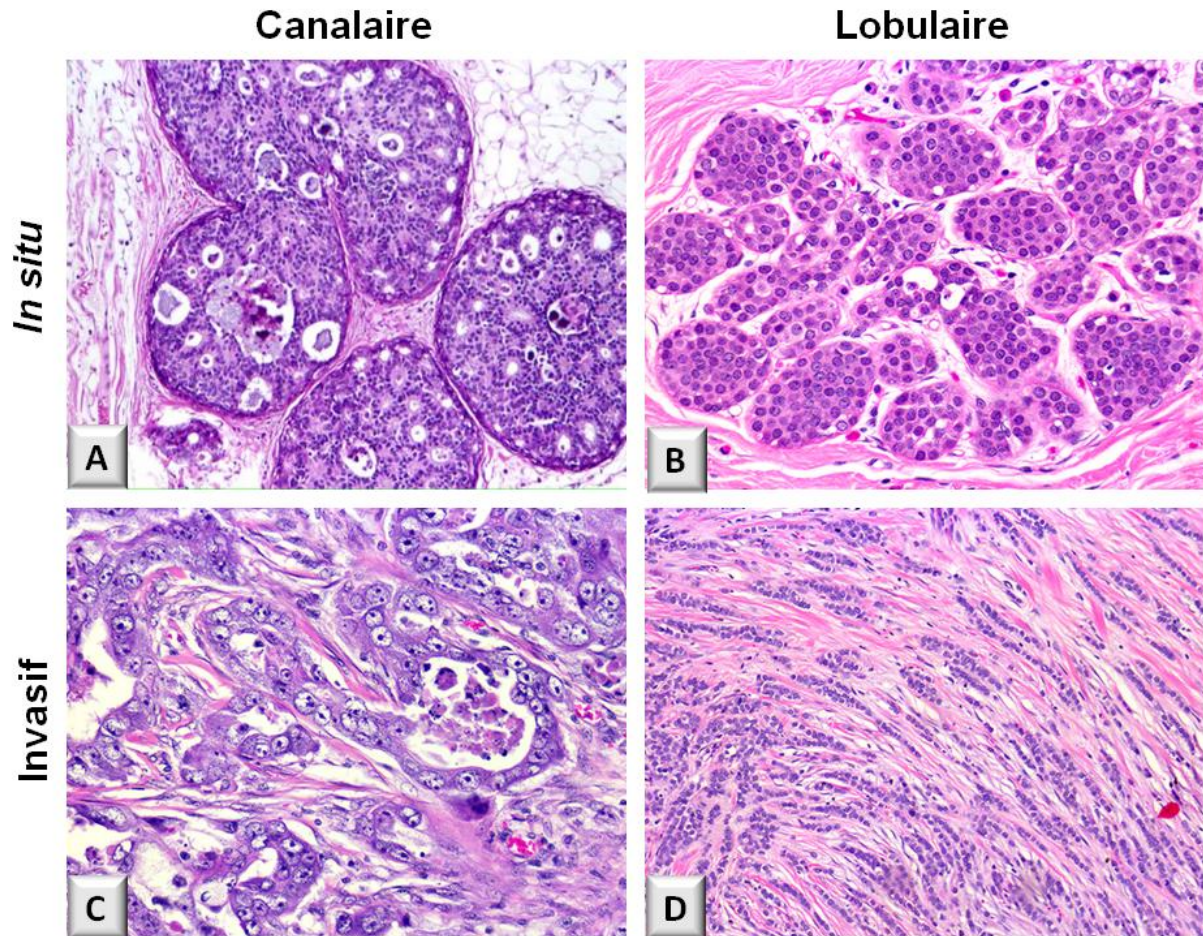


Figure 5. Coupes histologiques des principaux types de cancer du sein. Coupes histologiques de carcinomes *in situ* canalaire (A) et lobulaire (B), et de carcinomes invasifs canalaire (C) et lobulaire (D). Marquage à l'hématoxyline et éosine. (Issues du site : www.hopkinsbreastcenter.org/pathology/malignant/)

Les carcinomes *in situ* (non infiltrant) : la prolifération des cellules épithéliales malignes peut se faire dans la lumière soit du canal galactophorique (on parle alors carcinome canalaire ou CCIS), soit des *acini* situés dans les lobules (on parle alors de carcinome lobulaire ou CLIS). Dans tous les cas, la membrane basale reste intacte et le tissu environnant n'est pas envahi. Les carcinomes *in situ* sont rares (2 à 3% des cas), et généralement de bon pronostic, mais peuvent évoluer vers un profil infiltrant dans 20% des cas.

Les carcinomes invasifs (infiltrant) : dans ce type de carcinomes, les cellules cancéreuses ont traversé la membrane basale et colonisent le tissu adjacent. Ils représentent la grande majorité des cancers du sein (98%), et sont le plus souvent canaux dans 75% des cas ou lobulaires dans 4 à 11% des cas. Il existe d'autres formes plus rares comme les carcinomes tubuleux, mucineux, médullaires, ou encore les carcinomes apocrines, adénoïdes kystiques, cribriforme, qui eux sont extrêmement rares (moins de 1%) et dits de bon pronostic.

Les cancers métastatiques : après avoir envahi le tissu adjacent, les cellules néoplasiques des carcinomes invasifs peuvent se disséminer à partir de la tumeur dite primaire, par l'intermédiaire des réseaux lymphatiques (le plus souvent), mais aussi sanguins. Les premiers relais ganglionnaires sont alors envahis à leur tour et peuvent être à l'origine d'une dissémination générale du cancer. Cet envahissement est le reflet du potentiel métastatique des cellules tumorales et est un facteur important de pronostic de la tumeur. Dans la plupart des cancers du sein, les métastases sont localisées au niveau des os, des poumons et du cerveau, et peuvent également être retrouvées dans le foie, la plèvre et la peau.

b. Différentes classifications

A l'heure actuelle, il n'est plus possible de parler de stades précoces et de stades tardifs, car ces appellations reposent sur le concept obsolète d'une progression tumorale régulière. Cependant, il est toujours important de classifier les différentes tumeurs dans le but de créer des groupes homogènes : homogènes sur le plan pronostic ainsi que sur le plan thérapeutique. C'est dans cette optique qu'a été créée la classification TNM basée sur l'extension locale (Tumeur), régionale (Node ou ganglion) et générale (Métastase) de la tumeur. Notre connaissance des tumeurs évolue et s'améliore de jour en jour, ce qui nous permet de faire évoluer les systèmes de classification des tumeurs. C'est le cas de la classification moléculaire des tumeurs, qui tient compte de l'expression de différents gènes.

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

Table 1 : Classification des stades de cancer du sein. Description des stades 0, I, II, III et IV des cancers du sein en fonction de la classification TNM.

Classification TNM (Table 1) : elle est fondée sur l'extension anatomique de la tumeur déterminée par la clinique et l'histopathologie. Elle est constituée d'une composante locale (T0 à T4), d'une composante ganglionnaire (N0 à N3) et d'une composante métastatique

INTRODUCTION

(M0 ou M1), où les chiffres associés reflètent la gravité du cancer. Ainsi, la cotation du T dépend du volume tumoral et de son extension à la cage thoracique ou à la peau. La cotation du N dépend du territoire ganglionnaire, plus ou moins proche de la tumeur, des dimensions des adénopathies, de leur nombre et de leur éventuelle fixation aux tissus voisins. Enfin, la lettre M est notée M0 en absence de métastase ou M1 en leurs présences, et ce, quelque soit leur siège, unique ou multiple. Cette classification nous permet donc de définir différents stades.

Sous-type	Description
Luminal A	Cancer de bas grade, représentant une réceptivité hormonale importante (ER α ++) et une faible prolifération. Expression des cytokératines luminales 8, 18 et du gène <i>GATA3</i> impliqué dans le contrôle de la croissance et le maintien de la différenciation des tumeurs ER+. Généralement traités par hormonothérapie et de bon pronostic. p53 muté dans moins de 15% des cas.
Luminal B/C	Expression du ER α moins important et prolifération plus forte que les cancers de type « luminal A ». De pronostic moins bon et donc généralement traités par hormonothérapie + chimiothérapie. p53 muté dans 40 à 80% des cas.
HER2	Surexpression de HER2 mais également d'autres gènes situés dans l'amplicon <i>ErbB2</i> comme <i>GRB7</i> . Tumeurs négatives pour les récepteurs hormonaux et généralement de grade III. Associé à une surexpression de c-myc et à une forte prolifération. Pronostic défavorable mais bonne réponse aux traitements de type anthracycline, taxane et Trastuzumab (Herceptin [®]). p53 muté dans environ 70% des cas.
Basal-like	Tumeurs dites « triples négatives », c'est-à-dire n'exprimant pas les récepteurs hormonaux (ER et PgR) et ne surexprimant pas le récepteur HER2. Expression des cytokératines basales 5/6, 14 et 17, des cavéolines 1 et 2, de l'EGFR et de c-kit. p53 muté dans 80% des cas et tumeurs souvent associées à une mutation de BRCA1. Pronostic le plus défavorable. Ne répondent pas aux traitements hormonaux et au Trastuzumab mais les chimiothérapies classiques peuvent aider. Présente un intérêt pour les essais cliniques d'anti-EGFR ou d'anti-angiogène.
Normal-like	Sous-type assez mal défini. Exprime des gènes connus pour être exprimés dans les cellules non-épithéliales et le tissu adipeux. Pronostic intermédiaire.

Table 2 : Classification moléculaire des cancers du sein. Les cancers de sous-types « Luminal » représentent environ 70% des cancers du sein, les « Basal-like » 10 à 20%, les « HER2 » 7 à 15% et les « Normal-like » 5 à 10%.

Classification moléculaire (Table 2) : Plus récente, elle est rendue possible grâce au développement des techniques d'analyse génomique à large échelle comme les biopuces à l'ADN. Ces techniques ont permis d'obtenir une carte d'identité moléculaire des tumeurs et de dégager de nouveaux facteurs pronostiques et prédictifs qui apportent de précieux compléments d'information pour la prise en charge des patientes atteintes de cancer du sein.

Les 5 sous-types de carcinomes mammaires ont été déterminés par l'équipe de Perou *et al.*, et ont été corrélés par la suite à des valeurs pronostiques comme une estimation du risque de rechute ou du bénéfice d'un traitement spécifique (Brenton *et al.*, 2005, Geyer *et al.*, 2009, Perou *et al.*, 2000, Sorlie *et al.*, 2001, Sotiriou *et al.*, 2003).

3. Tumorigenèse

La tumorigenèse de la glande mammaire est un processus multifactoriel ayant pour but, par l'accumulation d'altérations génétiques, de transformer une cellule normale en cellule cancéreuse. Ces altérations peuvent aboutir à l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur et/ou à l'activation d'oncogènes. Selon Hanahan et Weinberg, 6 modifications de la physiologie cellulaire sont considérées comme essentielles pour permettre aux cellules transformées de prendre le pas sur les cellules saines (Hanahan and Weinberg, 2000) :

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

a. Origine génétique

i. Inactivation des gènes suppresseurs de tumeur

Un gène suppresseur de tumeur est défini comme un gène dont la perte de fonction participe à l'oncogenèse. Certains de ces gènes jouent un rôle fondamental dans l'inhibition de la prolifération cellulaire comme le gène de la protéine Rb (inhibiteur du cycle cellulaire) ou de la protéine PTEN (inhibiteur de la PI3K) et sont appelés « gatekeepers ». D'autres gènes sont impliqués dans les processus de réparation de l'ADN (appelé « caretakers ») et sont les garants de la stabilité génomique tel p53 ou BRCA. Enfin, certains gènes, appelés « landscapers », peuvent moduler le microenvironnement cellulaire et l'implantation tumorale comme l'E-cadhérine ou le CD44. Pour qu'il y ait une perte de fonction de ces gènes suppresseurs de tumeur, il faut le plus souvent qu'il y ait une altération génétique simultanée sur les deux allèles des gènes. Selon le modèle de Knudson, cette situation de perte de fonction peut également arriver lorsqu'un allèle est altéré dans la lignée germinale (altération

INTRODUCTION

héréditaire dans toutes les cellules de l'organisme), la seconde survenant sur l'autre allèle de manière sporadique (Knudson, 2001). Nous allons voir quelques exemples de gènes suppresseurs de tumeurs mutés dans le cancer du sein.

- p53, également appelé « gardien du génome », est responsable de l'arrêt temporaire du cycle cellulaire pour permettre la réparation des dommages à l'ADN. Lorsque ces lésions sont trop importantes, p53 peut alors orienter la cellule en apoptose, éliminant ainsi les cellules potentiellement malignes. En règle générale, sa perte de fonction est due à une délétion d'un des allèles et à une mutation sur le second. Le gène *TP53* est situé sur la région 17p13 et des mutations, de mauvais pronostic, sont retrouvées dans 25% des cancers mammaires (IARC TP53 Database, novembre 2009).
- *RB1* est le premier gène suppresseur de tumeur qui a été découvert. Il intervient dans le contrôle du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S. Selon son état de phosphorylation (dû au complexe cycline/cdk), la protéine Rb permet ou non la libération du facteur de transcription E2F, facteur indispensable à cette transition. La perte de ce contrôle des « checkpoint » par Rb va entraîner la prolifération anarchique des cellules. Dans le cancer du sein, on observe une perte d'expression de la protéine Rb ou une perte d'hétérozygotie dans 25 à 30% des cas (Bosco and Knudsen, 2007).
- *BRCA1* et *BRCA2* sont des gènes suppresseurs de tumeurs dont les altérations prédisposent aux cancers du sein mais également aux cancers de l'ovaire, du pancréas et de la prostate. En terme de prédisposition, on estime qu'une femme porteuse de l'un ces gènes mutés a un risque de développer un cancer du sein avant 50 ans de 30 à 50% contre un risque de 2% pour le reste de la population. Ces deux protéines sont impliquées dans le processus de réparation à l'ADN mais aussi dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la régulation de la transcription, *via* leur interaction avec Rad51, p53 ou encore l'ARN polymérase II (Venkitaraman, 2002, Yoshida and Miki, 2004).

ii. Activation des oncogènes

Tout gène dont la régulation positive participe au processus oncogénique est appelé oncogène. Ces altérations génétiques peuvent être soit quantitatives (protéine produite en excès), soit qualitatives (protéine mutée hyperactive ou non régulée). Ces oncogènes peuvent être impliqués dans de nombreux processus biologiques différents comme la transduction des signaux de prolifération (FGF, PDGF, EGFR, Erb-B2, Ras, Raf, MEK, Myc, Jun...), le contrôle du cycle cellulaire (Cycline D1, Cdk4, Cdc25), la régulation négative de l'apoptose (Bcl2, Bcl-XL, Survivine), la dissémination métastatique (métalloprotéases,

protéines d'adhésion cellulaire) ou encore l'angiogenèse (VEGF). Dans le cancer du sein, les modifications génomiques les plus couramment observées sont les amplifications de l'ADN, tandis que les mutations ponctuelles, les insertions géniques et les réarrangements sont beaucoup plus rares (Osborne *et al.*, 2004).

Voici quelques exemples d'oncogènes le plus fréquemment retrouvés dans le cancer du sein.

- c-myc : son gène est localisé sur le chromosome 8q24. Il s'agit d'une phospho-protéine nucléaire qui régule la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Il est amplifié dans 15 à 25% des cancers du sein et plusieurs études le mettent en relation avec des tumeurs de haut grade et un mauvais pronostic (Blancato *et al.*, 2004, Liao and Dickson, 2000).
- Erb-B2 (HER2) : son gène est localisé en 17q21-22 et est l'homologue du gène *neu* isolé des cellules de neuroblastomes de rat. La protéine HER2 est un récepteur tyrosine kinase de la famille de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) et est dit orphelin car on ne lui connaît aucun ligand. Ce récepteur est impliqué dans de nombreux processus tels que la prolifération, l'angiogenèse, les interactions cellule/cellule, la formation de métastases ou encore la résistance à l'apoptose, et ce notamment par l'activation des voies de signalisation MAP-Kinases ou PI3K/Akt (Moasser, 2007). L'amplification du gène est corrélée à la surexpression de la protéine et est retrouvée dans 25% des cancers du sein. Les tumeurs HER2+ sont le plus souvent de haut grade histologique, négatives pour les récepteurs hormonaux et associées à un phénotype invasif. De plus, ces tumeurs sont de mauvais pronostic car elles sont résistantes à l'hormonothérapie ainsi qu'à certaines chimiothérapies. C'est pourquoi ces tumeurs font l'objet de traitements ciblés basés soit sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-HER2 (le Trastuzumab ou Herceptin™), soit sur un inhibiteur de tyrosine kinase spécifique à HER2 et l'EGFR (le Tyverb ou Lapatinib™) (Ross *et al.*, 2009).
- Ccdn1 : son gène est localisé en 11q13 et code pour la cycline D1 qui est à la fois un régulateur majeur des transitions G1/S et G2/M, mais également un facteur de transcription. La surexpression de cette cycline est retrouvée dans 50% des carcinomes mammaires alors que l'amplification de son gène n'est présente que dans 15% des cas (Arnold and Papanikolaou, 2005). Cette différence s'explique par le fait que d'autres facteurs tels que les œstrogènes ou p53 interviennent dans la surexpression de la cycline D1 (Roy and Thompson, 2006). De plus, cette surexpression a été montrée comme facteur de résistance aux traitements par Tamoxifen dans les cancers hormono-dépendants (Stendahl *et al.*, 2004).

INTRODUCTION

b. Origine cellulaire

L'origine cellulaire des cancers a longtemps été appréhendée par le modèle dit stochastique. Ce modèle part du principe que chaque cellule d'un tissu, même différenciée, peut, à la suite d'accumulation de mutations génétiques aléatoires, proliférer de façon anarchique et former un clone tumoral indépendant. C'est le concept d'origine clonale des tumeurs. Cependant, certaines observations sont difficilement conciliables avec ce type de modèle. Tout d'abord, les cellules différenciées sont des cellules qui prolifèrent peu, et donc beaucoup moins sujettes à l'accumulation de mutations génétiques. De plus, la plupart des tumeurs, y compris les tumeurs mammaires, sont très hétérogènes et présentent différents degrés de différenciation et de transformation. Il est alors difficile de comprendre comment une cellule différenciée peut donner un large panel de cellules moins différenciées. Enfin, si on considère que chaque cellule cancéreuse possède un set d'altérations génétiques suffisant pour former une tumeur, comment expliquer la nécessité d'injecter un très grand nombre de ces cellules pour développer une tumeur dans les modèles animaux de xénogreffes (Polyak and Hahn, 2006, Shipitsin and Polyak, 2008).

Toutes ces observations ont permis de remettre en cause le modèle stochastique en proposant un nouveau concept : le modèle hiérarchique. En effet, de nombreuses données montrent, comme pour le système hématopoïétique, que les tissus épithéliaux sont soumis à un constant renouvellement hautement régulé. Ce renouvellement tissulaire implique donc une hiérarchie cellulaire comprenant des cellules souches qui pourront donner naissance à des cellules progénitrices précoces puis tardives. Appliquée au cancer, cette notion présente plusieurs avantages conceptuels. Tout d'abord, les cellules souches ou progénitrices sont capables de donner naissance à l'ensemble des types cellulaires du tissu dans lequel elles se trouvent. De plus, ces cellules possèdent un potentiel de renouvellement illimité, ce qui les rend susceptibles d'accumuler les mutations génétiques nécessaires à l'initiation de la transformation tumorale. L'équipe de John Dick, en 1997, pose pour la première fois le terme de cellules souches cancéreuses (CSC) grâce à ses travaux sur la leucémie dans un modèle animal. Il a pu observer que ces cellules partageaient des propriétés propres aux cellules souches normales (Bonnet and Dick, 1997). Depuis cette découverte, des CSC ont été isolées dans de nombreux cancers dont le cancer du sein (Charafe-Jauffret *et al.*, 2008).

Dans les tumeurs mammaires, les CSC proviendraient directement des cellules souches normales adultes du tissu épithélial et seraient le seul lieu des altérations génétiques primaires. Ainsi, les caractéristiques de ces CSC seront celles des cellules souches normales à savoir l'auto-renouvellement, la longue durée de vie, la capacité à reproduire l'hétérogénéité cellulaire, avec en plus d'autres capacités acquises grâce aux altérations

génétiques comme la prolifération continue et l'autonomie vis-à-vis de la « niche » environnementale dans laquelle se développent les cellules souches (Figure 6). Dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7, il a été estimé que les CSC ne représenteraient que 2% de la population totale mais que seuls ces 2% furent capables de reproduire une tumeur hétérogène identique à la lignée MCF-7 après injection dans des souris NOD/SCID (Kondo *et al.*, 2004, Patrawala *et al.*, 2005). Un phénotype fondé sur l'expression de marqueurs de surface a également été mis en évidence et est défini par l'expression de CD44 et l'absence ou la faible expression de CD24 ($CD44^+/CD24^{low}$) (Al-Hajj *et al.*, 2003, Ponti *et al.*, 2005). Toutefois, il existe des divergences d'opinion sur la relevance de ces marqueurs moléculaires puisqu'il pourrait s'agir de phénotype associé aux avantages sélectifs conférés par l'accumulation d'altérations génétiques lors de l'évolution tumorale.

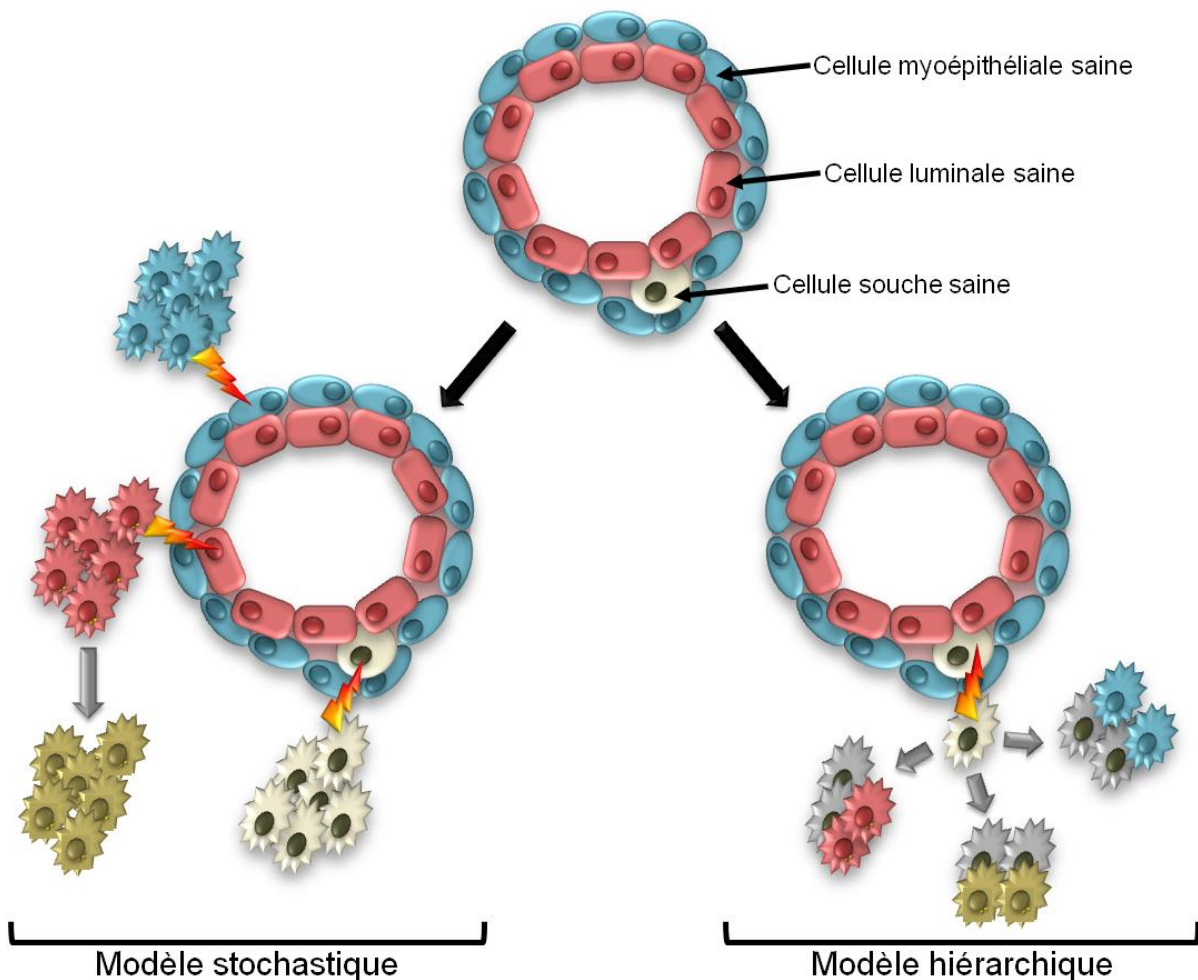


Figure 6 : Les deux concepts de l'origine cellulaire du cancer du sein. Dans le modèle stochastique, chaque cellule de l'épithélium mammaire peut être transformée et donner un clone tumoral composé de cellules qui ont toutes la capacité de proliférer de façon indéfinie et d'évoluer en réponse à l'accumulation de nouvelles mutations génétiques. Dans le modèle hiérarchique, seule une cellule souche, ou progénitrice, peut être la cible de l'oncogenèse. Ainsi, seules les cellules souches cancéreuses vont proliférer indéfiniment et donneront naissance à l'hétérogénéité tumorale en se différenciant (adapté de Ginestier *et al.*, 2007).

INTRODUCTION

c. Origine environnementale

Le tissu épithélial mammaire fait partie d'un microenvironnement complexe qui comprend la matrice extracellulaire, des facteurs diffusibles tels que les cytokines ou les facteurs de croissance, et une grande variété de cellules non épithéliales comme les cellules endothéliales, les lymphocytes, les macrophages ou encore les fibroblastes. Lors de la tumorigenèse, les cellules épithéliales cancéreuses ont la faculté de modifier ce stroma par l'intermédiaire de facteurs de croissance qui peuvent induire l'angiogenèse, altérer la matrice extracellulaire, accélérer la croissance des fibroblastes ou encore accroître le recrutement des cellules inflammatoires. En retour, les cellules du stroma, en participant au remodelage de la matrice et étant une source importante de facteurs de croissance, sont également capables de favoriser la progression tumorale.

L'importance de la communication entre les cellules cancéreuses et les cellules du stroma lors de la tumorigenèse a été démontrée assez récemment. Bien qu'il soit connu que le TGF- β (transforming growth factor β) présente un effet antiprolifératif sur les cellules tumorales de stades précoces (Chang *et al.*, 2007), l'équipe de Moses a montré, grâce à un modèle de co-transplantation chez la souris, que des fibroblastes KO pour le récepteur au TGF- β favorisaient la croissance et l'invasion des cellules épithéliales cancéreuses mammaires en augmentant l'expression de l'HGF (hepatocyte growth factor) et de sa signalisation (Bhowmick *et al.*, 2004, Cheng *et al.*, 2007, Cheng *et al.*, 2008).

Le facteur de croissance VEGF (vascular endothelial growth factor) est un autre exemple d'interaction entre le stroma et le tissu épithélial, favorisant la tumorigenèse. En effet, le VEGF peut être sécrété par les cellules tumorales mais également par les cellules endothéliales. Il favorise ainsi la formation de métastases par différentes actions puisqu'il induit à la fois la résistance à l'apoptose et la migration des cellules cancéreuses, mais aussi augmente la prolifération des cellules endothéliales, la perméabilité microvasculaire et l'angiogenèse. L'ensemble de ces processus aboutit à une meilleure nutrition de la tumeur mais aussi à l'essaimage des cellules cancéreuses. L'expression du VEGF est d'ailleurs associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein et il est la cible de nombreuses approches thérapeutiques (Grothey and Galanis, 2009, Mohammed *et al.*, 2007).

A la liste des facteurs de croissance capables d'agir de façon paracrine ou autocrine sur les cellules cancéreuses de sein, notre laboratoire a ajouté la famille des neurotrophines. En effet, les cellules cancéreuses mammaires sécrètent le NGF (nerve growth factor), le BDNF (brain derived neurotrophic factor) ainsi que la NT4/5 (neurotrophin 4/5). Ces facteurs induisent la prolifération et/ou la survie de ces mêmes cellules (Descamps *et al.*, 2001b, Dolle *et al.*, 2003, Vanhecke *et al.*, 2011). De plus, ils constituent de potentielles cibles

thérapeutiques dans la mesure où l'utilisation d'anticorps bloquant anti-NGF, anti-BDNF ou anti-NT4/5 réduit la formation de tumeurs mammaires dans un modèle de xénogreffes (Adriaenssens *et al.*, 2008, Vanhecke *et al.*, 2011). Le NGF sécrété par les cellules cancéreuses mammaires agit aussi de façon paracrine en augmentant la migration et l'invasion des cellules endothéliales (Dolle *et al.*, 2005a, Romon *et al.*, 2010).

Il est à noter que les facteurs de croissance ne sont pas les seuls responsables du mode d'action du microenvironnement sur les cellules cancéreuses mammaires. C'est le cas par exemple des métalloprotéases (MMPs), qui sont capables de dégrader la matrice extracellulaire, favorisant ainsi l'invasion des cellules tumorales, ou encore des chimiokines telle que la SDF1/CXCL12 (stromal cell-derived factor 1/chemokine CXC motif ligand 12) sécrétée par les fibroblastes et les péricytes. Celle-ci favorise la prolifération des cellules tumorales qui expriment son récepteur CXCR4 (CXC chemokine receptor 4) et contribue à l'angiogenèse *via* le recrutement de progéniteurs endothéliaux (Orimo *et al.*, 2005). Ainsi, avec l'ensemble des observations de l'action du microenvironnement dans la tumorigenèse mammaire, cibler les différentes molécules dérégulées pourrait faire émerger de nouvelles opportunités thérapeutiques (Joyce, 2005, Joyce and Pollard, 2009).

d. Développement du cancer

La progression tumorale comporte plusieurs étapes distinctes, de la transformation d'une cellule à l'apparition des métastases. Nous prendrons pour exemple le développement d'un carcinome canalaire mammaire, afin d'illustrer les 4 grandes étapes de la tumorigenèse (Figure 7).

Tout d'abord, l'initiation est un évènement souvent antérieur de plusieurs années au diagnostic de cancer du sein. Il s'agit d'une altération génétique des cellules qui pourront alors proliférer de façon anarchique pour former une excroissance tissulaire appelée hyperplasie. Cette hyper-prolifération pourra alors se poursuivre lors de l'étape de promotion, aboutissant à l'apparition d'un carcinome canalaire *in situ*. Lors de cette phase, les cellules pourront acquérir davantage d'altérations génétiques, ce qui leur conférera de nouvelles propriétés biologiques, rendant la tumeur de plus en plus agressive. C'est alors l'étape de dissémination qui consiste en un envahissement du tissu conjonctif adjacent suite à la rupture de la lame basale. Cette rupture est le résultat de l'obtention de nouvelles propriétés biologiques par les cellules cancéreuses, notamment des capacités migratoires. Enfin, le dernier stade est celui de la métastase, où les cellules pourront quitter le sein, *via* les

INTRODUCTION

réseaux lymphatiques ou sanguins, pour envahir des organes comme le poumon, le foie, le cerveau ou les os (Weigelt *et al.*, 2005).

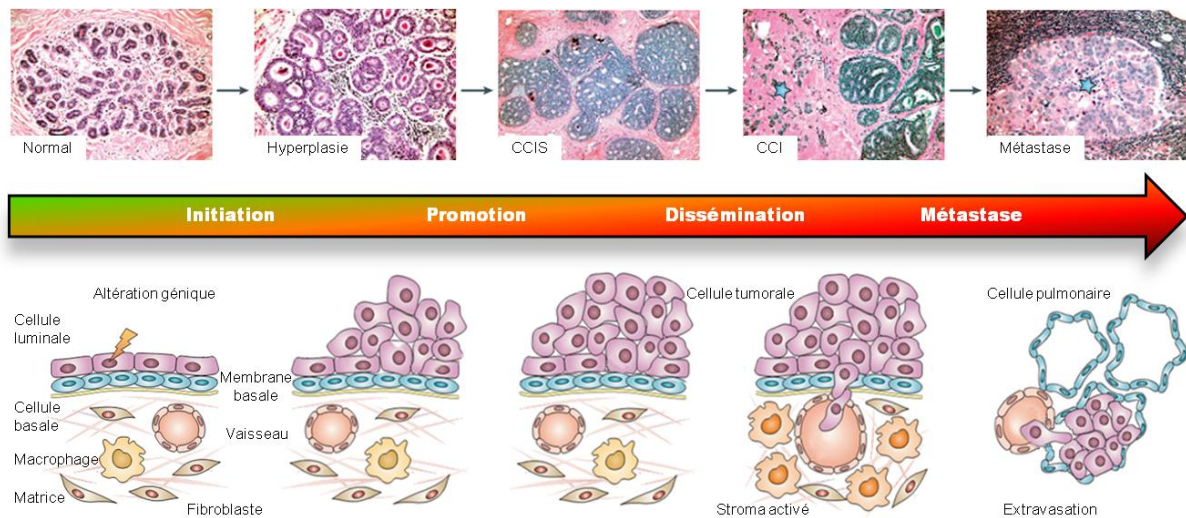


Figure 7. Les étapes de la cancérisation mammaire. Suite à une altération de leur génome, les cellules de l'épithélium mammaire vont être initiées, conduisant à leur prolifération anarchique hyperplasique. Cette prolifération des cellules initiées formera un carcinome in situ bien circonscrit par la lame basale. Cette membrane basale sera alors par la suite rompue, et les cellules cancéreuses pourront se disséminer dans le tissu conjonctif adjacent pour former une tumeur maligne. Cette tumeur, devenue invasive, pourra également former après développement des métastases distantes. Ces différentes étapes sont représentées par des coupes histologiques d'un tissu mammaire sain, d'une hyperplasie, d'un carcinome canalaire in situ, d'un carcinome canalaire invasif et d'une métastase dans un nœud lymphatique. Adapté de Vargo-Gogola et Rosen, 2007.

4. Cancer du sein et thérapie

La chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont souvent complétées d'hormonothérapie (Tamoxifen, inhibiteur d'aromatase) et/ou de thérapies ciblées telles que l'Herceptine™ (ou trastuzumab, anticorps monoclonal humanisé anti-ErbB2) ou encore l'Avastin™ (ou bevacizumab, anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF). Cependant, ces traitements ciblés ne sont applicables que dans un nombre restreint de cas, le plus souvent dans les cancers du sein métastatiques et/ou qui surexpriment Erb-B2. De plus, les phénomènes de résistance acquise ou intrinsèque, représentent une limite importante, d'où le rôle primordial de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer l'efficacité des traitements du cancer du sein. Actuellement, les nouvelles approches étudiées en essais cliniques ciblent l'induction de l'apoptose ou l'inhibition des protéines anti-apoptotiques, la transduction du signal, mais aussi l'angiogenèse (Normanno *et al.*, 2009, Schlotter *et al.*, 2008)

a. Ciblage des voies pro- et anti-apoptotique

Une des grandes caractéristiques des cellules cancéreuses est la résistance à l'apoptose, ce qui en fait une cause majeure d'échec thérapeutique. Cette résistance peut être due à des mutations ou modifications épigénétiques qui conduisent à de faibles expressions de protéines pro-apoptotiques ou au contraire à de fortes surexpressions de protéines anti-apoptotiques. Par conséquent, la découverte et l'établissement de nouvelles drogues permettant de réactiver le processus de mort cellulaire représente une option prometteuse. La cytokine TRAIL (tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand), de part sa capacité à induire la mort dans de nombreux types cellulaires cancéreux sans affecter les cellules saines, en fait partie. Deux approches sont actuellement développées : la synthèse de différentes formes solubles de TRAIL recombinant, et des anticorps monoclonaux agonistes dirigés contre les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Newsom-Davis *et al.*, 2009). Dans le premier cas, différentes versions « taggées » de la protéine ont été générées, mais il apparaît clairement que c'est la forme non modifiée du TRAIL recombinant humain, Apo2L/TRAIL ou dulanermin, qui a la meilleure activité anti-tumorale *in vivo*. De plus, elle fait l'objet de nombreuses études cliniques de phase I et II dans de nombreux cancers comme les cancers colorectaux, les cancers du poumon non à petites cellules et les lymphomes non-Hodgkinien (<http://clinicaltrials.gov/>). Bien que cette molécule donne des résultats encourageants, elle a une demi-vie courte dans le plasma et peut être toxique à des doses élevées. C'est pour résoudre ces problèmes qu'ont été développés les anticorps monoclonaux agonistes qui sont plus spécifiques et avec une durée de vie plus longue. Nous pouvons citer le conatumumab, anticorps monoclonal anti-TRAIL-R2, actuellement en essais cliniques dans de nombreux cancers, soit en monothérapie, soit en association avec d'autres agents cytotoxiques. Enfin, notons que cette dernière molécule est en essai clinique de phase II dans le cancer du sein (Wiezorek *et al.*, 2010).

Une autre stratégie consiste à cibler les protéines impliquées dans la voie mitochondriale de l'apoptose, voire à cibler la mitochondrie directement (Fulda *et al.*, 2010). En effet, dans les premières étapes de l'apoptose, un grand nombre de protéines pro- ou anti-apoptotiques converge à la surface de la mitochondrie pour activer ou inhiber le relargage de facteurs pro- ou anti-apoptotiques vers le cytosole. Parmi ces protéines, l'anti-apoptotique Bcl-2 (B-cell lymphoma protein-2), de part sa surexpression dans de nombreux cancers, est associée à la résistance des cellules cancéreuses aux drogues cytotoxiques. Plusieurs composés visent à inhiber cette protéine, à l'instar de l'Oblimersen (ou G3139) qui est un oligonucléotide antisens dirigé contre l'ARNm de Bcl-2, inhibant ainsi sa traduction. Un essai clinique de phase I/II a été mené chez des patientes atteintes d'un cancer du sein, afin d'évaluer son efficacité et son éventuelle toxicité en combinaison avec la doxorubicine et le docetaxel.

INTRODUCTION

Malgré une bonne tolérance au traitement, cet essai fut plutôt décevant dans la mesure où aucune amélioration significative n'a pu être observée. Ces résultats sont en partie dus à la faible diminution de la protéine Bcl-2 dans les conditions d'administration de l'Oblimersen utilisées pour cet essai (Moulder *et al.*, 2008). Le clodronate, composé de la famille des biphosphonates, va agir directement sur la mitochondrie, et plus précisément en inhibant une protéine faisant partie du pore de transition de perméabilité (PTPC, permeability transition pore complex). Cette inhibition perturbe la consommation d'oxygène de la mitochondrie et induit l'apoptose. Une étude effectuée sur 302 patientes a montré que cette molécule améliorait la survie globale des patientes atteintes d'un cancer du sein et de micrométastases dans la moelle osseuse (Diel *et al.*, 2008).

b. Ciblage des voies de signalisation

La voie de signalisation mTOR (mammalian target of rapamycin) joue un rôle central dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la survie, la migration, l'angiogenèse ou encore la synthèse protéique (Dancey, 2010). Bien qu'aucune mutation ni surexpression de mTOR ne soient connues, les voies de signalisation en amont de cette protéine telles que celles de l'IGF-1, de l'EGF et du VEGF sont souvent dérégulées dans les cancers (Bjornsti and Houghton, 2004, Guertin and Sabatini, 2007). De plus, la rapamycine, un inhibiteur naturel de mTOR, présente une activité anti-tumorale dans plusieurs modèles de tumeurs solides. Pour le cancer du sein, la rapamycine inhibe la croissance dans 20 lignées cancéreuses mammaires et augmente de manière significative l'efficacité de l'Herceptine™ dans les cellules surexprimant HER2 (Wang *et al.*, 2007). C'est pourquoi des dérivés de rapamycine comme le temsirolimus ou l'everolimus ont été développés et sont actuellement en essais cliniques dans le cancer du sein. Une étude a montré que l'everolimus augmente l'efficacité du letrozole, un anti-aromatase, chez les patientes atteintes d'un cancer du sein hormono-dépendant (Baselga *et al.*, 2009).

La protéine de stress HSP90 (heat shock protein 90) est également une cible intéressante car elle intervient dans la maturation et la stabilisation de nombreuses oncoprotéines, ce qui rend les cellules cancéreuses dépendantes de sa fonctionnalité. Cette protéine chaperonne intervient sur de nombreuses protéines comme des récepteurs tyrosine kinase (HER2, EGFR, PDGFR), des protéines de signalisation (p53, v-Src, Akt, Raf-1, IKK), des régulateurs du cycle cellulaire (cdk4, cdk6) ou encore des récepteurs aux stéroïdes (récepteurs aux androgènes, œstrogènes et progestérone). Notons que la plupart de ces protéines sont mutées et/ou surexprimées dans de nombreux cancers. De ce fait, une molécule permettant d'inhiber cette HSP90 permettrait de perturber de nombreuses voies de signalisation

indispensables aux cellules cancéreuses (Di Cosimo and Baselga, 2008, Li *et al.*, 2009). C'est pour cette raison que des composés comme la tanespimycine, ciblant le site de fixation de l'ATP de la protéine HSP90 ont été développés. Cet inhibiteur a fait l'objet d'un essai clinique chez des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+ métastatique, réfractaire à l'Herceptine™. Les résultats sont assez encourageants puisqu'un co-traitement tanespimycine/Herceptine™ a montré une bonne activité anti-tumorale, suggérant une potentialisation de l'Herceptine™ par l'inhibiteur d'HSP90 ou un effet propre de l'inhibiteur (Modi *et al.*, 2007).

c. Ciblage de l'angiogenèse

L'inhibition de l'angiogenèse tumorale est une stratégie visant à éliminer la tumeur cancéreuse en la privant de sa relation avec le système circulatoire sanguin qui lui apporte tous les nutriments nécessaires à son développement. C'est pourquoi l'Avastin™ (ou bevacizumab, anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF) a été développé pour inhiber ce processus. Après le succès de cette molécule, d'autres agents ont vu le jour sous forme d'inhibiteurs « multikinases », qui ciblent les récepteurs du VEGF, mais également d'autres récepteurs tyrosine kinases. Le sorafenib (ou Nexavar®) en est un exemple. A l'origine développé pour cibler la kinase Raf, il inhibe également les 3 récepteurs du VEGF, le récepteur du PDGF- β (platelet-derived growth factor- β) et le récepteur du SCF (stem-cell factor) c-Kit (Wilhelm *et al.*, 2008). Le sorafenib est donc un agent anti-angiogénique mais également anti-prolifératif et il a été montré dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 qu'il pouvait induire l'apoptose *via* l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1) (Yu *et al.*, 2005). Cette molécule est déjà approuvée aux Etats-Unis et en Europe pour les traitements des cancers du rein et du foie. Concernant le cancer du sein, un premier essai clinique en monothérapie a montré des résultats décevants chez les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique (Moreno-Aspitia *et al.*, 2009).

Toutes ces thérapies se confrontent à un moment ou à un autre à 2 problématiques majeures, à savoir la spécificité/adressage des traitements (afin d'administrer les molécules dans les meilleures conditions possibles sans léser les cellules saines adjacentes aux cellules cancéreuses), mais aussi aux phénomènes de résistance aux traitements. Pour le problème de la spécificité/adressage, aux études bien connues sur l'encapsulation des drogues à l'intérieur de liposomes (Sharma *et al.*, 2006), de nouvelles stratégies basées sur l'utilisation de nanoparticules commencent à voir le jour (Grobmyer *et al.*, 2011). En effet, ces nanoparticules présentent 2 avantages majeurs : la conservation de l'activité biologique des drogues et ce même en cas de transport plasmatique, ainsi qu'un effet bénéfique en

INTRODUCTION

terme de franchissement de la membrane plasmique afin de faciliter l'accès de la drogue à sa cible. Concernant les phénomènes de résistance, la première stratégie repose sur l'application de thérapies dites combinatoires. Sur ce sujet, de nombreuses études ont récemment été menées dans le cadre de cancer du sein ; brièvement, nous pouvons noter les résultats suivants : sunitinib (inhibiteur multikinases)+paclitaxel (anti-mitotique) a un taux de réponse de 38.9% (Kozloff *et al.*, 2010), sunitinib+Herceptine™ a 24% (Puente *et al.*, 2010) et sunitinib+Herceptine™+docetaxel a 77.7% (Rosen *et al.*, 2010). Notons également qu'un autre essai clinique avec un co-traitement sunitinib+paclitaxel+Avastin® s'est montré trop toxique pour les patientes et a dû être stoppé, suggérant que la combinaison de 2 traitements anti-angiogéniques n'est pas réalisable avec le protocole utilisé lors de cet essai (Mayer *et al.*, 2010). Enfin, la découverte récente des cellules souches cancéreuses a permis d'expliquer en partie les phénomènes de rechute cancéreuse. A partir de ce constat, il a été émis l'idée que le seul moyen d'éliminer de façon durable les tumeurs cancéreuses était de cibler spécifiquement ces cellules souches cancéreuses. De nombreuses stratégies sont actuellement à l'étude mais de nombreux essais cliniques seront nécessaires avant de pouvoir tirer un bilan sur cette nouvelle option prometteuse (Federici *et al.*, 2011).

II- RECEPTEUR P75^{NTR} ET SA SIGNALISATION

A. p75^{NTR}

La protéine p75^{NTR} fut identifiée en 1973 comme étant le récepteur du Nerve Growth Factor et fut donc appelé NGFR (Nerve Growth Factor Receptor) (Herrup and Shooter, 1973). Son clonage en 1986 et des expériences de transfection ont révélé une faible affinité pour le NGF (Kd=10⁻⁹M), et il fut alors rebaptisé récepteur de faible affinité du NGF, LNGFR (low affinity NGFR) (Chao *et al.*, 1986, Johnson *et al.*, 1986, Radeke *et al.*, 1987). La protéine p75^{NTR} ne prendra son nom actuel qu'à la suite de la découverte des autres neurotrophines (BDNF, NT3 et NT4/5). En effet, il est apparu que toutes les neurotrophines liaient ce récepteur avec la même affinité dans la plupart des types cellulaires, d'où son nom de p75^{NTR} pour Neurotrophin Receptor (Rodriguez-Tebar *et al.*, 1990, Rodriguez-Tebar *et al.*, 1992).

1. Aspect génétique

Le gène du récepteur p75^{NTR} humain (GeneID : 4804) comporte 6 exons et représente 23 kb du chromosome 17 en région q21-q22. La transcription de ce gène donne un ARNm de 3,4 kb (N° accession NCBI : NM_002507) contenant une région non codante de 300 nucléotides en 5' et de 2000 nucléotides en 3' avec une séquence unique de polyadénylation (Johnson *et al.*, 1986). Son promoteur est très conservé entre les espèces comme le rat, la souris et l'homme. Il est dépourvu de séquence consensus TATA et CAAT mais contient en revanche plusieurs séquences riches en GC proches du site d'initiation de la transcription, correspondant à un site de fixation du facteur de transcription sp1. Le promoteur de *NGFR* est aussi composé de plusieurs E-box, permettant de lier différents facteurs de transcription comme ME1 qui réprime l'expression de p75^{NTR} ou NeuroD et bHLH qui active sa transcription (Metsis, 2001). De plus, chez le rat, l'expression de p75^{NTR} est régulée par différents récepteurs nucléaires dont les éléments de réponse ont été trouvés sur son promoteur. Ainsi, le récepteur de vitamine D3 réprime l'expression de p75^{NTR} dans les cellules de gliome (Naveilhan *et al.*, 1996). De plus, la testostérone *via* le récepteur aux androgènes réprime la synthèse de p75^{NTR} au cours de la spermatogenèse (Lim *et al.*, 2009, Persson *et al.*, 1990). Enfin, l'acide rétinoïque permet la différenciation neuronale en activant directement la transcription de *NGFR* ou indirectement en favorisant la synthèse du facteur de transcription NeuroD (Metsis *et al.*, 1992, Zhang *et al.*, 2009).

INTRODUCTION

2. Structure protéique

Après le clivage du peptide signal de 28 acides aminés, p75^{NTR} (N° accession NCBI : NP_002498) est un récepteur transmembranaire de type I de 399 acides aminés dont un domaine extracellulaire de 222 acides aminés, un domaine transmembranaire de 19 acides aminés et un domaine intracellulaire de 158 acides aminés (Figure 8).

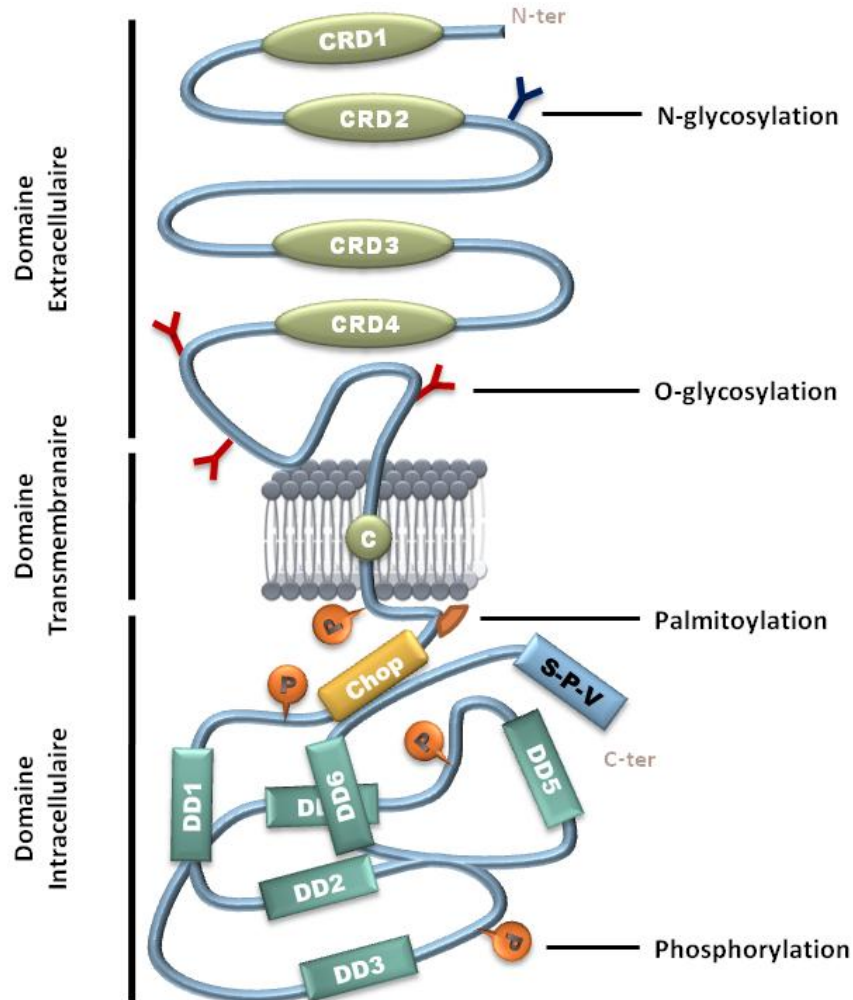


Figure 8. Représentation schématique du récepteur p75^{NTR}. Le récepteur p75^{NTR} est constitué d'un domaine extracellulaire avec 4 régions riches en cystéines (CRD), d'une région transmembranaire unique contenant une cystéine conservée (C) qui joue un rôle primordial dans la transduction du signal, et d'un domaine intracellulaire comprenant un domaine Chopper juxtamembranaire, un domaine de mort (DD) ainsi que le tripeptide SPV en C-terminal consensus de liaison aux protéines à domaine PDZ. Il est décrit comme présentant plusieurs modifications post-traductionnelles telles que des N- et O- glycosylations, un ancrage à la membrane par palmitoylation ainsi que des phosphorylations permettant de moduler l'activité de la GTPase Rho A. (Adapté de Roux et Barker, 2002).

Domaine extracellulaire et transmembranaire. La partie extracellulaire du récepteur possède un site de N-glycosylation en N-terminal (position 33) et plusieurs sites de O-glycosylation dans le domaine juxtamembranaire, entraînant une forte augmentation de

masse du récepteur, le faisant passer de 45 à 75 kDa (Large *et al.*, 1989). Ces glycosylations sont impliquées à la fois dans l'adressage du récepteur à la membrane (Breuza *et al.*, 2002) mais aussi dans la liaison de ses ligands (Gong *et al.*, 2008). Le domaine extracellulaire de p75^{NTR} est composé de quatre domaines riches en cystéines appelés CRD (cystein-rich domain), ce qui lui vaut d'appartenir à la superfamille du TNF (tumor necrosis factor). Chacun de ces CRD, numéroté de 1 à 4 à partir du N-terminal, comporte 3 ponts disulfures conférant au récepteur sa conformation et la liaison des ligands. Le domaine transmembranaire est constitué d'une unique hélice transmembranaire de 19 acides aminés dans laquelle la cystéine C257 est hautement conservée chez l'homme, le rat, le xénope et l'amphioxus. Cette cystéine joue un rôle primordial dans la dimérisation du récepteur, dans les changements conformationnels induits par la liaison des ligands et par conséquent dans la transduction du signal (Vilar *et al.*, 2006).

Domaine intracellulaire. Ce domaine de p75^{NTR} est très conservé entre les espèces et ne possède pas d'activité enzymatique propre. De ce fait, sa signalisation se fait par le recrutement de partenaires protéiques cytoplasmiques qui peuvent se fixer sur différentes régions. Parmi ces régions, la plus proéminente est le domaine de mort « DD » (death domain) qui consiste en une structure globulaire de 80 acides aminés comprenant 6 hélices alpha. Contrairement aux autres membres de la famille des récepteurs du TNF tel le TNFR ou Fas, il s'agit d'un domaine de mort de type II. Bien que les hélices 2 à 6 aient une orientation identique pour Fas et p75^{NTR}, c'est le réarrangement de l'hélice 1 qui diffère, avec un décalage de près de 90° entre les deux domaines de mort (Liepinsh *et al.*, 1997). Cette différence est d'une importance capitale sur le plan physiologique car le DD de p75^{NTR} ne présente pas les mêmes propriétés de multimérisation que Fas et ne fixe pas les mêmes protéines adaptatrices (Wang *et al.*, 2001). L'autre principale région du domaine intracellulaire est un domaine de 29 acides aminés situé dans la partie juxtamembranaire. C'est une équipe australienne qui démontra que ce domaine était suffisant et nécessaire pour induire la mort neuronale et le baptisa « Chopper » en référence à un célèbre criminel australien (Coulson *et al.*, 2000). Il présente 95% d'homologie de séquence entre l'homme, le rat et le poulet mais n'est cependant pas conservé au sein des autres membres de la famille du TNFR. Il est à noter que pour exercer son effet pro-apoptotique dans les neurones, ce domaine doit être à la membrane car la partie intracellulaire agit quant à elle comme un dominant négatif et a donc un effet anti-apoptotique (Coulson *et al.*, 2000, Coulson *et al.*, 2004). A l'extrémité C-terminale de p75^{NTR} se trouve un tripeptide serine-proline-valine (SPV) très conservé, qui est une séquence consensus de liaison aux protéines à domaines PDZ (post-synaptic disc-large zona). Ces protéines permettent l'assemblage de complexes protéiques servant de plateforme de signalisation et pourraient également jouer un rôle dans

INTRODUCTION

la localisation cellulaire en interagissant directement avec les lipides membranaires (Gallardo *et al.*, 2010, Hung and Sheng, 2002). Enfin, le domaine intracellulaire de p75^{NTR} est soumis à des modifications post-traductionnelles telles qu'une palmitoylation et plusieurs phosphorylations. En effet, une palmitoylation a été reportée sur la cystéine C279 juxtamembranaire et est nécessaire au clivage de p75^{NTR} par la γ -secrétase (Barker *et al.*, 1994, Underwood *et al.*, 2008). Concernant les phosphorylations, il a été montré que le domaine de mort de p75^{NTR}, suite à la fixation du NGF, pouvait être phosphorylé sur 2 résidus tyrosine, Y336 et Y368, ce qui aboutit à l'activation/inactivation des GTPases Ras et RhoA intervenant dans la croissance des neurites (Blochl *et al.*, 2004, Blochl and Blochl, 2007). La sérine S304 de p75^{NTR} peut également être phosphorylée par la PKA (c-AMP-dependent protein kinase A), permettant sa relocalisation dans les rafts lipidiques (Higuchi *et al.*, 2003). Enfin, la sérine S277 serait phosphorylée par la PKC (protein kinase C) et permettrait de contrôler la durée du signal du complexe p75^{NTR}/ligand après le transport rétrograde dans les neurones (Butowt and von Bartheld, 2009)

3. Différentes formes du récepteur

Le récepteur p75^{NTR} peut être présent dans les cellules sous plusieurs formes différentes. Ces formes résultent soit d'un épissage alternatif de l'ARNm, soit d'une protéolyse partielle du récepteur (Figure 9).

a. Epissage alternatif

Un transcrit alternatif de p75^{NTR} a été découvert dans les ganglions sympathiques de poulet. Sa séquence correspond à celle connue pour p75^{NTR} à l'exception de l'exon III qui est délété. Ce transcrit alternatif génère une isoforme dépourvue des CRD2, 3 et 4 de son ectodomaine et est incapable de fixer les ligands de p75^{NTR}. Des analyses par RT-PCR ont montré que cette isoforme est également exprimée chez la souris, le rat et l'homme mais à un niveau plus faible que la forme pleine longueur (von Schack *et al.*, 2001). Bien que les domaines transmembranaire et intracellulaire de cette isoforme restent intacts et *a priori* fonctionnels, la fonction biologique de ce p75^{NTR} tronqué demeure inconnue.

b. Protéolyse

Le récepteur p75^{NTR} est la cible de 2 clivages successifs connus sous le nom de RIP pour « regulated intramembrane proteolysis ». Cette protéolyse de p75^{NTR} consiste tout d'abord en un premier clivage par la métalloprotéase ADAM17/TACE (a disintegrin and metalloprotease/TNF α converting enzyme) au niveau de la partie extracellulaire

juxtamembranaire. Ce clivage permet la libération d'un fragment soluble nommé p75^{NTR}-ECD (extracellular domain) comprenant le domaine extracellulaire de p75^{NTR} composé des 4 régions riches en cystéine capables de lier les neurotrophines. L'autre partie du récepteur, toujours liée à la membrane plasmique, comprend les domaines transmembranaire et intracellulaire et est appelée p75^{NTR}-CTF (C-terminal fragment). Le site exact de ce premier clivage n'est pas connu mais, néanmoins, des expériences de mutagenèse dirigée et une identification par spectrométrie de masse ont permis d'identifier 2 sites potentiels dans la séquence de p75^{NTR} : soit entre la proline P241 et la valine V242, soit entre la thréonine T244 et l'arginine R245 (Weskamp *et al.*, 2004, Zampieri *et al.*, 2005). De plus, la mutation de la valine V242 en asparagine permet la création d'un site de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) et inhibe le clivage de p75^{NTR} par ADAM17, probablement par encombrement stérique (Underwood *et al.*, 2008). Ce premier clivage est un pré-requis à un second réalisé sur le fragment CTF par la presenilin-1 qui fait partie du complexe protéique γ -secrétase. Ce second clivage a lieu dans la partie transmembranaire et libère dans le cytoplasme un fragment intracellulaire nommé p75^{NTR}-ICD (intracellular domain). Le site de ce second clivage a été identifié par spectrométrie de masse et se situe entre les valines V263 et V264, juste après la séquence ²⁶⁰AAVV²⁶³.

Plusieurs voies de signalisation ont été montrées comme impliquées dans le clivage de p75^{NTR}. Dans la lignée de cellules de rat PC12 (pheochromocytoma cell), il a été montré que l'activation de TrkA (tropomyosin receptor kinase A) par le NGF augmentait le clivage de p75^{NTR} via la voie des MAP-kinases. Suite à ce clivage, p75^{NTR} activerait la voie Akt et provoquerait l'arrêt du cycle cellulaire (Ceni *et al.*, 2010). La voie JNK (jun N-terminal kinase) semble également être impliquée. En effet, dans les neurones sympathiques de rat, le BDNF via p75^{NTR} active la kinase JNK3 qui va induire la transcription de la métalloprotéase ADAM17. p75^{NTR} sera alors clivé et le fragment soluble ICD va de nouveau activer JNK3 pour induire la mort cellulaire de ces neurones. Il s'agit donc ici d'une activation biphasique de la voie JNK par p75^{NTR} qui autorégule ainsi son propre clivage (Kenchappa *et al.*, 2010).

Enfin, de nombreux articles ont rapporté une translocation nucléaire du fragment p75^{NTR}-ICD, suggérant une activité transcriptionnelle du récepteur (Bronfman, 2007). C'est le cas dans les cellules HEK293 où l'interaction de TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) avec la presenilin-1 va induire l'ubiquitinylation et le clivage de p75^{NTR}. Le fragment soluble ICD sera alors transloqué dans le noyau et capable d'activer NF- κ B (Kanning *et al.*, 2003, Powell *et al.*, 2009). De même, dans les neurones sympathiques, le clivage de p75^{NTR} induit par le BDNF entraîne l'ubiquitinylation de NRIF (neurotrophin receptor interacting factor). Le complexe p75^{NTR}-ICD/NRIF est alors transloqué dans le noyau pour induire l'apoptose (Kenchappa *et al.*, 2006). Notons également que la translocation nucléaire de NRIF due à p75^{NTR} est

INTRODUCTION

dépendante de son ubiquitylation par TRAF6 (Geetha *et al.*, 2005). Il pourrait donc s'agir ici d'un nouveau mécanisme de signalisation de $p75^{NTR}$, régulé par ubiquitylation et translocation nucléaire. Cependant, malgré le nombre croissant d'articles suggérant une activité transcriptionnelle du récepteur, un seul gène cible a été découvert à ce jour. En effet, des immunoprécipitations de la chromatine (ChIP) ont montré que, en réponse au NGF, ce fragment soluble ICD interagissait avec le promoteur de la cycline E1 et réprimait la transcription de ce gène dans les cellules PC12 (Parkhurst *et al.*, 2010).

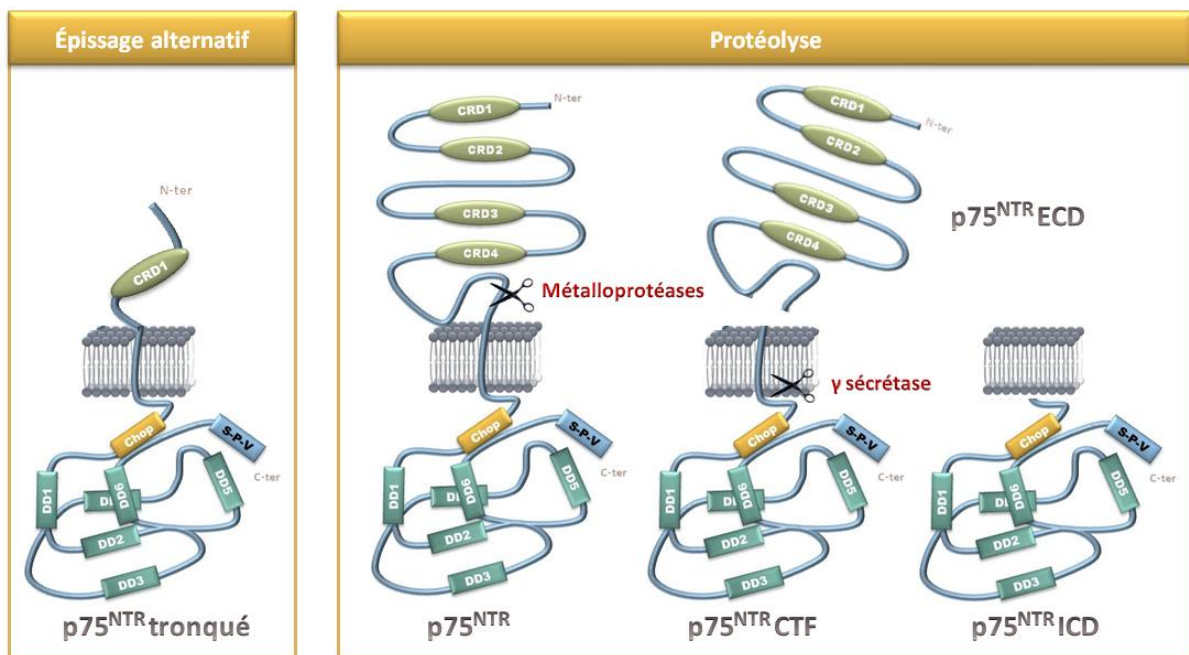


Figure 9. Les différentes formes de $p75^{NTR}$. La transcription du gène NGFR conduit à la forme complète du récepteur mais aussi à une forme tronquée résultant de l'épissage alternatif de l'exon III. Cette forme tronquée possède un domaine extracellulaire très court composé du seul CRD1 ne pouvant plus lier les neurotrophines. La forme complète de $p75^{NTR}$ peut subir une protéolyse partielle par une série de 2 clivages successifs. Le 1^{er} clivage par la métalloprotéase ADAM17/TACE libère d'une part un fragment soluble correspondant à la partie extracellulaire du récepteur ($p75^{NTR}$ -ECD) pouvant toujours fixer les neurotrophines. D'autre part, l'autre partie ancrée à la membrane ($p75^{NTR}$ -CTF) comprend les domaines transmembranaire et intracellulaire étant toujours capables de recruter les partenaires protéiques. Le 2nd clivage par le complexe γ -secrétase a lieu dans la partie transmembranaire du fragment CTF et libère dans le cytoplasme la partie intracellulaire ($p75^{NTR}$ -ICD) capable de se transloquer dans le noyau suggérant une activité transcriptionnelle.

B. NEUTROPHINES ET P75^{NTR}

1. Neurotrophines

Il y a maintenant plus de 50 ans, Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger et Stanley Cohen découvrirent le premier facteur de croissance en observant qu'une tumeur de souris transplantée dans un embryon de poulet était capable de sécréter une substance favorisant l'innervation de la tumeur. Ils appelèrent cette substance « nerve growth factor ». Ainsi, le NGF fut isolé en 1954 (Cohen *et al.*, 1954) et vaudra à Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen le prix Nobel en 1986. Ce n'est que 30 ans plus tard, en 1982, que le BDNF fut purifié à partir de tissu issu de cerveau de cochon (Barde *et al.*, 1982). Feront alors suite les découvertes de la neurotrophine 3 (NT3) par plusieurs équipes simultanément (Hohn *et al.*, 1990, Jones and Reichardt, 1990, Maisonpierre *et al.*, 1990, Rosenthal *et al.*, 1990) et de la neurotrophine 4/5 découverte consécutivement chez le xénope, le rat et l'homme (Berkemeier *et al.*, 1991, Hallbook *et al.*, 1991, Ip *et al.*, 1992). Chaque neurotrophine est issue de la maturation de la proneurotrophine correspondante. Bien que les proformes soient connues, elles étaient considérées comme biologiquement inactives et ce n'est qu'au début des années 2000 que les proneurotrophines furent « redécouvertes ». Ainsi, il a été montré que le proNGF et le proBDNF pouvaient être sécrétés et avoir une action pro-apoptotique sur les neurones *via* p75^{NTR} alors que les formes matures activaient les récepteurs Trk pour promouvoir leur survie (Lee *et al.*, 2001).

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

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

Table 3. Caractéristiques des neurotrophines. Neurotrophines humaines et leurs localisations chromosomiques. Taille du transcrit majoritaire avec son numéro d'accèsion NCBI. Taille en acides aminés de la préneurotrophine avec son numéro d'accèsion UniProt.

INTRODUCTION

La synthèse des neurotrophines se fait par le même processus de maturation pour tous les membres de la famille. D'abord sous la forme de préproneurotrophines immatures d'environ 30 kDa, elles sont dans un premier temps séparées de leur peptide signal au niveau du réticulum endoplasmique. Les proneurotrophines peuvent ensuite être clivées au niveau d'un site d'acides aminés dibasiques par des protéases intracellulaires telles que la furine ou des proconvertases (Bresnahan *et al.*, 1990, Seidah *et al.*, 1996) ou par des protéases extracellulaires après sécrétion comme la plasmine et certaines métalloprotéases (MMP-3 et MMP-7) pour donner des neurotrophines matures (Lee *et al.*, 2001, Pang *et al.*, 2004). Une fois maturées, les neurotrophines s'homodimérisent de façon non covalente où les deux monomères sont orientés en miroir (Bradshaw *et al.*, 1994). Chaque monomère est constitué, entre autre, de 6 cystéines conservées formant 3 ponts disulfures, permettant de rigidifier la structure (McDonald and Hendrickson, 1993). Les motifs structuraux des neurotrophines étant très conservés, elles peuvent également s'hétérodimériser *in vitro* (Arakawa *et al.*, 1994, Heymach and Shooter, 1995). Cependant, ces formes sont moins stables et réversent vers leurs homodimères respectifs (Radziejewski and Robinson, 1993). De plus, le rôle biologique de ces hétérodimères *in vivo* demeure incertain.

2. Liaison des neurotrophines au p75^{NTR}

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

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

Cependant, la cristallisation par He et Garcia a été réalisée sur un p75^{NTR} de rat dépourvu de glycosylation. Une modélisation plus récente basée sur un domaine extracellulaire du récepteur humain N-glycosylé met clairement en évidence une stœchiométrie de 2:2 (Aurikko *et al.*, 2005). De la même manière, la cristallisation du complexe NT3/p75^{NTR} (humain et N-glycosylé) montre également un rapport 2:2 (Gong *et al.*, 2008). Ces études suggèrent qu'en plus de CRD, la glycosylation joue un rôle prépondérant dans la liaison avec les ligands.

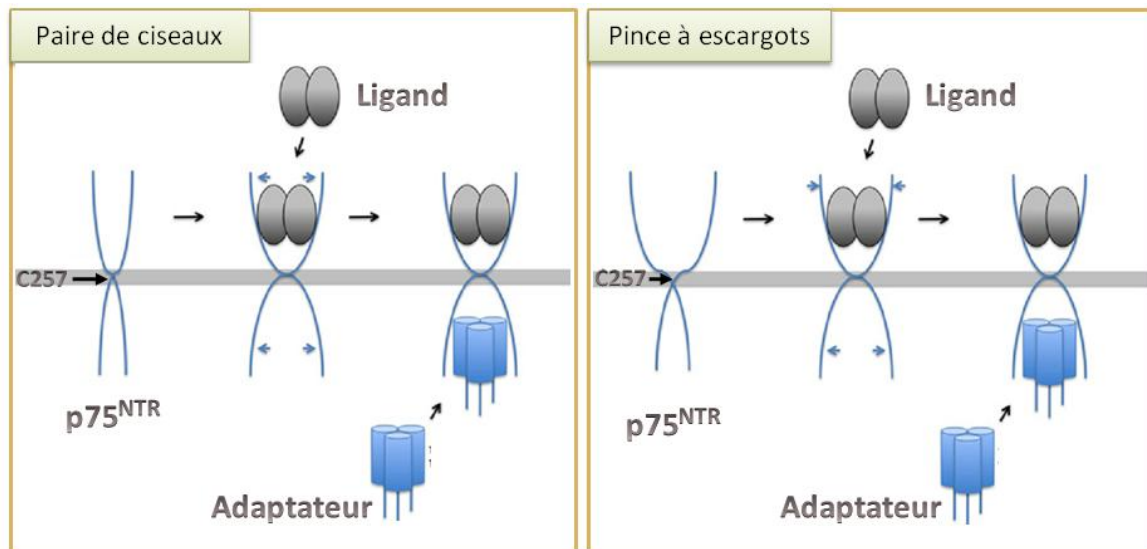


Figure 10. Association transmembranaire de p75^{NTR} et liaison des neurotrophines. p75^{NTR} s'homodimérise par l'établissement d'un pont disulfure entre les cystéines C257 de chaque monomère. A la façon d'une paire de ciseaux ou d'une pince à escargot, les domaines intracellulaires du récepteur s'écartent lors de la liaison des neurotrophines. Ce changement conformationnel permet le recrutement de protéines adaptatrices. Adapté de Barker, 2009.

Ces deux dernières études sont en accord avec des travaux récents (Vilar *et al.*, 2009) qui montrent qu'un pont disulfure est établi entre deux monomères de p75^{NTR} au niveau de la cystéine transmembranaire C257, et que cette cystéine est indispensable à l'activation du récepteur par les neurotrophines. En effet, sans la cystéine C257, p75^{NTR} n'est plus capable de recruter les partenaires protéiques NRIF et TRAF6, ni de cliver la procaspase 3 pour induire l'apoptose dans les cellules HEK293 en réponse au NGF. De la même manière, le BDNF n'est plus capable d'activer la voie JNK, ni d'induire l'apoptose des neurones SCG (superior cervical ganglion) lorsque C257 est mutée. De plus, des expériences de FRET ont montré que les 2 domaines intracellulaires du dimère de p75^{NTR} étaient proches dans des conditions basales alors qu'ils s'écartaient lors de la liaison du NGF. Les auteurs proposent 2 modèles pour expliquer ce phénomène dans lesquels le pont établi entre les 2 C257 servirait de pivot au dimère de p75^{NTR} qui s'ouvrirait à la façon soit d'une paire de ciseaux, soit d'une pince à escargot (« Snail-Tong ») (Figure 10). Ce changement de conformation suite à la

INTRODUCTION

liaison des neurotrophines permettrait le recrutement des adaptateurs trimériques que p75^{NTR} partage avec les autres membres de la superfamille des TNFR (Barker, 2009).

C. SIGNALISATION DE P75^{NTR} ET PROTEINES ASSOCIEES

Le récepteur p75^{NTR}, comme les autres membres de la superfamille des TNFR, ne possède pas d'activité enzymatique propre, et doit sa signalisation au recrutement de partenaires protéiques spécifiques, menant à l'activation de diverses voies de signalisation (Figure 11). La description de ces voies de signalisation s'est principalement faite dans des modèles neuronaux et dans les cellules PC12. Ces différentes voies aboutissent, en fonction du contexte cellulaire et physiologique, à la survie, la mort par apoptose ou la régulation de la neurogenèse et du cycle cellulaire.

1. Voie pro-apoptotique

Les deux domaines intracellulaires de p75^{NTR} que sont le domaine Chopper et le domaine de mort, sont impliqués dans l'induction de l'apoptose grâce au recrutement de partenaires protéiques spécifiques de signalisation (Coulson *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2001). Cependant, les mécanismes exacts conduisant à cette mort cellulaire demeurent encore incertains. Néanmoins, il semblerait que l'activation de la voie JNK soit un point commun à beaucoup de ces mécanismes. En effet, la liaison du NGF sur p75^{NTR} permet l'activation de la GTPase Rac qui va induire à son tour la voie JNK (Harrington *et al.*, 2002). La phosphorylation de JNK peut alors conduire à l'activation de facteurs de transcription comme c-jun ou p53, à l'activation des protéines pro-apoptotique à domaine BH3 (Bcl-2 homology) comme Bad (Bcl-2 antagonist of cell death) et Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) et à la translocation mitochondriale de Bax (Bcl-2 associated X protein). Par la suite, il y aura relargage du cytochrome C dans le cytosol, activant à son tour les caspases 9, 7, 6 et 3 (Becker *et al.*, 2004, Bhakar *et al.*, 2003, Nykjaer *et al.*, 2005). Enfin, par l'intermédiaire de Rac, p75^{NTR} peut également induire la génération de PIP2 (phosphatidylinositol(4,5)biphosphate) qui active le canal potassique GIRK (G-protein-coupled inwardly rectifying potassium) provoquant ainsi un efflux de potassium et la mort cellulaire (Coulson *et al.*, 2008). Bien que le lien direct entre Rac et p75^{NTR} ne soit pas encore connu, de nombreux adaptateurs impliqués dans l'activation de la voie JNK et l'apoptose induite par p75^{NTR} ont été décrits :

- **NRAGE** (neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog), aussi connue sous le nom de MADE-D1 ou Dlxin, interagit avec le domaine intracellulaire juxtamembranaire de p75^{NTR}. De part cette interaction, elle favorise la phosphorylation de JNK et c-jun, induisant ainsi la libération du cytochrome C dans le cytoplasme et l'activation des caspases 9, 3 et 7 (Salehi *et al.*, 2000, Salehi *et al.*, 2002). De plus, des souris knock-out (KO) pour NRAGE présentent une augmentation du nombre des neurones sympathiques dans le ganglion cervical supérieur, augmentation similaire à celle observée pour les souris KO pour p75^{NTR}. Les neurones dérivés des souris NRAGE^{-/-} sont résistants à l'apoptose induite par le BDNF et montrent une diminution de l'activation de la voie JNK (Bertrand *et al.*, 2008). Enfin, deux autres membres de la même famille, la Necdin et MAGE-G1, interagissent avec p75^{NTR} respectivement au niveau du domaine juxtamembranaire et du domaine de mort. Cette interaction va réduire leur interaction avec le facteur de transcription E2F1. Une fois libéré, ce facteur de transcription va inhiber l'arrêt du cycle cellulaire au profit de l'induction de l'apoptose dans les cellules de neuroblastomes (Kuwako *et al.*, 2004).

- **NRIF** (neurotrophin receptor interacting factor) est une protéine ubiquitaire capable d'interagir avec la partie intracellulaire de p75^{NTR} (Casademunt *et al.*, 1999). Elle intervient dans l'induction de l'apoptose par p75^{NTR} en activant la voie JNK et p53 (Linggi *et al.*, 2005). Son mécanisme d'action est bien décrit et fait intervenir un autre partenaire de p75^{NTR}, à savoir TRAF6 (TNF receptor associated factor 6). En effet, l'activation du récepteur par le NGF entraîne le recrutement de TRAF6 et de NRIF qui interagissent ensemble. TRAF6, de part sa fonction ubiquitine ligase, va polyubiquitinyler NRIF, étape nécessaire à sa translocation nucléaire. Quant à lui, NRIF favorise l'activation de la voie JNK par TRAF6 pour induire l'apoptose (Geetha *et al.*, 2005, Gentry *et al.*, 2004). Notons enfin que le proNGF, le proBDNF et le BDNF peuvent également activer ce mécanisme d'induction d'apoptose et que le clivage de p75^{NTR} semble être un prérequis à la translocation nucléaire de NRIF (Kenchappa *et al.*, 2006).

- **NADE** (p75^{NTR}-associated cell death executor) s'associe à p75^{NTR} *via* le domaine de mort. Cette interaction induite uniquement par le NGF va permettre l'activation des caspases 2 et 3 afin d'induire l'apoptose dans les cellules PC12, HEK293 et les oligodendrocytes (Mukai *et al.*, 2000). De plus, cette induction d'apoptose par le NGF requière aussi l'interaction de NADE avec la protéine 14-3-3ε (Kimura *et al.*, 2001). Un autre membre de la famille, Bex1 (brain-expressed X-linked 1, ou

INTRODUCTION

NADE4) se lie à p75^{NTR} pour inhiber l'activation du NF-κB par le NGF et la différenciation neuronale des PC12. Pour cela, Bex1 entre en compétition avec un autre adaptateur de p75^{NTR}, RIP2, connu lui pour son implication dans l'effet de survie du récepteur (Vilar *et al.*, 2006).

2. Voie anti-apoptotique

La principale caractéristique de la voie de survie induite par p75^{NTR} est l'activation du facteur de transcription NF-κB. Elle a pour la première fois été mise en évidence dans les cellules de Schwann où le NGF *via* p75^{NTR} induit la translocation des sous unités p65 et c-Rel dans le noyau, où elles peuvent le lier à l'ADN (Carter *et al.*, 1996). Suite à cette découverte, l'activation du NF-κB par p75^{NTR} a été montrée dans de nombreux types cellulaires et associée à la survie des cellules (Descamps *et al.*, 2001b, Foehr *et al.*, 2000, Gentry *et al.*, 2000, Hamanoue *et al.*, 1999). p75^{NTR} peut également activer directement la voie de signalisation PI3K/Akt, généralement associée aux récepteurs Trk, pour induire l'effet de survie. En effet, une étude a montré une phosphorylation accrue d'Akt et de la sous-unité p85 de la PI3K suite à l'expression de p75^{NTR} (Roux *et al.*, 2001). Bien que le lien ne soit pas fait directement avec NF-κB, une des cibles connues d'Akt est la protéine IKK1 (IκB kinase 1). Une fois activée, cette kinase phosphoryle IκB (inhibitor of kappa B), libérant NF-κB et permettant sa translocation nucléaire, mécanisme de l'induction de la survie cellulaire de p75^{NTR}. Pour en arriver à cette activation de la voie de survie, le récepteur recrute un certain nombre de partenaires protéiques :

- Les **TRAFs** (TNF receptor-associated factor) sont des protéines qui s'associent à un grand nombre de récepteurs de la superfamille des TNFR et qui sont connues pour activer les voies JNK et NF-κB. Il a été montré que toutes les TRAFs (de 1 à 6) étaient co-immunoprécipitées avec p75^{NTR} (Ye *et al.*, 1999). Cependant, seules TRAF2, TRAF4 et TRAF6 semblent pouvoir moduler l'activation du NF-κB. TRAF2 se lie sur le domaine de mort de p75^{NTR} et active légèrement le NF-κB ce qui est curieusement associé à une induction de la mort cellulaire. TRAF4 et TRAF6 semblent eux se lier à la partie juxtamembranaire du domaine intracellulaire du récepteur et entrent en compétition pour l'activation de la voie NF-κB, TRAF4 l'inhibant et TRAF6 l'activant fortement (Khursigara *et al.*, 1999, Ye *et al.*, 1999). Seul le mécanisme d'action de TRAF6 a été précisément décrit. En effet, pour activer la survie *via* la voie NF-κB, TRAF6 ubiquitinye p75^{NTR} et recrute le complexe γ-sécrétase afin de générer le fragment p75^{NTR}-ICD capable d'activer NF-κB (Powell *et al.*, 2009). Par ailleurs, TRAF6 favorise son

ubiquitylation par le recrutement de la protéine p62 (PKC-interacting protein p62) qui elle-même est associée à la PKC ι (protein kinase C iota). Ce complexe multiprotéique p75^{NTR}/TRAF6/p62/PKC ι va également interagir avec les adaptateurs MyD88 (myeloid differentiation factor 88) et IRAK (IL1 receptor-associated kinase) pour aboutir à la phosphorylation d'IKK, qui à son tour phosphoryle I κ B, libérant et induisant ainsi la survie cellulaire (Wooten *et al.*, 2005). Enfin, notons que MUL (mulibrey nanism), une protéine contenant un domaine de liaison aux TRAFs, interagit avec p75^{NTR} et inhibe l'activation du NF- κ B induite par TRAF2 et TRAF6 (Zapata *et al.*, 2001). Notons également que TRAF2 a été montrée par notre laboratoire comme associée à p75^{NTR} mais il semblerait que cette interaction n'ait pas d'effet biologique (El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003).

- **RIP2** (receptor interacting protein 2) est une sérine/thréonine kinase qui possède un domaine CARD (caspase recruitment domain) lui permettant de fixer le domaine de mort de p75^{NTR}. Cette interaction inhibe l'apoptose normalement induite par le NGF dans les cellules de Schwann et active la voie NF- κ B (Khursigara *et al.*, 2001). Enfin, comme expliqué précédemment, Bex1 peut entrer en compétition avec RIP2 pour se fixer à p75^{NTR} et inhiber son effet de survie (Vilar *et al.*, 2006). Notons également que la protéine Bex2 a un rôle anti-apoptotique et anti-prolifératif dans les cellules cancéreuses mammaires puisqu'il est nécessaire à l'activation du NF- κ B ainsi qu'à l'effet anti-prolifératif du Tamoxifen (Naderi *et al.*, 2007).
- **FAP1** (Fas-associated protein 1) est une protéine tyrosine phosphatase (PTPase), contenant 6 domaines PDZ, connue pour interagir avec le récepteur Fas et inhiber sa signalisation pro-apoptotique (Sato *et al.*, 1995). FAP1 se lie à p75^{NTR} au niveau du motif SPV du récepteur. Cette fixation permet d'augmenter légèrement l'activation du NF- κ B dans les cellules HEK293. De plus, des cellules mutantes pour ce domaine SPV, où p75^{NTR} ne peut donc plus fixer FAP1, sont sensibilisées à l'apoptose induite par le Tamoxifen (Irie *et al.*, 1999).
- **TRADD** (TNF receptor-associated death domain protein) est un adaptateur connu pour interagir avec les récepteurs de la famille du TNF *via* son domaine de mort. Cependant, comme la structure du domaine de mort de p75^{NTR} diffère de celle des autres membres de la famille, il est considéré que TRADD ne peut pas interagir avec p75^{NTR} (Wang *et al.*, 2001). Toutefois, notre laboratoire a montré

INTRODUCTION

que dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, TRADD était recrutée par p75^{NTR} suite à un traitement par les neurotrophines. Cette interaction permet par la suite l'activation de la voie NF-κB ainsi que la survie cellulaire (El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003).

3. Autres voies

a. Synthèse des céramides

Parallèlement aux voies contrôlant la survie et la mort neuronales précédemment décrites, la transduction du signal par p75^{NTR} peut également passer par la voie dite de « synthèse des céramides ». En effet, la liaison de p75^{NTR} à ses ligands entraîne l'activation de sphingomyélinases hydrolysant les sphingomyélines et conduisant à la libération de céramides (Dobrowsky *et al.*, 1994). Ainsi, la production de céramides, médiée par des traitements au NGF, est corrélée à l'activation de la protéine JNK et à l'apoptose des cellules nerveuses (Casaccia-Bonofil *et al.*, 1996). Une étude 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 et induisent la mort cellulaire alors que de faibles concentrations de céramides initient la survie cellulaire par l'intermédiaire du NF-κB (Wang *et al.*, 1999). Il semblerait donc qu'en fonction de leur niveau intracellulaire, les céramides agissent comme second messenger afin d'induire des effets apoptotiques ou trophiques (Blochl and Blochl, 2007).

b. Elongation des neurites et Rho A

En plus des voies menant à l'apoptose ou la survie cellulaire, p75^{NTR} peut également être engagé dans des voies annexes dépendantes de la GTPase Rho A (Ras homolog gene family, member A). Bloch *et al.* ont décrit une phosphorylation de p75^{NTR} sur ses tyrosines Y337 et Y366 suite à sa liaison au NGF ; ce qui mène à l'inactivation de Rho A et se traduit fonctionnellement par la croissance des neurites (Blochl *et al.*, 2004). Il a été montré par double hybride que p75^{NTR} s'associe avec la PKA (proteïn kinase A) et qu'un traitement par les neurotrophines induit une phosphorylation de p75^{NTR} sur sa sérine S304, ce qui inactive Rho A (Higuchi *et al.*, 2003). Par ailleurs, il a été montré que l'activation de p75^{NTR} par la PKA est finement régulée puisque le récepteur recrute la protéine PDE4 (phosphodiesterase 4) qui dégrade l'AMPc conduisant à l'inactivation de la PKA (Sachs *et al.*, 2007). Nous pouvons noter que p75^{NTR} fut identifié comme un co-récepteur avec NogoR (Nogo receptor)

aux ligands MBGI (derived myelin-based growth inhibitors) : Nogo, MAG (myelin-associated glycoprotein) et OMgp (oligodendrocyte myelin glycoprotein). Ainsi, il avait été montré que p75^{NTR} et NogoR sont co-immunoprécipités et que la dissociation de ces 2 récepteurs inhibe l'action des MBGI (Wang *et al.*, 2002). Or, les MBGI activent Rho A et inhibent la croissance axonale (Yamashita *et al.*, 2002), ce qui est contraire à l'action des ligands de p75^{NTR} (Yamashita *et al.*, 1999). Plus récemment, il est apparu que les MBGI ne sont pas des ligands de p75^{NTR}, mais plutôt que leur fixation à NogoR entraîne l'interaction de ce récepteur avec p75^{NTR} ; ce complexe recruterait Rho A GDI (Rho-GTP dissociation inhibitor) permettant à Rho A d'être activée et se traduisant par une inhibition de l'élongation de neurites (Yamashita and Tohyama, 2003). Plus récemment, partant du constat que NogoR et p75^{NTR} sont incapables d'activer Rho A lorsqu'ils sont coexprimés dans des modèles non neuronaux, Mi et ses collaborateurs ont mis en évidence l'intervention d'une 3^{ème} protéine dans ce complexe, Lingo (LRR and Ig domain-containing Nogo receptor interacting protein), en plus de NogoR et de p75^{NTR} (Mi *et al.*, 2004). De plus, il a été démontré que Troy/Taj, un récepteur orphelin membre de la superfamille des TNFR, peut remplacer p75^{NTR} (Park *et al.*, 2005). Enfin, p75^{NTR} peut aussi s'associer aux Ephrines A pour réguler la croissance des neurites. On notera que les Ephrines sont connues pour participer au guidage axonal et sont, comme NogoR, des molécules ancrées à la membrane par GPI (glycosylphosphatidylinositol) ne pouvant pas conduire seules une signalisation intracellulaire ; la question de savoir si les Ephrines peuvent remplacer NogoR reste en suspens (Lim *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces études montre le jeu complexe des différents acteurs moléculaires modulant l'activation de Rho A, mettant en évidence la nécessité de conduire de plus amples travaux pour mieux comprendre le rôle de p75^{NTR} dans la signalisation de Rho A (Bandtlow and Dechant, 2004, Bronfman and Fainzilber, 2004, Schecterson and Bothwell, 2008).

c. Voie menant à l'arrêt du cycle cellulaire

Le récepteur p75^{NTR} est également connu pour moduler la progression dans le cycle cellulaire. Dans les cellules nerveuses, p75^{NTR} recrute différents adaptateurs impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire :

- **Sc1** est, comme NRIF, une protéine à doigt de zinc répresseur transcriptionnel (Chittka and Chao, 1999). Recrutée au niveau du domaine juxtamembranaire de p75^{NTR} activé, puis transloquée dans le noyau (Kendall *et al.*, 2003), Sc1 provoque un arrêt du cycle cellulaire par la répression transcriptionnelle du gène de la cycline E (Chittka *et al.*, 2004).

- **Sall2** est un facteur de transcription récemment décrit pour interagir directement avec p75^{NTR}. Il est impliqué dans la progression du cycle cellulaire et dans la croissance des

INTRODUCTION

neurites. Pincheira et ses collaborateurs observent que sous l'action du NGF mais pas des autres neurotrophines, Sall2 se dissocie de p75^{NTR} et est transloqué au noyau. Ils démontrent aussi que la sous-expression de Sall2 diminue l'expression et l'activité de p21^{waf1/cip1} et la capacité du NGF à induire la neuritogenèse et à bloquer le cycle cellulaire alors que sa surexpression a l'effet contraire (Pincheira *et al.*, 2009).

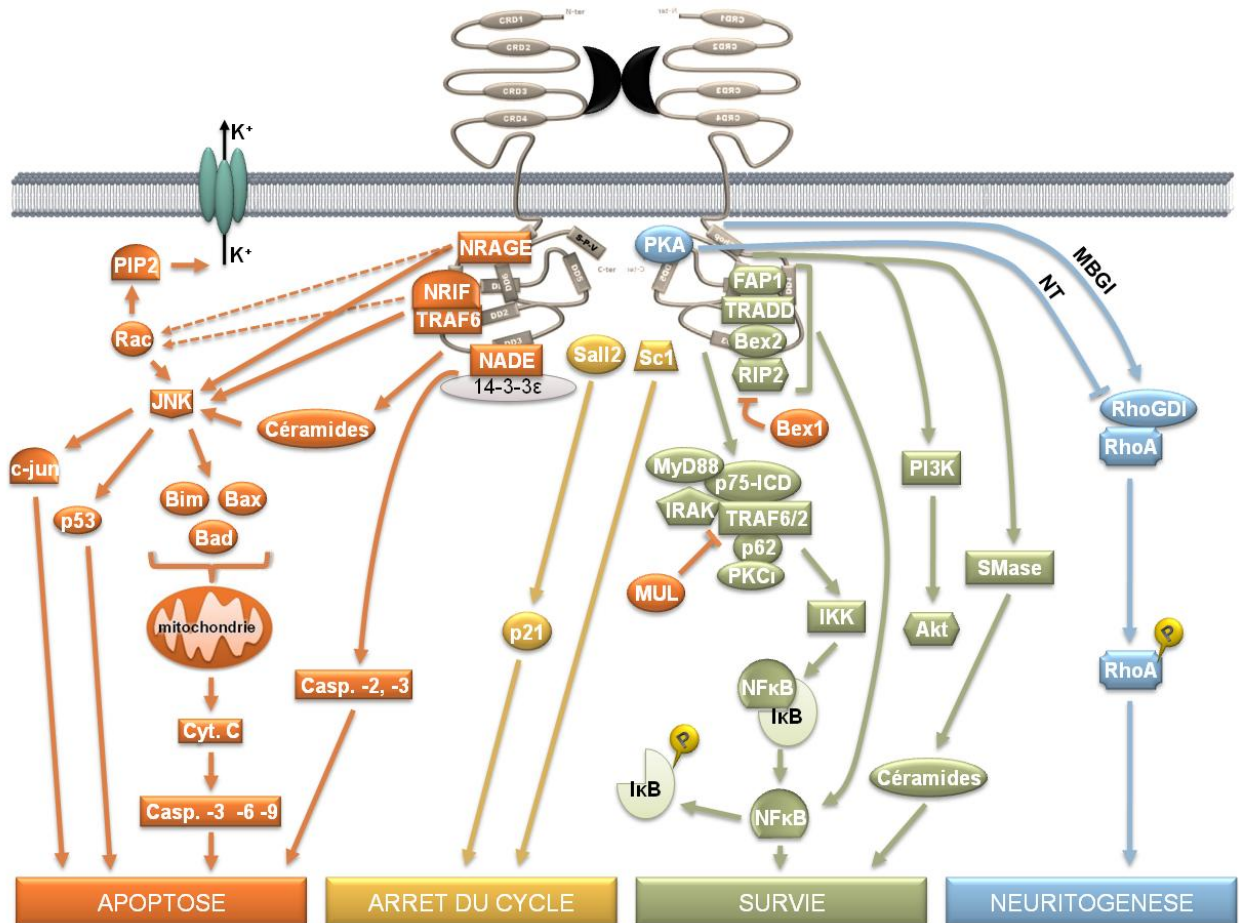


Figure 11. Représentation schématique des voies de signalisation de p75^{NTR}. La fixation des ligands à p75^{NTR} entraîne le recrutement de protéines adaptatrices au niveau des domaines intracellulaires du récepteur. Celles-ci initient des voies de signalisation d'apoptose (orange), de survie (vert), un arrêt du cycle cellulaire (jaune) ou la neuritogenèse (bleu). Bad :Bcl-2 antagonist of cell death ; Bax :Bcl-2 associated X protein ; Bex1/2 : Brain-expressed X-linked 1/2 ; Bim :Bcl-2 interacting mediator of cell death ; Casp :caspases ; Cyt C : cytochrome C ; FAP1 : Fas-associated protein 1 ; GIRK : G-protein-coupled inwardly rectifying potassium (K) ; IκB :inhibitor of kappa B ; IKK : IκB kinase ; IRAK : interleukin 1 receptor-associated kinase ; JNK : c-Jun N-terminal kinase ; MBG1 : CNS-derived myelin-based growth inhibitor ; MUL : mulibrey nanism ; MyD88 : myeloid differentiation factor 88 ; NADE : p75^{NTR}-associated cell death executor ; NFκB : nuclear factor kappa B ; NRAGE : neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog ; NRIF : neurotrophin receptor interacting factor ; NT : neurotrophin ; PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase ; PIP2 : phosphatidylinositol(4,5)biphosphate ; PKA : protein kinase A ; PKCι : protein kinase C iota ; Rac : Ras-related C3 botulinum toxin ; RIP2 : receptor interacting protein 2 ; RhoGDI : Rho-GDP dissociation inhibitor ; Sall2 : Sal-like 2 ; Sc-1 : Schwann cell factor 1 ; SMase : sphingomyelinase ; TRAF : TNF receptor-associated factor ; TRADD : TNF receptor-associated death domain protein.

D. P75^{NTR} ET CO-RECEPTEURS

Nous avons pu constater que p75^{NTR} est impliqué dans de nombreux effets biologiques tels que l'apoptose, la survie, l'inhibition de la croissance des neurites ou encore l'arrêt du cycle cellulaire. Toutefois, outre le contexte cellulaire et le recrutement de partenaires protéiques spécifiques, ces multiples fonctions biologiques s'expliquent aussi par la capacité de p75^{NTR} à coopérer avec d'autres récepteurs membranaires pour former des complexes multimériques. Ainsi, la famille des Trk (tropomyosin-related kinase), la sortiline et les récepteurs Nogo et LINGO-1 interagissent avec p75^{NTR}. La formation d'un complexe p75^{NTR}/Trk permet d'améliorer l'affinité et la sélectivité de chaque neurotrophine pour son récepteur Trk (Kd=10-11M) afin de favoriser la survie cellulaire. Le complexe p75^{NTR}/sortiline va, quant à lui, induire la mort cellulaire suite à la fixation des proneurotrophines. Enfin, p75^{NTR} peut former un complexe tripartite avec Nogo et LINGO-1 conduisant à la fixation des ligands de la famille des MBGI (CNS-derived myelin-based growth inhibitor) et à l'inhibition de la croissance des neurites.

1. Récepteurs Trk

La première protéine Trk (tropomyosin-related kinase) a été découverte dans les années 80 et doit son nom à un oncogène impliqué dans le cancer du colon. Cette protéine contenait alors les 7 premiers exons de la tropomyosine fusionnés aux domaines transmembranaire et intracellulaire d'une kinase alors encore inconnue (Martin-Zanca *et al.*, 1986). Peu de temps après cette découverte, une 2^{ème} kinase hautement similaire à TrkA fut purifiée et nommée TrkB (Klein *et al.*, 1989). Enfin, TrkC fut identifié en 1991, en même temps que les ligands furent attribués à chaque récepteur (Figure 12) (Klein *et al.*, 1991a, Klein *et al.*, 1991b, Lamballe *et al.*, 1991).

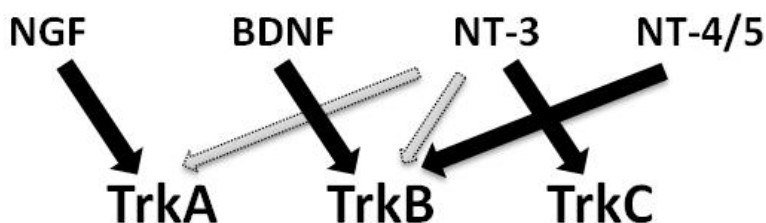


Figure 12. Liaison des neurotrophines aux récepteurs Trk. *TrkA est le récepteur du NGF, Trk B du BDNF et de la NT4/5 et Trkc est le récepteur de la NT3 (flèches noires). Notons que la NT3 peut se fixer sur TrkA et TrkB, cependant avec une affinité plus faible.*

INTRODUCTION

a. Aspect génétique

Le clonage des gènes humains de TrkA (*NTRK1*) (Martin-Zanca *et al.*, 1986), de TrkB (*NTRK2*) (Nakagawara *et al.*, 1995) et de TrkC (*NTRK3*) (McGregor *et al.*, 1994) a montré une forte homologie de séquence. Les domaines intracellulaires kinasiques de TrkA et TrkB sont conservés à 88% et leurs domaines de liaison au ligand à 57%. Les caractéristiques principales de ces gènes sont reportées dans la table 4.

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

Table 4. Caractéristiques des récepteurs Trk humains. Récepteurs Trk humains et leurs localisations chromosomiques. Taille du transcrit majoritaire avec son numéro d'accèsion NCBI. Taille en acides aminés de la protéine avec son numéro d'accèsion UniProt.

b. Structures protéiques

Les récepteurs Trk ont tous une structure commune : ce sont des protéines membranaires de type I, elles sont glycosylées et possèdent toutes environ 800 acides aminés. Leurs domaines extracellulaires contiennent environ 400 acides aminés et sont constitués de 3 régions riches en leucine entourées de 2 régions riches en cystéine. La partie juxtamembranaire extracellulaire est constituée de 2 domaines de type immunoglobuline C2 (Ig-C2), impliqués dans la liaison et la spécificité des neurotrophines (Perez *et al.*, 1995, Urfer *et al.*, 1995). En plus de leur rôle dans la liaison du ligand, ces domaines Ig-C2 ont une fonction structurelle en stabilisant les formes monomériques des récepteurs Trk, inhibant ainsi leurs dimérisations spontanées et par conséquent, leurs activations en l'absence de neurotrophine (Arevalo *et al.*, 2000). La partie extracellulaire des récepteurs est également glycosylée afin d'adresser les récepteurs à la membrane, mais aussi, de participer à la prévention de leur activation en absence de ligand (Watson *et al.*, 1999)

Le domaine intracellulaire est très conservé et présente de nombreuses tyrosines phosphorylables. Dans TrkA (mais également dans les autres Trk à des positions légèrement différentes), on retrouve 3 tyrosines (Y670/Y674/Y675) au sein du domaine tyrosine kinase responsable de la transphosphorylation des monomères du récepteur dimérique. Ce domaine est encadré par la tyrosine Y490 en N-terminal, site de liaison des protéines Shc (Src homology-2 containing protein) et FRS-2 (FGF receptor substrate 2), et

par la tyrosine Y785 en C-termina, site du recrutement de la PLC γ (phospholipase C γ) Figure 13).

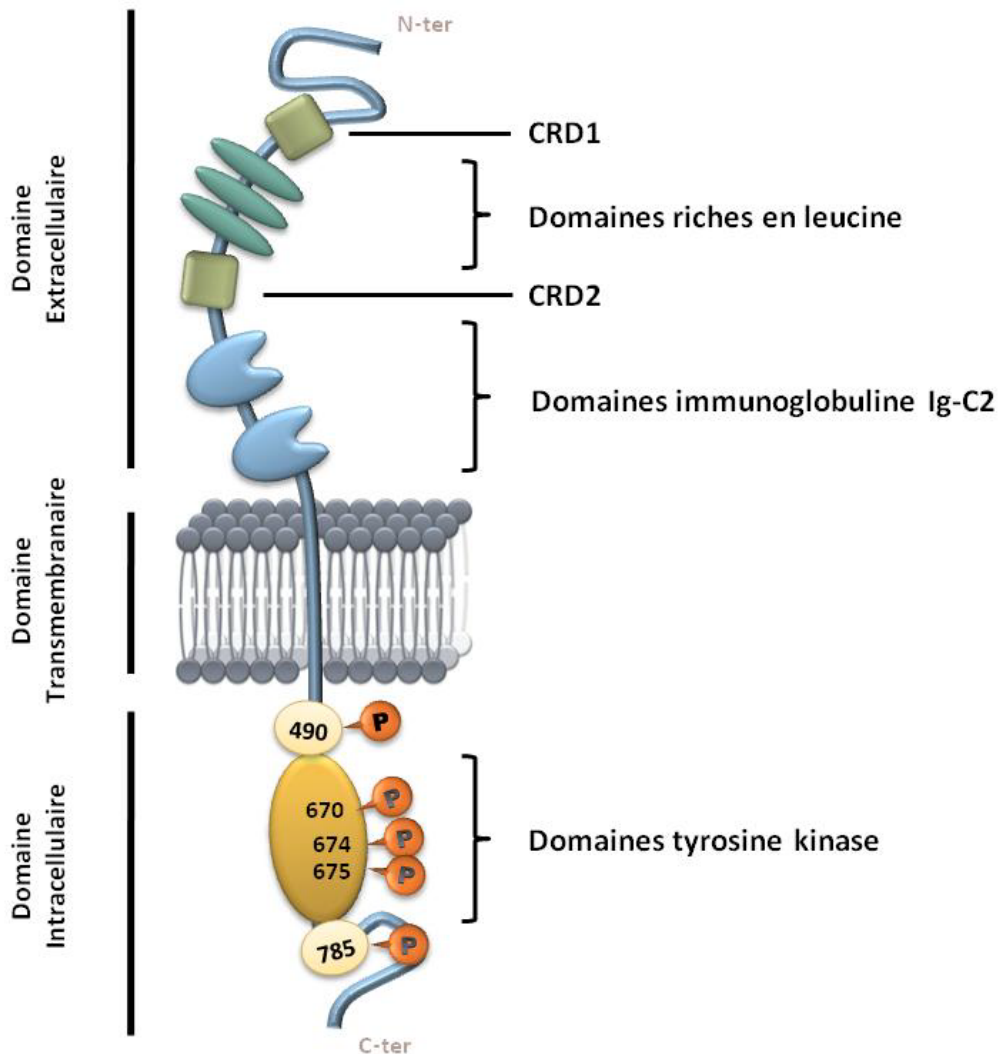


Figure 13. Représentation schématique des récepteurs Trk. Les récepteurs Trk se composent d'un domaine extracellulaire constitué de régions riches en leucine encadrées par 2 régions riches en cystéine (CRD), suivi par 2 domaines de type immunoglobuline de type C2 (Ig-C2). Le domaine intracellulaire est composé d'un large domaine tyrosine kinase responsable de la transphosphorylation du récepteur et donc de son activation. D'autres phosphorylations autour de ce domaine sont possibles et sont les sites de recrutement de certains partenaires spécifiques comme Shc, FRS-2 ou PLC γ . Les tyrosines mentionnées ici correspondent aux résidus du récepteur TrkA.

c. Isoformes

i. Isoformes de TrkA

Il existe 3 isoformes de TrkA nommées TrkA-I, TrkA-II et TrkA-III. Les formes I et II ne diffèrent que de 18 pb suite à l'épissage alternatif de l'exon 11. En effet, TrkA-II contient l'exon 11 et présente un insert de 6 acides aminés dans son domaine extracellulaire, mais sa

INTRODUCTION

présence n'affecte ni l'affinité du récepteur pour le NGF, ni la transduction du signal (Barker *et al.*, 1993). En revanche, cet insert participerait à la sélectivité de TrkA pour la NT-3 en bloquant sa fixation sur le récepteur (Clary and Reichardt, 1994). Notons que ces 2 isoformes présentent un profil d'expression différent : TrkA-I est préférentiellement exprimée dans les tissus non-neuronaux alors que TrkA-II est retrouvée dans les tissus neuronaux et en faible quantité dans le rein et le poumon (Barker *et al.*, 1993). Enfin, la dernière isoforme, TrkA-III, a été identifiée plus récemment dans les neuroblastomes et le thymus, et résulte de l'épissage alternatif des exons 8, 9 et 11 (Tacconelli *et al.*, 2004, Tacconelli *et al.*, 2007). Cette isoforme est dépourvue du 1^{er} domaine Ig-C2 mais également d'une partie normalement N-glycosylée. Elle est capable d'induire une signalisation indépendamment de la fixation du NGF dans les cellules de neuroblastomes pour promouvoir leurs potentiels tumorigènes Figure 14).

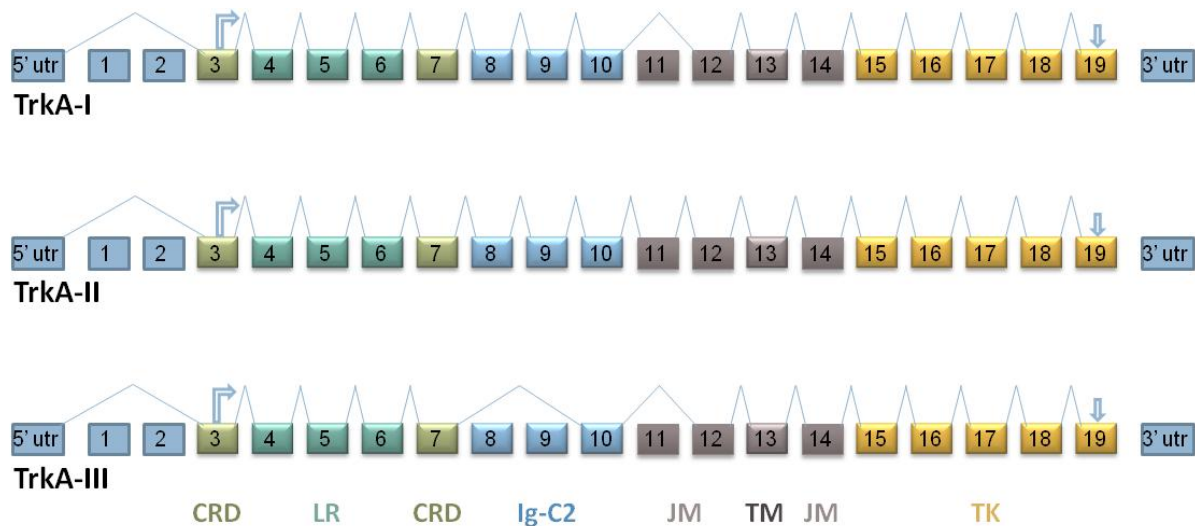


Figure 14. Les isoformes de TrkA. Les carrés représentent les 19 exons du gène de TrkA encadrés des rectangles représentant les régions 5' et 3' utr. TrkA-II est l'isoforme la plus longue, TrkA-I est épissée de l'exon 11 et TrkA-III est dépourvue des exons 8, 9 et 11. Les différentes couleurs représentent schématiquement les parties de la protéine codées par les exons. La flèche partant sur la droite désigne le point d'initiation de la traduction alors que la flèche descendante marque son arrêt. CRD : cystein rich domain ; LR : leucin rich motif ; Ig-C2 : domaines immunoglobuline-like ; JM : partie juxtamembranaire ; TM : partie transmembranaire ; TK : domaine tyrosine kinase.

ii. Isoformes de TrkB

La littérature décrit plus de 100 isoformes possible d'ARNm de TrkB pour seulement 10 protéines codées, la plupart très faiblement exprimées, suggérant un rôle très spécialisé dans une sous-population de cellules ou lors de certaines étapes du développement. Les 3 isoformes majoritaires sont décrites dans la figure 15 (Stoilov *et al.*, 2002). TrkB-FL (full length) est épissé des exons 16 et 19 mais conserve le domaine kinasique intact, gardant ainsi son activité catalytique et sa capacité à induire différents effets biologiques tels que la

survie, l'angiogenèse et la différenciation. TrkB-T1 est l'isoforme la plus courte avec le codon stop situé dans l'exon 16 et ne contient que 11 acides aminés dans sa partie intracellulaire. Son rôle précis reste encore incertain mais il semblerait qu'il puisse agir comme un dominant négatif de TrkB-FL en séquestrant le BDNF, en formant des hétérodimères inactifs ou en régulant son expression à la surface des cellules (Brodeur *et al.*, 2009, Haapasalo *et al.*, 2002). Il a également été montré dans les astrocytes que cette isoforme pouvait être responsable du relargage du stock de calcium intracellulaire (Rose *et al.*, 2003), ou encore interagir avec la protéine RhoGDI1 (Rho GDP dissociation inhibitor 1) pour réguler la morphologie cellulaire (Ohira *et al.*, 2005). Enfin, notre laboratoire a montré que TrkB-T1 jouait un rôle dans la survie induite par le BDNF et la NT4/5 dans les cellules cancéreuses mammaires (Vanhecke *et al.*, 2011). La dernière isoforme, TrkB-Shc, est dépourvue de l'exon 16 et se termine dans l'exon 19, juste après le site d'interaction avec la protéine Shc. Contrairement aux autres isoformes, celle-ci est exprimée exclusivement dans le cerveau. Elle est capable d'interagir avec TrkB-FL, mais celui-ci ne peut la phosphoryler, suggérant un rôle de dominant négatif (Stoilov *et al.*, 2002).

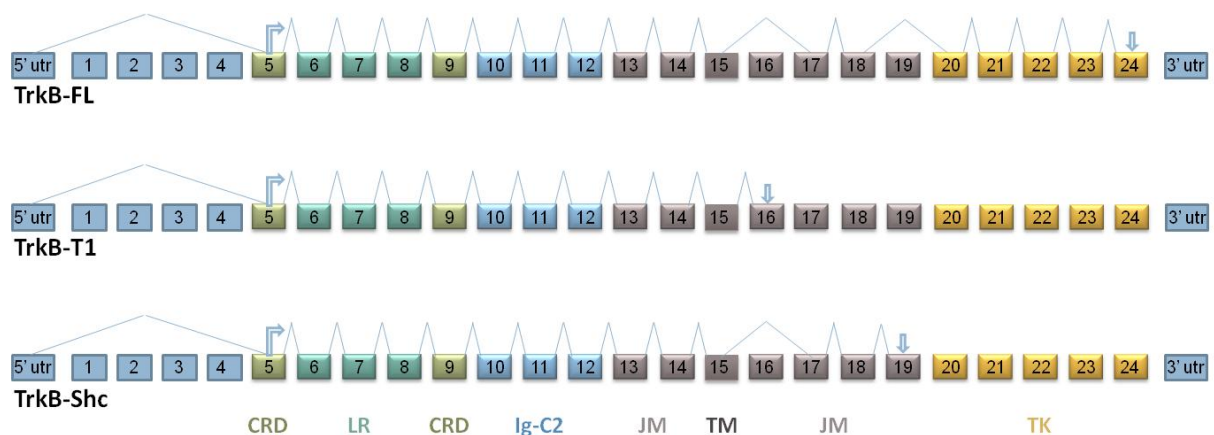


Figure 15. Les isoformes majoritaires de TrkB. Les carrés représentent les 24 exons du gène de *TrkB* encadrés des rectangles représentant les régions 5' et 3' utr. *TrkB-FL* (full length) est l'isoforme la plus longue, elle est épissée des exons 16 et 19 et se termine dans l'exon 24. *TrkB-T1* est l'isoforme la plus courte avec son codon stop dans l'exon 16. Enfin, *TrkB-Shc* est dépourvu de l'exon 16 et se termine dans l'exon 19 juste après le site d'interaction avec la protéine *Shc*. Les différentes couleurs représentent schématiquement les parties de la protéine codées par les exons. La flèche partant sur la droite désigne le point d'initiation de la traduction alors que la flèche descendante marque son arrêt. CRD : cystein rich domain ; LR : leucin rich motif ; Ig-C2 : domaines immunoglobuline-like ; JM : partie juxtamembranaire ; TM : partie transmembranaire ; TK : domaine tyrosine kinase.

Notons enfin que d'autres isoformes de *TrkB* ont été mis en évidence à la suite de la découverte d'un nouveau site START de transcription dans l'exon 9. De ce fait, ces autres formes seraient dépourvues de la partie N-terminale mais conserveraient les spécificités des formes majoritaires, et sont appelées *TrkB-N-FL*, *TrkB-N-T1* et *TrkB-N-Shc*. Ces 3 isoformes sont exprimées dans le système nerveux central et plus précisément dans le cervelet. Elles

INTRODUCTION

seraient principalement cytoplasmiques puisqu'aucun peptide signal n'a pu être identifié (Luberg *et al.*, 2010)

iii. Isoformes de TrkC

A la suite de divers épissages alternatifs, le transcrit de TrkC humain aboutit à 4 isoformes (Figure 16).



Figure 16. Les isoformes de TrkC. Les carrés représentent les 21 exons du gène TrkC encadrés des rectangles représentant les régions 5' et 3' utr. L'isoforme C est majoritaire, les isoformes A et D présentent un insert de 14 acides aminés codé par l'exon 20 dans leur domaine kinasique empêchant le recrutement de certains partenaires protéiques. TrkC-D est également épissé de l'exon 10, le rendant moins affiné pour la NT3. Enfin, TrkC-B est l'isoforme la plus courte, tronqué de tout le domaine tyrosine kinase. Les différentes couleurs représentent schématiquement les parties de la protéine codées par les exons. La flèche partant sur la droite désigne le point d'initiation de la traduction alors que la flèche descendante marque son arrêt. CRD : cystein rich domain ; LR : leucin rich motif ; Ig-C2 : domaines immunoglobuline-like ; JM : partie juxtamembranaire ; TM : partie transmembranaire ; TK : domaine tyrosine kinase.

En comparaison à l'isoforme majoritaire (TrkC-C), TrkC-A présente une insertion de 14 acides aminés située dans le domaine tyrosine kinase, inhibant ainsi le recrutement des protéines Shc et PLC γ (Guiton *et al.*, 1995, McGregor *et al.*, 1994). TrkC-B possède un codon STOP juste en amont du domaine tyrosine kinase qui le rend dépourvu d'activité catalytique (Shelton *et al.*, 1995). Des souris surexprimant cette isoforme tronquée présentent une perte de neurones sensoriels et des défauts cardiaques similaires à ceux observés chez des souris invalidées pour la neurotrophine NT3, suggérant donc un effet négatif de TrkC-B (Palko *et al.*, 1999). Cet effet inhibiteur est d'ailleurs retrouvé dans les neuroblastomes où le récepteur TrkC « normal » est exprimé dans les cellules cancéreuses

encore différenciées alors que TrkC-B est corrélé avec des cancers plus agressifs (Laneve *et al.*, 2007). Enfin, l'isoforme TrkC-D possède le même insert de 14 acides aminés que TrkC-A mais perd 9 acides aminés dans le domaine extracellulaire juxtamembranaire.

d. p75^{NTR} et Trk

Bien que les Trk aient longtemps été considérés comme les récepteurs de haute affinité des neurotrophines, on sait aujourd'hui que leur affinité pour ces ligands est similaire à p75^{NTR} (Kd=10⁻⁹M) lorsqu'ils sont exprimés séparément. En revanche, en cas de co-expression, l'affinité est beaucoup plus forte avec une constante de dissociation de l'ordre de 10⁻¹¹M (Hempstead *et al.*, 1991). La co-expression de p75^{NTR} et de TrkA permet d'augmenter 25 fois l'association du NGF (Mahadeo *et al.*, 1994). Plusieurs études ont montré qu'inhiber la liaison du NGF sur p75^{NTR} permettait d'inhiber l'activation de TrkA (Barker and Shooter, 1994, Lachance *et al.*, 1997). De plus, une forme mutante du NGF se fixant uniquement sur TrkA et non sur p75^{NTR} est moins efficace que le NGF non muté pour activer TrkA dans les cellules exprimant les 2 récepteurs (Ryden *et al.*, 1997). C'est pourquoi aujourd'hui certains considèrent que la perte neuronale observée chez les souris KO pour p75^{NTR} ne serait que le reflet d'une diminution d'activité des Trk.

D'autre part, la plus forte activation de TrkA en présence de p75^{NTR} permet également d'en améliorer la spécificité. En effet, un anticorps bloquant anti-p75^{NTR} augmente l'activation de TrkA en réponse à la NT3, suggérant que p75^{NTR} diminue l'affinité de TrkA pour cette neurotrophine (Clary and Reichardt, 1994). De la même manière TrkB, qui peut fixer le BDNF, la NT4/5 et la NT3 en absence de p75^{NTR}, voit son affinité pour le BDNF augmentée en présence de p75^{NTR} (Bibel *et al.*, 1999). L'ensemble de ces données suggèrent une étroite collaboration entre p75^{NTR} et les récepteurs Trk, ce qui a mené à des études sur une éventuelle interaction physique. Certains ont montré par co-immunoprécipitation que p75^{NTR} se liait physiquement avec TrkA, TrkB et TrkC (Bibel *et al.*, 1999, Gargano *et al.*, 1997, Lad *et al.*, 2003). De plus, il semblerait que les domaines intracellulaires et transmembranaires entraînent des changements conformationnels, permettant la formation d'un site de haute affinité (Esposito *et al.*, 2001). D'autres proposent un modèle où p75^{NTR} ne servirait qu'à présenter le ligand, le dimère de NGF, à TrkA (Barker, 2007, Wehrman *et al.*, 2007). En effet, même si les études structurales théoriques font état d'un potentiel complexe tripartite p75^{NTR}/NGF/TrkA (1 :2 :1), l'interaction directe entre les récepteurs n'a toujours pas pu être démontrée.

C'est pourquoi certaines études ont rapporté l'implication de partenaires protéiques pouvant interagir à la fois avec p75^{NTR} et avec TrkA. Parmi elles, la cavéoline est une protéine clef

INTRODUCTION

dans la formation des *caveolae*, permettant la concentration des protéines de signalisation au niveau de ces microdomaines invaginés, servant de plateforme de signalisation. Ainsi, p75^{NTR} est localisé dans ces microdomaines et interagit avec les cavéolines par l'intermédiaire de son domaine intracellulaire. Cette interaction entraîne l'hydrolyse des sphingolipides et la formation de céramides (Bilderback *et al.*, 1997). D'autre part, TrkA peut inhiber cette hydrolyse en activant la PI3K qui interagirait directement avec les sphingomyélinases pour les inhiber (Bilderback *et al.*, 2001). Les cavéolines permettraient donc de réguler ces 2 signalisations contraires puisque surexprimées, elles inhibent l'activation de TrkA et favorisent la synthèse de céramides par p75^{NTR} (Bilderback *et al.*, 1999).

Enfin, le récepteur p75^{NTR} peut également recruter la protéine Shc, partenaire bien connue des Trk. Cette interaction va entraîner la phosphorylation de Shc, favorisant ainsi la signalisation des récepteurs Trk (Epa *et al.*, 2004). La protéine FAIM (Fas apoptosis inhibitor molecule) peut interagir à la fois avec TrkA et p75^{NTR} et intervient dans la croissance des neurites *via* l'activation de la voie NF- κ B et l'activation de Erk (Sole *et al.*, 2004). En conclusion, notons également que la formation du complexe p65-TRAF6 permettrait la connexion des deux récepteurs pour aboutir à l'activation de la voie NF- κ B, TRAF6 assurant la liaison à p75^{NTR} et p62 à TrkA (Wooten *et al.*, 2001)

2. La Sortiline

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

a. Aspect génétique

Le gène de la sortiline (*SORT1*) est situé sur le chromosome 1, segment p13.1-p21.3. Il contient 20 exons qui s'étendent sur 50 kb. Des Northern blots réalisés chez l'homme indiquent que son transcrit est présent dans de nombreux tissus tels que le cerveau, le cœur,

les muscles squelettiques, les testicules, la thyroïde, le sein ou encore la moelle épinière (Mazella, 2001, Petersen *et al.*, 1997).

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

Table 5. Caractéristiques de la sortiline. Gène de la sortiline humaine et sa localisation chromosomique. Taille du transcrit avec son numéro d'accèsion NCBI. Taille de la protéine avec son numéro d'accèsion Uniprot.

b. Structure Protéique

La sortiline fait partie de la famille des récepteurs à domaine VPS10 (vacuolar protein sorting 10) qui doit son nom à une protéine de levure impliquée dans les trafics intracellulaires entre le réseau transgolgien et les vacuoles. De la même manière chez l'homme, la sortiline joue un rôle important dans l'internalisation de ces nombreux ligands et le transport entre le golgi, les endosomes et les lysosomes (Hermeijer, 2009). Après libération de son peptide signal de 33 acides aminés, la sortiline est une protéine N-glycosylée, de type I et de 798 acides aminés présentant un seul domaine transmembranaire de 23 acides aminés, une courte partie cytosolique de 53 acides aminés et une longue portion N-terminal de 722 acides aminés (Figure 17) (Munck Petersen *et al.*, 1999).

En fonction de sa localisation, membranaire ou vésiculaire, la partie N-terminale est soit extracellulaire, soit luminale. Elle est composée d'un propeptide court et du domaine VPS10 de 700 acides aminés. Le propeptide est clivé dans les compartiments tardifs du golgi par la furine, étape indispensable à la fixation des ligands. Le domaine VPS10 est constitué par un module 10CC contenant 10 cystéines conservées et un domaine β propeller composé de 10 hélices β . Il a été montré que le module 10CC est primordial pour la fixation des ligands (Westergaard *et al.*, 2004). Cependant, une modélisation *in silico* du récepteur propose que ces interactions passent plutôt par le domaine β propeller (Paiardini and Caputo, 2008). Cette dernière hypothèse a été confortée par la résolution du domaine N-terminal de la sortiline complexé à un de ses ligands, la neurotensine (Quistgaard *et al.*, 2009). Notons que si tous les ligands entrent en compétition pour lier la sortiline, leurs sites d'interaction au sein du domaine β propeller sont différents. De plus, leur capacité à entrer en compétition serait due à la place restreinte à l'intérieur de ce domaine plutôt qu'à un même site de fixation (Quistgaard *et al.*, 2009).

La partie cytosolique présente des motifs similaires à ceux retrouvés dans la queue cytoplasmique du récepteur M6P (mannose 6-phosphate), lui aussi impliqué dans le trafic

INTRODUCTION

intracellulaire et les processus d'internalisation. Elle est composée de 2 motifs caractéristiques : la séquence ⁷⁹²YSVL⁷⁹⁵ impliquée dans l'endocytose du récepteur et la séquence ⁸²²HDDSDELL⁸³⁰ composée d'un cluster acide potentiellement phosphorylable par la CKII (casein kinase II) et d'une dileucine, impliquée à la fois dans l'internalisation du récepteur et dans le trafic intracellulaire de protéines cytoplasmiques (Nielsen *et al.*, 2001, Petersen *et al.*, 1997).

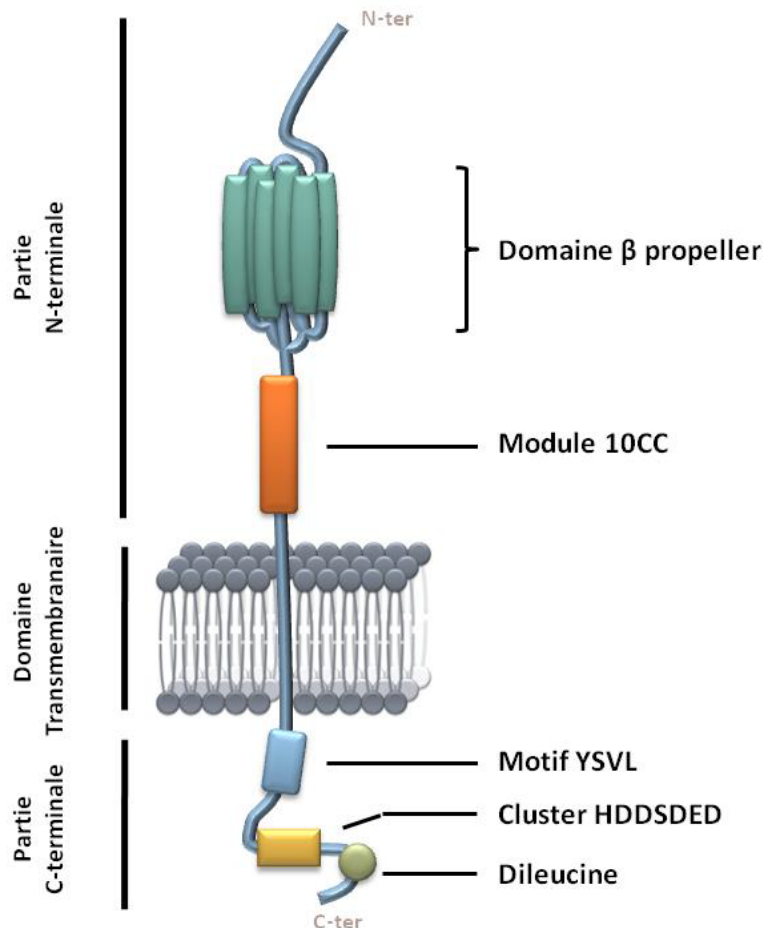


Figure 17. Représentation schématique de la sortiline. *La sortiline est une glycoprotéine de type I dont le domaine VPS10 constitue la quasi-totalité de sa partie N-terminale. Il est indispensable à la liaison des ligands notamment grâce à son domaine β propeller constitué de 10 hélices β et au module 10CC composé de 10 cystéines conservées. La partie cytoplasmique très courte comprend 3 motifs nécessaires à l'internalisation de la sortiline et au trafic de protéines intracellulaires.*

c. p75^{NTR} et Sortiline

De nombreuses études ont décrit une action pro-apoptotique des neurotrophines *via* p75^{NTR} et ce, en absence de TrkA. Cependant, il a été émis comme hypothèse que d'autres ligands de p75^{NTR} pourraient expliquer ce phénomène d'apoptose. La découverte d'une action propre aux proneurotrophines a permis d'apporter des éléments de réponse. En effet, le proNGF stimule la mort cellulaire des neurones sympathiques et des oligodendrocytes *via*

p75^{NTR} sans activer TrkA (Lee *et al.*, 2001). La première idée fut que l'activation de p75^{NTR} par le proNGF serait due à une différence d'affinité vis-à-vis de TrkA. En réalité, le proNGF lie TrkA et p75^{NTR} avec la même affinité (Kd≈15-20 nM), suggérant que la seule liaison à p75^{NTR} ne pouvait suffire. L'identification de la sortiline comme récepteur des proneurotrophines avec un Kd d'environ 5 nM a permis de résoudre cette énigme (Nykjaer *et al.*, 2004). En effet, le proNGF se fixe simultanément sur la sortiline par son prodomaine et sur p75^{NTR} par l'intermédiaire de sa partie mature, formant ainsi un complexe ternaire dont chacun des membres est nécessaire à l'induction de l'apoptose. De même, le proBDNF induit la mort cellulaire des neurones sympathiques en formant ce même complexe ternaire puisque les neurones déficients en p75^{NTR} sont résistants à l'apoptose induite par le proBDNF et que l'utilisation d'antagonistes de la sortiline bloque également cette apoptose (Teng *et al.*, 2005). Les mêmes résultats ont été observés pour la NT3 avec une activation de la voie JNK, et cette induction peut être contrecarrée par un traitement au NGF (Yano *et al.*, 2009). Pour la NT4/5, aucune donnée ne fait état d'une induction d'apoptose. Notons également que son prodomaine, qui présente une faible homologie avec ceux des autres membres de la famille, ne semble pas interagir avec la sortiline (Chen *et al.*, 2005). Hormis l'activation de la voie JNK pour la NT3, les voies de signalisation activées par ce complexe ternaire restent encore inconnues.

3. NOGO et Lingo 1

a. Aspect génétique

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

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

Table 6. Caractéristiques des récepteurs Nogo et LINGO-1. Gènes des récepteurs Nogo et LINGO-1 humains et leurs localisations chromosomiques. Taille des transcrits avec leurs numéros d'accèsion NCBI. Taille des protéines avec leurs numéros d'accèsion UniProt.

INTRODUCTION

b. Structure protéique

Le récepteur NogoR (NgR) est une protéine de 473 acides aminés, ancrée à la membrane par GPI (glycosyl phosphatidyl inositol). Il contient 8 répétitions riches en leucine (LRR) flanquées en N- et C-terminal par 2 régions riches en cystéine (nommées LRRNT et LRRCT). Cette partie d'environ 310 résidus est impliquée dans la liaison des ligands. Entre le LRRCT et le site d'ancrage GPI, se situe une région de 135 résidus riche en sérine, thréonine, proline et glycine, permettant son interaction avec des corécepteurs (He *et al.*, 2003, Wen *et al.*, 2005) (Figure 18).

LINGO-1 (LRR and Ig domain-containing Nogo receptor-interacting protein) est une protéine transmembranaire de type I contenant 12 répétitions LRR qui, comme NgR, sont coiffées de part et d'autre de régions riches en cystéine. La partie juxtamembranaire extracellulaire comprend un domaine de type immunoglobuline Ig1 et la partie cytoplasmique très courte contient un site de phosphorylation typique du récepteur à l'EGF (Y591) (Mi *et al.*, 2004, Mosyak *et al.*, 2006) (Figure 18).

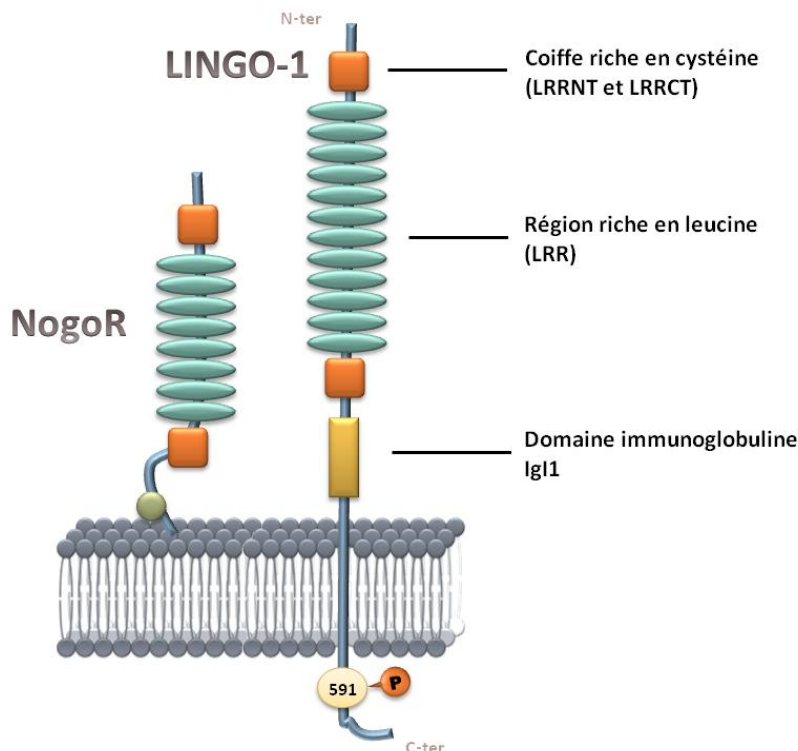


Figure 18. Représentation schématique des récepteurs Nogo et LINGO-1. Les 2 récepteurs contiennent plusieurs régions riches en leucine (8 LRR pour Nogo et 12 LRR pour LINGO-1) coiffées de chaque côté de régions riches en cystéine nommées LRRNT et LRRCT. Le récepteur Nogo est ancré à la membrane par un glycosyl phosphatidyl inositol (rond vert) alors que LINGO-1 possède un domaine immunoglobuline IG1-like suivi d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique contenant une tyrosine phosphorylable (Y591).

c. Relation avec p75^{NTR}

Nous avons déjà vu que p75^{NTR} est impliqué dans l'inhibition de l'élongation des neurites en recrutant la protéine Rho-GDI, autorisant ainsi la libération de RhoA et son activation (Yamashita and Tohyama, 2003). Cette capacité a attiré l'attention dès lors qu'il est devenu évident que des protéines associées à la myéline comme Nogo-66, MAG (myelin-associated glycoprotein) ou OMgp (oligodendrocyte myelin glycoprotein) inhibaient la croissance axonale, elles aussi par un mécanisme Rho-dépendant (Niederost *et al.*, 2002). De plus, ces 3 protéines se fixent à NgR, malgré l'absence de domaine cytoplasmique. Ces observations ont donc mené à l'idée d'une éventuelle interaction entre p75^{NTR} et NgR, idée qui sera confirmée par la découverte d'une interaction directe entre les 2 récepteurs, menant à l'activation de RhoA. L'inhibition de cette interaction par l'utilisation de dominants négatifs de NgR ou de mutant de p75^{NTR} délété du domaine cytoplasmique restaure l'élongation des neurites. De la même manière, des neurones issus de souris KO pour p75^{NTR} restent insensibles aux ligands Nogo-66, MAG et OMgp. Cependant, la transfection de ces deux récepteurs dans des cellules non neuronales ne permet pas l'activation de RhoA, suggérant la nécessité d'un autre composant spécifique au système nerveux central pour former un complexe fonctionnel. C'est alors que l'équipe de Mi en 2004 a identifié LINGO-1 comme étant cette molécule manquante. En effet, LINGO-1 interagit à la fois avec NgR et p75^{NTR} et la transfection de ces 3 récepteurs dans des cellules non neuronales est requise pour activer RhoA. De façon intéressante, des cellules neuronales transfectées avec un LINGO-1 délété de sa partie cytoplasmique ne répondent plus aux ligands Nogo-66, MAG et OMgp, suggérant un rôle de dominant négatif de ce LINGO-1 tronqué en formant un complexe ternaire non fonctionnel (Mi *et al.*, 2004). Ainsi, la transduction du signal de ce complexe ternaire passerait par la partie cytoplasmique de p75^{NTR} mais aussi par celle de LINGO-1, aussi courte soit elle.

E. EFFETS DE P75^{NTR} DANS LES CANCERS

Nous avons vu que p75^{NTR} est principalement impliqué dans le développement et le maintien du système nerveux central, et la majorité des études visant à détailler ses effets biologiques et sa signalisation est réalisée dans des modèles de cellules neuronales. Cependant, un nombre croissant de travaux montre que p75^{NTR} est exprimé dans des cellules non neuronales et peut avoir un effet anti- ou pro-tumoral, selon le type de cancer auquel il est associé.

INTRODUCTION

1. Effet anti-tumoral

- Cancer gastrique

Dans les cancers gastriques, p75^{NTR} est identifié comme un potentiel suppresseur de tumeur. En effet, son expression diminue dans les cellules cancéreuses comparées aux cellules normales et est quasi inexistante dans les cancers métastatiques. De plus, sa surexpression inhibe la migration et l'invasion *in vitro*, tout comme la formation de métastases *in vivo*. Ces effets seraient dus à une diminution de la voie NF-κB et des enzymes uPA (urokinase-type plasminogen activator) et MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), ainsi que par une augmentation de TIMP-1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1), l'inhibiteur de MMP (Jin *et al.*, 2007a). p75^{NTR} inhibe également la prolifération des cellules cancéreuses gastriques en induisant un arrêt du cycle cellulaire *via* l'augmentation de p27^{Kip1} et la diminution des cyclines A, D1 et E, de la Cdk2, de pRb et de PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Jin *et al.*, 2007b).

- Cancer hépatique

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

- Cancer de la vessie

Une fois encore, p75^{NTR} inhibe la prolifération des cellules cancéreuses de la vessie en induisant une accumulation des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Cette accumulation est associée à une augmentation de p16^{INK4a} et une diminution des cyclines D1 et E, de la Cdk2, de pRb, de E2F1 et de PCNA (Khwaja and Djakiew, 2003). Notons qu'un traitement au NGF permet de contrer les effets de p75^{NTR} et de restaurer ainsi la prolifération. Dans ce type de cancer, p75^{NTR} induit également l'apoptose en régulant les protéines impliquées

dans la voie mitochondriale de l'apoptose telles que Bad, Bax, Bik, Bcl-2, Bcl-XL, IAP1, les caspases 9 et 7 et le relargage du cytochrome C (Tabassum *et al.*, 2003)

- Cancer de la prostate

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

Au cours de la progression tumorale, l'expression de TrkA augmente alors que celle de p75^{NTR} diminue (Papatsoris *et al.*, 2007). De ce fait, il y a augmentation de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses prostatiques (Festuccia *et al.*, 2007, Sortino *et al.*, 2000). D'ailleurs, l'injection d'anticorps neutralisant anti-NGF ou d'un inhibiteur pan-Trk permet d'inhiber la croissance et l'apparition de métastases dans un modèle de xénogreffe en souris nude (Miknyoczki *et al.*, 2002, Weeraratna *et al.*, 2001). La perte d'expression de p75^{NTR} est, elle, associée à un effet anti-apoptotique mais également à une stimulation de la prolifération et de l'invasion. En effet, la réexpression de ce récepteur dans des cellules cancéreuses prostatiques induit une accumulation des cellules en phase G0/G1 en régulant les protéines du cycle cellulaire (cycline A/E, cdk2/6, pRb, E2F1, PCNA et p16^{INK4a}), et provoque la mort cellulaire en modulant les protéines de la voie mitochondriale (Bax, Bak, Bad, SMAC, Caspase-9/7, Bcl-XL, XIAP et PARP) (Khwaja *et al.*, 2006). Notons que ces effets sont inhibés par un traitement au NGF, démontrant ainsi un effet NGF-dépendant propre au p75^{NTR}. Cette réexpression entraîne également une diminution de l'expression de certains partenaires de p75^{NTR} comme RIP ou TRAF2, ainsi qu'une activation des voies de signalisation comme NF-κB mais aussi JNK. Ces diminutions aboutissent, dans les cellules cancéreuses prostatiques, à l'apoptose (Allen *et al.*, 2005). Enfin, p75^{NTR} agit également sur la migration cellulaire en diminuant l'expression et l'activité des enzymes uPA, MMP-2 et -9 et en augmentant l'expression de TIMP-1 (Nalbandian and Djakiew, 2006). L'ensemble de ces données fait de p75^{NTR} un bon candidat pour la thérapie génique. Des premiers essais d'injection intra-tumorale de liposomes contenant l'ADNc de p75^{NTR} ont d'ailleurs donné des résultats prometteurs dans un modèle de xénogreffes chez la souris (Allen *et al.*, 2004).

- Cancer du pancréas

Dans le cancer du pancréas, l'expression des ARNs de TrkA et p75^{NTR} est inversement corrélée. En effet, les patients ayant une forte expression de TrkA présentent plus d'invasions périneurales et survivent moins longtemps, faisant de TrkA un marqueur

INTRODUCTION

d'agressivité. En revanche, les patients montrant plutôt une expression de p75^{NTR} ont un pronostic plus favorable, avec une survie globale plus longue (Dang *et al.*, 2006). Des travaux comparatifs de différentes lignées de cellules cancéreuses pancréatiques en fonction de l'expression de chaque récepteur ont abouti aux mêmes conclusions, à savoir TrkA favorisant la croissance tumorale et p75^{NTR} l'inhibant. Constatons également qu'à expression égale, le NGF induit la croissance tumorale *via* la voie des MAPK, suggérant une activation préférentielle de TrkA (Zhu *et al.*, 2001).

2. Effet pro-tumoral

- Mélanome

Le mélanome est un cancer de la peau très agressif qui prend son origine dans l'épiderme et les mélanocytes pour généralement métastaser dans le cerveau. Dans les cellules de mélanome, toutes les neurotrophines ainsi que leurs récepteurs sont exprimés, alors que dans les mélanocytes leurs expressions sont faibles. L'utilisation de K252a (inhibiteur de protéines kinases) ou de dominants négatifs des récepteurs Trk inhibe la prolifération et la migration et, l'inhibition de p75^{NTR} entraîne également une diminution de la migration, suggérant que les neurotrophines jouent un rôle primordial dans la progression des cellules de mélanome (Truzzi *et al.*, 2008). Le proNGF *via* p75^{NTR} stimule lui aussi la migration et l'invasion de ces cellules avec une efficacité 10 fois supérieure au NGF, probablement grâce à la coopération entre p75^{NTR} et la sortiline qui s'avère être également exprimée dans les mélanomes. De plus, l'expression de p75^{NTR} est associée à l'invasion péri-neurale dans les mélanomes malins (Chan and Tahan, 2010) et à une survie accrue des métastases du cerveau (Marchetti *et al.*, 2004)

- Cancer des cellules squameuses

Les cellules squameuses sont des cellules plates et fines qui tapissent entre autre l'œsophage, l'intérieur de la cavité buccale, de la gorge, ainsi que la peau. Dans ces cancers dits « à cellules squameuses », le récepteur p75^{NTR} a un effet pro-tumoral. Par exemple, dans les cancers de la cavité orale, il est associé à un mauvais pronostic (Soland *et al.*, 2008). Il est retrouvé aussi dans 50% des cancers de l'œsophage et son invalidation par siRNA inhibe la croissance et induit la mort cellulaire (Okumura *et al.*, 2006). De plus, les cellules cancéreuses de l'œsophage exprimant p75^{NTR} sont capables de s'auto-renouveler,

de former des sphères dans des conditions de cultures non adhérentes et sont résistantes aux drogues : 3 caractéristiques des cellules souches cancéreuses (Huang *et al.*, 2009).

- Cancer du sein

Comme nous l'avons vu, le NGF a une influence sur les cellules de cancer du sein. En effet, les cellules mammaires normales ou cancéreuses expriment les récepteurs TrkA et p75^{NTR}, mais seules les cellules cancéreuses répondent au NGF (Descamps *et al.*, 1998, Descamps *et al.*, 2001a, Dolle *et al.*, 2004). L'injection d'anticorps bloquant ou de siRNA anti-NGF dans des souris xéno greffées avec des cellules tumorales de sein permet d'inhiber la croissance et d'augmenter l'apoptose au sein de tumeurs (Adriaenssens *et al.*, 2008). *In vivo*, l'expression de la forme active de TrkA (phospho-TrkA) est retrouvée dans la plupart des effusions pleurales et récurrences locorégionales (90%) et dans 41% des tumeurs primaires, suggérant un rôle dans la progression tumorale (Davidson *et al.*, 2004). En plus des cellules cancéreuses, p75^{NTR} est retrouvé dans les cellules myoépithéliales et fait office de facteur de bon pronostic (Popnikolov *et al.*, 2005, Reis-Filho *et al.*, 2006). *In vitro*, notre laboratoire a montré une sécrétion de NGF par les cellules cancéreuses mammaires qui, par une boucle autocrine, stimulent leur propre prolifération, invasion et survie (Dolle *et al.*, 2003, Dolle *et al.*, 2005b). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, d'anticorps bloquants et de modèles de surexpression a permis de discriminer le rôle de chaque récepteur. Ainsi, TrkA, *via* l'activation des MAPK, de PI3K/Akt et de p38MAPK, stimule, *in vitro*, la prolifération et la migration/invasion des cellules cancéreuses mammaires, et favorise, *in vivo*, l'angiogenèse tumorale et la formation de métastases (Lagadec *et al.*, 2009). Quant à lui, p75^{NTR} recrute le partenaire protéique TRADD pour stimuler la voie NF-κB et donc la survie cellulaire (Descamps *et al.*, 2001b, El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003). D'autres travaux ont montré que le NGF coopère avec ErbB2 pour activer la croissance des cellules cancéreuses mammaires et que le Tamoxifen inhibe l'effet mitogène de l'axe NGF/TrkA (Chiarenza *et al.*, 2001, Tagliabue *et al.*, 2000). Enfin, notre laboratoire a montré tout récemment que le BDNF et la NT4/5 stimulaient également la survie *via* p75^{NTR} et l'isoforme tronquée de TrkB, TrkB-T1 (Vanhecke *et al.*, 2011)

INTRODUCTION

III- PROTEOMIQUE

Le terme « protéomique » est apparu pour la première fois dans la littérature en 1997 par analogie avec une autre discipline qu'est la génomique (James, 1997). La protéomique est définie comme étant la science qui étudie les protéomes, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un organite, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme à un moment donné et sous des conditions données. Dans la pratique, la protéomique s'attache à identifier de manière globale les protéines extraites de culture cellulaire, de tissu ou de fluide biologique, leur localisation dans les compartiments cellulaires, leurs éventuelles modifications post-traductionnelles ainsi que leur quantité. Les méthodologies mises en œuvre pour l'analyse du protéome peuvent schématiquement être séparées en deux grands groupes : dans le premier peuvent être regroupées les méthodes expérimentales réalisées de façon « réelle », reposant principalement sur les techniques de séparation et d'analyse biophysique des protéines. Un second groupe de méthodes, mises en œuvre de manière *in silico*, fait appel à l'analyse d'images et à la bio-informatique. Ces 2 groupes sont mis à contribution lors des principales étapes d'une analyse protéomique. La protéomique est un outil d'analyse très largement employé en cancérologie, tant en terme d'identification de marqueurs biologiques qu'en terme de description de processus biologiques, et prend alors le nom de « oncoprotéomique » (Joshi *et al.*, 2011).

La progression d'une analyse protéomique suit d'une manière générale 4 grandes étapes successives que sont 1- l'extraction des protéines et la simplification des échantillons, 2- la séparation des protéines, 3- leur identification (le plus souvent par spectrométrie de masse), et 4- la quantification de ces dernières. Nous allons décrire de manière non exhaustive les principales stratégies employées par les équipes de recherche protéomique afin d'optimiser ces 4 étapes.

A. Grandes étapes de la protéomique

1. Extraction/simplification

La première étape, et sans doute une des plus déterminantes, est l'extraction des protéines de leur matériel biologique afin de permettre leurs analyses. Pour cette étape, il est nécessaire de bien prendre en compte à la fois le type de matériel biologique de départ (culture cellulaire, tissu, fluide biologique) mais également les stratégies employées par la suite. Par exemple, si l'on part de culture cellulaire, il sera préférable de ne pas utiliser de

SDS dans le tampon de lyse en vue d'une analyse par électrophorèse bidimensionnelle (2DE) du fait de sa forte charge négative rendant très compliquée la première dimension d'iso-électro-focalisation (IEF). La composition des tampons de lyse doit faire l'objet de mises au point et de tests sur le modèle utilisé. Notons que si les chaotropes sont principalement au nombre de 2 (urée et thiourée), la panoplie de détergent est quant à elle quasi infinie avec comme fer de lance des composés comme les Triton, les Brij ou encore le CHAPS. Cependant, de nombreux laboratoires développent eux-mêmes leurs propres détergents afin de répondre à une problématique biologique bien spécifique.

La plupart du temps, les extractions protéiques sont très complexes du point de vue de la composition des tampons, et une étape dite de simplification des échantillons est souvent nécessaire. C'est le cas par exemple lors d'une étude sur un compartiment subcellulaire précis. Nous pourrions alors opter pour une séparation de ces compartiments par des techniques d'ultracentrifugation qui permettront de récolter uniquement le compartiment souhaité. Cependant, ces stratégies présentent l'inconvénient d'avoir un rendement assez faible, et nécessitent donc un apport initial de matériel biologique très important. Dans le cadre d'étude d'interaction protéine/protéine, la co-immunoprécipitation de la protéine cible avec ses partenaires permet d'enrichir l'échantillon en protéines d'intérêts pour l'analyse. Cependant, cette stratégie nécessite l'emploi d'anticorps qui peuvent parfois ne pas être suffisamment spécifiques de la protéine cible et donc ne pas permettre de s'affranchir suffisamment des protéines dites alors contaminantes. C'est pour pallier ce problème de spécificité lié à l'utilisation d'anticorps qu'a été mise au point la stratégie du TAP-tag (tandem affinity purification-tag) (Rigaut *et al.*, 1999). Elle repose sur l'utilisation d'une protéine cible chimérique « taggée » avec 2 peptides spécifiques (une séquence répétée de la protéine A et un peptide de fixation de la calmoduline). Grâce à ce système, la protéine cible « taggée » peut être purifiée avec ses partenaires protéiques par 2 chromatographies d'affinité successives séparées par une étape d'élution de la première chromatographie par clivage enzymatique. Toutefois, puisqu'il faut utiliser une protéine chimérique, nous nous retrouvons avec un modèle de surexpression pouvant apporter de nombreuses interrogations en termes de relevance biologique (activité de la protéine, nature des interactions) et de faux-positifs. Enfin, dans le cadre d'une étude portant sur une ou des protéines possédant des particularités biochimiques comme la phosphorylation, il est possible d'enrichir les échantillons en protéine portant cette particularité. Pour les phosphorylations, deux grandes stratégies se dégagent, à savoir l'utilisation de colonnes d'oxyde de titane (TiO₂) ou de chromatographie d'affinité métal-ion (IMAC, ion metal affinity column, BioRad). Notons qu'en fonction du choix de la stratégie utilisée, les protéines phosphorylées ne seront pas retenues avec le même rendement et dans les mêmes proportions, amenant le plus souvent à

INTRODUCTION

combiner ces 2 techniques afin de couvrir l'ensemble des protéines phosphorylées de l'échantillon biologique.

2. Séparation

Après avoir extrait et simplifié les échantillons biologiques à étudier, vient l'étape de séparation. En effet, même simplifié, l'échantillon contient encore un grand nombre de protéines différentes qu'il faut pouvoir individualiser pour analyser séparément. Pour ce faire, l'utilisation d'une propriété biochimique des protéines extraites, à savoir leur charge négative due à l'emploi de SDS (composé fréquemment utilisé dans la composition des tampons de lyse), amène l'emploi d'électrophorèse. En fonction de la complexité de l'échantillon mais également du type d'analyse souhaitée, cette électrophorèse (SDS-PAGE) peut se faire en une seule dimension, en fonction du poids moléculaire des protéines. Cependant, cette solution ne permet pas de visualiser les différentes isoformes d'une même protéine (qui auront le même poids moléculaire), ou de différencier les protéines de même poids moléculaire. C'est pourquoi une des techniques utilisées le plus fréquemment est l'électrophorèse en deux dimensions (2DE). Grâce à cette stratégie, les protéines seront d'abord séparées en fonction de leur point isoélectrique (première dimension, IEF), puis en fonction de leurs poids moléculaire comme lors d'un SDS-PAGE classique. Les isoformes pourront alors être résolus de part leur point isoélectrique différent, de même pour les protéines de même masse. Notons que sur un gel 2D, il est aujourd'hui possible de résoudre correctement environ 10000 spots uniques, correspondant à plus de 1000 protéines différentes (Gorg *et al.*, 2009). Afin de pouvoir visualiser ces spots, l'application d'une coloration est impérative. Majoritairement, 2 options sont possibles. Tout d'abord la coloration au nitrate d'argent ; elle est très sensible (seuil de détection à 0,1 ng de protéines) mais non linéaire, ce qui fait apparaître des problèmes de saturation de coloration et donc des difficultés de quantification. De plus, la coloration à l'argent n'est pas recommandée en vue d'une analyse par spectrométrie de masse à cause des sels d'argent générés qui sont une limitation à ce type d'analyse. La deuxième option est la coloration au bleu de Coomassie colloïdale. C'est une coloration linéaire, moins sensible (seuil de détection à 100 ng de protéines) que le nitrate d'argent, qui présente l'intérêt de pouvoir quantifier les analyses et est totalement compatible avec une analyse par spectrométrie de masse. Le principal problème de la 2DE est son incompatibilité avec les protéines membranaires causée par la présence de lipides membranaires prohibitifs lors de l'IEF. C'est pourquoi la technique du BN-PAGE (blue native-PAGE) a été mise au point. En effet, cette stratégie permet de séparer dans un gel d'acrylamide non pas des protéines uniques, mais des

complexes protéiques entiers (Tulp *et al.*, 1999). Pour ce faire, l'étape d'extraction protéique doit être adaptée afin d'être suffisamment efficace pour extraire les complexes tout en conservant l'intégrité des complexes protéiques (Reisinger and Eichacker, 2008). Ces complexes sont alors chargés grâce au bleu de Coomassie pour permettre leur migration dans le gel d'acrylamide. Cependant, les outils informatiques d'analyse de ce type de gels sont encore à développer afin d'en faire une stratégie robuste, utilisable par le plus grand nombre.

3. Identification

La principale avancée de la protéomique fut la possibilité d'analyser les protéines par spectrométrie de masse. Cette découverte a valu le prix Nobel de chimie à John B. Fenn, Koichi Tanaka et Kurt Wüthrich en 2002. La première étape d'une analyse par spectrométrie de masse est l'ionisation. Avant les années 80, les processus d'ionisation ne permettaient l'étude que de petites molécules inférieures à 1000 Da et le plus souvent dans des conditions drastiques pour celles-ci. A la fin des années 80, deux méthodes d'ionisation dites « douces » ont été développées : l'ionisation de type « electrospray ionisation » (ESI) (Fenn *et al.*, 1989) et l'ionisation de type « matrix assisted laser desorption/ionisation » (MALDI) (Hillenkamp *et al.*, 1991). Ces 2 innovations ont permis l'ionisation de biomolécules intactes et l'arrivée de ces outils dans la recherche biologique.

L'ESI ou électronébulisation est l'émission, en phase gazeuse, d'ions initialement en solution grâce à un champ électrique intense. Cette source a la particularité de donner des ions plurichargés, et permet l'analyse de protéines de haute masse (supérieures à 100 kDa) même avec des analyseurs de gamme de masse limitée. Les échantillons passent dans une aiguille très fine à l'extrémité de laquelle est appliquée une très forte tension afin de créer, grâce à des explosions coulombiennes, des fines gouttelettes de plus en plus petites contenant les molécules. Le sel et les détergents utilisés dans les tampons biologiques peuvent perturber l'ionisation des peptides par compétition et forment avec eux des adduits multiples qui divisent le signal d'intérêt le rendant moins détectable (Mann and Wilm, 1995).

Le MALDI utilise un faisceau laser pulsé pour désorber et ioniser sous vide un mélange matrice/échantillon co-cristallisés sur une surface métallique. L'ajout d'une matrice en excès, avec un ratio de 1000 à 10000 pour 1 avec l'échantillon, absorbant à la longueur d'onde du laser, permet de protéger les analytes et d'améliorer l'analyse (Hillenkamp and Karas, 1990). Les principaux avantages de cette source MALDI pour l'étude des biomolécules sont la sensibilité (sub-femtomole), la rapidité (quelques secondes par analyse), une bonne

INTRODUCTION

tolérance aux sels des tampons et une gamme de mesure jusqu'à 500 kDa. La production d'ions par MALDI génère principalement des ions monochargés et dépend pour beaucoup de la qualité de la préparation de l'échantillon, du type de matrice utilisée, de la présence de sels (bien qu'elle soit plus tolérante que la source ESI) et du pH.

A la suite de la source, les ions générés peuvent être propulsés dans une grande variété d'analyseurs. Nous obtenons alors le nom du spectromètre de masse en combinant les sigles de la source et de l'analyseur : ESI-quadripole, ESI-trappe ionique (ESI-IT), ESI-temps de vol (ESI-TOF), ESI-résonance cyclotronique (ESI-FTICR) ou encore MALDI-TOF, MALDI IT et MALDI-Q-TOF. Les différences entre ces analyseurs résident dans la sensibilité, la résolution, la rapidité de mesure, la gamme de masse mesurable et surtout la capacité à fragmenter une ou plusieurs fois les ions pour les séquencer ou les caractériser. De plus, notons que certains appareils vont combiner plusieurs analyseurs à la suite afin d'additionner les avantages de chacun mais surtout pour augmenter la résolution de l'analyse et permettre une étude encore plus précise. Nous allons alors parler d'analyse en tandem, où le premier analyseur (généralement un quadripôle) va sélectionner un ion (ion parent) pour le faire pénétrer dans une chambre de collision qui casse les liaisons les plus faibles, et le deuxième mesurer le rapport m/z des ions obtenus (ions fils).

Lorsqu'une étude protéomique par spectrométrie de masse est réalisée, le choix du spectromètre dépend du type d'analyse à effectuer et de la précision nécessaire. Par exemple, l'étude des modifications post-traductionnelles nécessite un spectromètre de masse de très haute résolution, ce qui orientera la choix vers un LTQ-Orbitrap (Linear Quadrupole Trap-Orbitrap) (Yates *et al.*, 2006) ou un FT-ICR (Fourier transform ion cyclotron resonance) (Gao *et al.*, 2003).

4. Quantification

L'un des challenges de la protéomique est d'apporter la notion de quantification à l'étude d'une ou de plusieurs protéines. Voici quelques exemples de stratégies de protéomique quantitative :

- 2DE et quantification des gels

Comme nous l'avons vu précédemment, la première approche de quantification consiste en la coloration du gel dans le but de pouvoir comparer les intensités des spots entre eux, mais aussi d'un gel à un autre. Différents types de colorations peuvent être mis en place comme la coloration au nitrate d'argent, la coloration au bleu de Coomassie colloïdal, la coloration

par fluorescence (Sypro Orange, Sypro Red, Sypro Ruby) et l'autoradiographie qui utilise l'incorporation dans les protéines d'isotopes radioactifs comme le ^{35}S ou le $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$. Toutefois, la coloration la plus largement employée pour visualiser les spots de gels 2D est la coloration au bleu de Coomassie colloïdal pour sa commodité d'utilisation. En effet, le nitrate d'argent présente l'inconvénient d'une coloration non-linéaire, la fluorescence nécessite un équipement spécifique pour visualiser les gels et l'utilisation d'isotopes radioactifs est contraignant au niveau sécuritaire ainsi que dangereux pour les manipulateurs. Pour l'utilisation de ces colorations, des logiciels informatiques comme PDQuest (BioRad) (Beresini *et al.*, 1988) ont été développés, afin de rendre ces analyses rapides et faisables à haut débit. Cependant, cette stratégie reste relativement lourde à mettre en place en raison d'un travail important de traitement informatique des résultats. Toutefois, elle permet de faire un screening précis des éventuelles variations entre différents échantillons biologiques et autorise facilement une analyse par spectrométrie de masse, le plus souvent de type MALDI-TOF/TOF.

- 2D-DIGE

Cette stratégie repose sur un marquage chimique des protéines après leur extraction, permettant une analyse comparative de différents échantillons (Unlu *et al.*, 1997). Elle est basée sur l'utilisation de 3 fluorochromes (Cy-dyes : cy2 ; cy3 ; cy5) spectralement différenciés et d'un standard interne. Chacun des extraits protéiques à comparer est marqué respectivement avec le fluorochrome Cy3 ou Cy5. Un mélange contrôle (le standard interne) contenant un aliquot de tous les échantillons de l'expérience est marqué avec le Cy2. Après marquage, les 3 échantillons sont mélangés puis résolus sur un seul gel 2D qui est alors scanné suivant les 3 longueurs d'ondes des fluorochromes. Les images générées sont comparées et quantifiées par un logiciel approprié du type "DeCyder" (GE Healthcare Life Sciences), "SameSpot" (Nonlinear Dynamics) ou "Delta 2D" (Decodon). Après sélection, les protéines d'intérêt peuvent être caractérisées par spectrométrie de masse. Le principal avantage de cette technique est de pouvoir analyser en même temps 2 échantillons différents et de pouvoir quantifier les différences entre les deux. Cependant, se pose le problème de l'efficacité du marquage aux cyanines ajouté au coût financier globale (kit des fluorochromes, scanner spécifique et logiciel informatique dédié). Enfin, notons également que la stratégie DIGE a récemment été couplée à la méthode de séparation BN-PAGE afin de tirer partie des principaux avantages qu'offrent ces deux techniques : l'étude des complexes protéiques (surtout lors de l'étude des complexes membranaires) et la quantification simultanée de plusieurs échantillons biologiques sur un même gel (Heinemeyer *et al.*, 2009).

INTRODUCTION

- SILAC

La méthode qui est maintenant connue sous le nom de SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) (Ong *et al.*, 2002) portait autrefois le nom de AACT (amino acid coded mass tagging) (Oda *et al.*, 1999), et consiste en un marquage métabolique des protéines cellulaires. Elle s'applique donc à des cellules maintenues en culture et comporte 2 phases. La première phase est la phase d'adaptation, consistant à cultiver une population de cellules en présence d'acides aminés isotopiquement alourdis jusqu'à ce que toutes les protéines (95 à 100%) aient incorporé ces acides aminés lourds. Il est nécessaire de déterminer expérimentalement ces conditions d'incorporation pour chaque lignée ou type cellulaire. Le marquage métabolique SILAC peut être suivi par spectrométrie de masse en mode MS. Au cours du marquage, pour chaque peptide, le peptide lourd apparaît sur le spectre MS séparé du peptide léger par un écart correspondant à la différence de masse entre les acides aminés légers et lourds. La deuxième phase consiste à appliquer, après avoir cultivé une population cellulaire dans un milieu normal et l'autre dans un milieu isotopiquement alourdi pendant le temps nécessaire au marquage, un stress ou *stimulus* à l'une des populations. Les cellules issues des deux conditions de culture sont alors mélangées dans un rapport 1:1. Les échantillons peuvent ensuite être fractionnés, les protéines digérées et les peptides analysés en MS et MS/MS. L'information concernant l'origine de chaque protéine est conservée grâce à l'écart de masse introduit par le marquage isotopique qui est facilement détectable au moment de l'analyse protéomique. Chaque peptide est donc détecté par le spectromètre de masse sous la forme d'une paire constituée d'une forme lourde et d'une forme légère. L'analyse protéomique comparative consiste alors à repérer les paires sur le spectre MS. Pour chaque paire, le rapport des intensités du signal des formes lourdes et légères traduit la différence de concentration de ces peptides dans le mélange analysé. En corrélant données MS et données MS/MS, il est possible de remonter à l'identification des peptides et donc des protéines qui présentent des différences d'abondance entre les échantillons à comparer.

- ICAT

Le principe de la méthode ICAT repose sur le marquage chimique de protéines avec deux réactifs différents composés chacun d'un groupe réactif envers un thiol (pour le marquage), d'un bras lourd ou léger (pour différencier les échantillons) et d'une biotine (Gygi *et al.*, 1999). La différence entre les bras lourd et léger se fait pour l'incorporation ou non de deutérium dans ce bras espaceur. Comme pour la méthode SILAC, les extraits protéiques des deux échantillons, après marquage chimique, sont mélangés en ratio 1:1 et subissent une digestion trypsique. Suite à cette digestion, les peptides marqués pourront alors être purifiés

grâce à la biotine sur une colonne d'affinité streptavidine, de sorte de ne conserver que les peptides présentant les marqueurs ICAT. Lors de l'analyse par spectrométrie de masse, les peptides d'une protéine pourront alors être attribués à l'un ou l'autre des échantillons grâce à la différence de masse induite par l'ajout de deutérium dans l'un des marqueurs ICAT. De ce fait, la quantification se fait par la comparaison des intensités relatives des deux pics (1 léger et 1 lourd) d'un même peptide. L'avantage de cette méthode réside dans la biotine contenue dans les marqueurs. En effet, grâce à cela, nous pouvons nous affranchir de la question du rendement du marquage puisque seuls les peptides marqués seront analysés par la suite. Cependant, comme tout marquage chimique, le principal inconvénient est la forte incorporation de sels due à la réaction de marquage dans les échantillons qui peuvent engendrer certaines difficultés lors de l'analyse par spectrométrie de masse. De plus, cette stratégie ne permet qu'une comparaison de 2 échantillons biologiques différents sur une même analyse.

- ITRAQ

Le principe de la méthode iTRAQ repose sur le marquage chimique de peptides tryptiques avec une série de réactifs formant un lien covalent avec les amines primaires de l'extrémité amino-terminale ou de la chaîne latérale des résidus lysine. Ces différents réactifs (au nombre de 4, 6 ou 8 selon le kit utilisé) sont dits isobariques, c'est-à-dire qu'ils possèdent tous une masse moléculaire de 145 Da. Lors de l'analyse en spectrométrie de masse, les peptides marqués (précurseurs) seront alors détectés avec la masse propre du peptide plus 145 Da provenant du réactif iTRAQ. Ce n'est qu'à l'étape de fragmentation du peptide (MS/MS) que nous pourrions apprécier la contribution de chacun des 4 (ou 6 ou 8) réactifs qui se traduira par la libération d'ions (fragments) ayant des masses de 114, 115, 116 ou 117 Da. C'est l'intégration de l'aire sous la courbe des pics émanant de ces ions rapporteurs qui permet l'analyse de quantification relative puisqu'un ratio des valeurs d'intégration peut-être calculé pour chaque peptide détecté. Parmi les avantages de la méthode de quantification relative iTRAQ, notons la possibilité de quantifier plusieurs peptides d'une même protéine, le fait de pouvoir à la fois identifier et quantifier les éléments détectables d'un protéome complexe en un court laps de temps (comparé à la méthode plus lourde des gels 2D) et la possibilité de multiplexer les expériences (par exemple, dupliquer une expérience de type contrôle *versus* traitée ou faire une expérience avec un contrôle et trois points d'un traitement échelonné dans le temps). Depuis la première description de la méthode de quantification iTRAQ (Ross *et al.*, 2004), plusieurs articles scientifiques ont présenté l'utilisation de cette technique dans des études protéomiques effectuées sur divers types de cellules et de tissus. Notons finalement qu'un des inconvénients majeurs de cette stratégie

INTRODUCTION

est l'ajout massif de sels au cours de la réaction chimique de marquage qui peut devenir un handicap lors de l'analyse en spectrométrie de masse.

- AQUA

La technique des peptides AQUA™ (absolute quantification) permet de réaliser la quantification absolue de protéines contenues dans un échantillon biologique (Gerber *et al.*, 2003). Cette technique repose sur le principe du standard interne marqué par des isotopes stables qui est classiquement utilisé pour les méthodes de quantification par spectrométrie de masse. Un peptide natif issu de la digestion de la protéine à quantifier est tout d'abord sélectionné selon plusieurs critères pour représenter la protéine. Le peptide AQUA est un peptide synthétique qui possède la même séquence d'acides aminés que le peptide natif sélectionné mais qui comporte un acide aminé alourdi par plusieurs isotopes stables (¹³C, ¹⁵N, ²D) permettant d'augmenter la masse du peptide de 6 à 10 Da. Après la digestion tryptique de l'échantillon dans lequel est contenue la protéine à quantifier, le peptide AQUA est ajouté en quantité connue en tant que standard interne. L'échantillon est ensuite analysé par nano-chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (nanoLC-MS/MS). Le peptide natif et le peptide AQUA sont détectés au même temps de rétention et possèdent les mêmes propriétés d'ionisation mais sont facilement distingués en spectrométrie de masse par la différence de masse due au marquage isotopique. La quantité de peptide natif peut alors être déterminée à partir du rapport d'intensité observé entre le signal correspondant au peptide natif et le signal correspondant au peptide AQUA présent en quantité connue. Idéalement, un deuxième peptide AQUA peut être sélectionné pour confirmer la quantification.

- Label-free

Les stratégies dites « Label-free » reposent sur une absence totale d'incorporation de marqueurs, qu'ils soient chimiques ou métaboliques. Ces stratégies s'appuient sur l'analyse et le traitement des spectres obtenus par le spectromètre de masse lors de l'étude. Nous pouvons citer les deux grandes stratégies de Label-free que sont la stratégie « ions intensity » (Andersen *et al.*, 2003) et la stratégie « spectral count » (Liu *et al.*, 2004). La première permet de quantifier les peptides par l'intermédiaire de l'intensité relative des pics correspondant, alors que la seconde quantifie en fonction du nombre de spectres enregistrés pour un même peptide. Ces stratégies ont l'avantage d'être applicables à tous les types d'échantillons biologiques et de couvrir un large spectre de l'ensemble du protéome de ces échantillons. Cependant, plus on augmente la capacité de quantification (notamment par le spectral count), et plus on diminue la capacité d'identification, limitant par la même, la

couverture du protéome (Old *et al.*, 2005). Notons que l'application de telles stratégies de quantifications nécessite l'utilisation de spectromètres de masse de haute performance de type LTQ-Orbitrap ou FT-ICR. Enfin, plusieurs études récentes ont montré que les 2 méthodes de quantification par Label-free sont complémentaires (Wienkoop *et al.*, 2006, Wong *et al.*, 2008)

B. Apport de la protéomique dans l'analyse de la signalisation d'un récepteur membranaire

L'outil protéomique a permis d'apporter bon nombre de réponses aux questions sur le fonctionnement des systèmes biologiques (Cox and Mann, 2010). Dans le cadre du cancer, la protéomique a déjà permis d'obtenir de nombreuses données en terme de compréhension des protéomes cellulaires, mais aussi par l'identification de protéines présentant un intérêt en termes de diagnostic et de traitement. De plus, elle se focalise maintenant principalement sur l'étude approfondie des protéomes globaux mais également sur la description des réseaux d'interaction protéine-protéine menant à la progression tumorale (Hondermarck *et al.*, 2008). Récemment, une étude a employé la stratégie de 2D-DIGE pour analyser le sécrétome et le protéome des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 dans le but de découvrir de nouveaux marqueurs protéiques du cancer mammaire (Lai *et al.*, 2010). Une autre étude portant sur l'analyse d'une sous-fraction du protéome, le phospho-protéome, a appliqué la stratégie de quantification SILAC pour identifier les phosphoprotéines impliquées dans les phénomènes de résistance au Tamoxifen (Oyama *et al.*, 2011). La protéomique a également permis d'étudier les modifications post-traductionnelles de certaines protéines jouant un rôle clef dans la biologie des cellules cancéreuses mammaires. C'est le cas dans une publication portant sur les « signatures de modification » des histones, une fois de plus par la stratégie SILAC, dans différentes lignées cancéreuses mammaires (Cuomo *et al.*, 2010). Enfin, l'étude des différences du phospho-protéome des cellules cancéreuses mammaires *versus* cellules métastatiques a été réalisée par Label-free après une étape de purification des phosphoprotéines sur colonne de TiO₂ (Xie *et al.*, 2010). Nous pouvons constater que la majorité des études protéomiques dites « globales » est principalement orientée vers la découverte de nouveaux marqueurs de cancer. Cependant, d'autres publications font état de l'utilisation de stratégies protéomiques pour identifier les partenaires d'interaction de protéines spécifiques. C'est le cas des récepteurs ER α et ER β , sur lesquels les auteurs ont employé des techniques de purification d'affinité en tandem afin d'identifier leurs partenaires protéiques (Nassa *et al.*, 2011a, Nassa *et al.*, 2011b, Tarallo *et al.*, 2011).

INTRODUCTION

Depuis plus d'une dizaine d'années, notre laboratoire a très largement employé diverses stratégies protéomiques dans le cadre de la recherche sur le cancer du sein. Au début des années 2000, nous avons pu mettre en évidence les voies et mécanismes d'action du FGF2, responsables de la progression tumorale *via* son activité mitogène sur les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2000, Vercoutter-Edouart *et al.*, 2001). De plus, nous avons mis en évidence l'activation du NF- κ B dans les mécanismes de survie suite à un traitement au FGF2 (Vandermoere *et al.*, 2005). Concernant l'étude des partenaires de signalisation, nous avons pu identifier l'actine comme cible de Akt après immunoprécipitation et analyse par MALDI-TOF (Vandermoere *et al.*, 2007). D'autres voies de signalisation ont également pu être décrites comme les voies de survie et de prolifération du NGF (Descamps *et al.*, 2001b), ainsi que les voies d'invasion des cellules cancéreuses mammaires et de migration des cellules endothéliales du microenvironnement (Dolle *et al.*, 2005a, Dolle *et al.*, 2005b). Notons également que l'application d'une stratégie protéomique reposant sur la spectrométrie de masse a permis d'identifier la neurotrophine NGF dans le milieu conditionné des cellules cancéreuses mammaires, indiquant une production par ces cellules du facteur de croissance et menant à la mise en évidence d'une boucle autocrine (Dolle *et al.*, 2003). L'étude de la signalisation des récepteurs du NGF a conduit à l'identification, du Ku70 et du Ku86 comme partenaire de TrkA (Com *et al.*, 2007, Lagadec *et al.*, 2010), et de la protéine TRADD comme partenaire de signalisation de survie de p75^{NTR} (El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003). D'autres types d'études ont également été menés par le biais de stratégies protéomiques. Ce fût le cas lors de l'exploration du protéome global des cellules MDA-MB-231 réalisée par SILAC, couplée à une analyse par spectrométrie de masse de type LTQ-Orbitrap (Strande *et al.*, 2009). Cette analyse représente à ce jour le plus grand « screening » du protéome d'une lignée cancéreuse mammaire. Enfin, grâce aux outils protéomiques, nous avons également étudié les modifications post-traductionnelles de p53, et identifié un nouveau site d'acétylation par LC-MS/MS (Joubel *et al.*, 2009).

Toutes ces données tendent à montrer la place importante que prend la protéomique dans la recherche anticancéreuse, tant en terme de recherche de marqueurs diagnostique ou thérapeutique, qu'en terme de description des voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale.

OBJECTIFS DE LA THESE

OBJECTIFS

Contexte de la thèse

Comme nous venons de le voir, les neurotrophines sont impliquées dans de nombreux processus biologiques des cellules non neuronales et particulièrement dans les cancers où, *via* leurs récepteurs, elles favorisent ou empêchent la progression tumorale. Notre laboratoire a découvert et largement contribué à décrypter les actions de ces neurotrophines et récepteurs dans le cancer du sein. Ainsi, le NGF favorise la croissance, la migration et l'invasion des cellules *via* son récepteur TrkA (Lagadec *et al.*, 2009), alors que sa fixation sur le récepteur p75^{NTR} va induire la survie cellulaire (Descamps *et al.*, 2001b, El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003). Nous avons également montré que le NGF pouvait agir de façon paracrine sur les cellules endothéliales, favorisant ainsi l'angiogenèse (Romon *et al.*, 2010). Plus récemment, il a été montré que le proNGF pouvait également induire la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires mais cette fois-ci grâce à sa fixation sur la sortiline (Demont *et al.*, 2011, soumis). Nous avons également démontré que le NGF pouvait augmenter l'effet de survie de p75^{NTR} par l'intermédiaire de p21^{waf1} en induisant un arrêt du cycle cellulaire (Verbeke *et al.*, 2010). Enfin, le BDNF et la NT4/5 permettent aux cellules cancéreuses de sein de mieux résister à l'apoptose par l'intermédiaire du récepteur p75^{NTR} et aussi par la forme tronquée de TrkB, TrkB-T1 (Vanhecke *et al.*, 2011).

A la vue de ces résultats, il est donc clair que les neurotrophines ont une action pro-tumorale sur le cancer du sein. De plus, l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-NGF, anti-BDNF ou anti-NT4/5 inhibe la croissance tumorale dans des modèles de souris xénogreffées (Adriaenssens *et al.*, 2008, Vanhecke *et al.*, 2011).

Objectif de la thèse

De nos jours, les phénomènes de résistances aux drogues anticancéreuses sont au centre des préoccupations thérapeutiques et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques reste un sujet primordial de recherche. Dans le contexte de cancer mammaire, le récepteur p75^{NTR}, *via* l'action des neurotrophines, contribue à cette résistance, ce qui en fait un bon sujet d'étude dans la perspective d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques. Cependant, cela nécessite une connaissance approfondie des mécanismes d'action de ce récepteur. J'ai consacré mes travaux de thèse à l'étude de ce récepteur, tant au niveau de son impact sur le protéome des cellules cancéreuses mammaires que sur sa voie de signalisation de survie par la description de ses partenaires protéiques.

Grâce à un modèle de surexpression stable de p75^{NTR} et par une stratégie de protéomique, j'ai pu apprécier les modifications du protéome induites par le récepteur p75^{NTR} dans un contexte de mort cellulaire. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal international *The International Journal of Developmental Biology* intitulée : « **Proteome changes induced by overexpression of the neurotrophin receptor p75^{NTR} in breast cancer cells** » (sous presse) présentée dans la première partie des résultats. J'ai également étudié la signalisation de p75^{NTR} par la recherche de ses partenaires protéiques spécifiques à la condition de survie cellulaire. Pour ce faire, j'ai employé la stratégie TAP-tag. Ces travaux sont présentés dans la deuxième partie des résultats.

RESULTATS

RESULTATS

I- **ARTICLE : « Proteome changes induced by overexpression of the neurotrophin receptor p75^{NTR} in breast cancer cells »**

L'objectif de ces travaux est d'étudier l'impact de la surexpression du récepteur aux neurotrophines p75^{NTR} dans les cellules de cancer du sein. Pour ce faire, nous avons établi une lignée cellulaire MCF-7 surexprimant le récepteur p75^{NTR} et analysé son protéome par 2DE, suivi d'une analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF/TOF, en condition de stress apoptotique induit par TRAIL. Les résultats de ces travaux sont présentés dans l'article suivant qui a été soumis et accepté pour publication dans « *International Journal of Developmental Biology* ».

Proteome changes induced by overexpression of the neurotrophin receptor p75^{NTR} in breast cancer cells

Jean-Philippe Wilmet¹, Christophe Tastet¹, Emilie Desruelles¹, Nathalie Ziental-Gelus¹,
Vincent Blanckaert², Hubert Hondermarck^{1*} and Xuefen Le Bourhis¹

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

² EA-2160 MMS, University of Maine, BP 2045, 53020 Laval Cedex 9, France.

Running title: p75^{NTR} induced proteome changes in breast cancer cells.

Financial support: This study was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée 2009), le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et la Région Nord/Pas-de-Calais.

* **Correspondence to:** H. Hondermarck, INSERM U908, bâtiment SN3, University of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Phone: +33 (0)3 20434097. Fax: +33 (0)3 20434038. Email: hubert.hondermarck@univ-lille1.fr

Key words: Breast cancer / neurotrophin receptor p75^{NTR} / TRAIL / Proteomics

ABBREVIATIONS

5-FU: 5-Fluorouracil

BEX2: brain-expressed X-2

CK: cytokeratin

DEDD: death effector domain containing DNA bonding

HSP27: heat shock protein 27

MALDI-TOF/TOF: matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight/time of flight

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NGF: nerve growth factor

NRAGE: neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog

p75^{NTR}: p75 neurotrophin receptor

RPLP0: 60S acidic ribosomal protein P0

TNF: tumor necrosis factor

TRADD: TNF receptor-associated death domain

TRAIL: TNF-related-apoptosis-inducing-ligand

TRAF: TNF receptor-associated factor

ABSTRACT

Background: In breast cancer cells, the neurotrophin receptor p75^{NTR} acts as a prosurvival factor able to stimulate resistance to apoptosis, but its mechanism of action remains incompletely defined. In this study, we investigated the global proteome modification induced by p75^{NTR} overexpression in breast cancer cells treated by the pro-apoptotic agent tumor necrosis factor (TNF)-related-apoptosis-inducing-ligand (TRAIL).

Methods: p75^{NTR} was stably overexpressed in the MCF-7 breast cancer cells and the impact of a treatment by TRAIL was investigated in wild type *versus* p75^{NTR} overexpressing cells. Proteins were separated in two-dimensional electrophoresis, and regulated spots were detected by computer assisted analysis before identification by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry.

Results: In the absence of TRAIL treatment, p75^{NTR} did not induce any change in the proteome of breast cancer cells. In contrast, after treatment with TRAIL, fragments of cytokeratin-8, -18 and -19, as well as full length cytokeratin-18, were up-regulated by p75^{NTR} overexpression. Of note, spectrin alpha-chain and the ribosomal protein RPLP0 were induced by TRAIL, independently of p75^{NTR} level. Interestingly, the well known stress-induced protein HSP-27 was less abundant when p75^{NTR} was overexpressed, indicating that p75^{NTR} overexpression reduced TRAIL induced cell stress.

Conclusions: These data outline that overexpression of p75^{NTR} induces proteome modifications in breast cancer cells and provide information on how this receptor contributes in tumor cell resistance to apoptosis.

INTRODUCTION

Aside from being a powerful tool to identify new potential biomarkers in oncology, proteomics is increasingly recognized as a method to decipher the molecular mechanisms underlying cancer cell growth and metastasis (Collins *et al.*, 2009). In this context, a promising area of investigation is the analysis of growth factor receptor impact in cancer cells (Kolch and Pitt, 2010), with a double objective: to understand the basic mechanisms of cancer initiation and progression, and to subsequently delineate new therapeutic targets. In breast cancer, some information about the activity of oncogenic receptor proteins has been obtained through proteomics (Hondermarck *et al.*, 2008). This was illustrated for instance with the tyrosine kinase receptors FGFR and TrkA (Com *et al.*, 2007, Vercoutter-Edouart *et al.*, 2000), and mass spectrometry profiling can provide useful data for patient stratification based on expression/activation of specific receptors and regulated proteins (Hochgrafe *et al.*, 2010). A particularly relevant aspect for clinical applications is the definition of cellular modifications induced by growth factor receptor overexpression in breast cancer. As shown in the case of the tyrosine kinase receptor HER2/neu, which is overexpressed in about 10-20% of breast tumors, a better understanding of the modifications induced by the overexpression is a prerequisite for the development of targeted therapies such as herceptin/trastuzumab (Brufsky, 2010). Interestingly, proteomics can be used to gain information, at the global proteome level, on the molecular and functional modifications accompanying growth factor receptor overexpression in breast cancer cells.

The p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) is a transmembrane receptor and a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily which exerts diverse functions such as the stimulation of cell survival and differentiation during neuronal development (Schor, 2005). p75^{NTR} has no catalytic activity but recruits specific protein partners that bind intracellular Chopper and death domains (Blochl and Blochl, 2007) For instance, it has been reported that the neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog (NRAGE) binds the Chopper domain of

p75^{NTR} and the TNF receptor-associated factor 2 and 6 (TRAF2 and TRAF6) bind to the death domain (Blochl and Blochl, 2007). p75^{NTR} is not only expressed in nervous tissues, but also in non-neuronal tissues and in several cancers such as thyroid carcinoma (Rocha *et al.*, 2006), melanoma (Truzzi *et al.*, 2008), bladder (Tabassum *et al.*, 2003), prostate (Quann *et al.*, 2007), stomach (Jin *et al.*, 2007) and liver (Passino *et al.*, 2007) cancers. p75^{NTR} may have opposite functions according to tumor types. Hence, it has been described to exert a tumor-promoting activity by favoring survival and metastasis in brain, prostate cancer and melanomas (Marchetti *et al.*, 2004, Menter *et al.*, 1994, Quann *et al.*, 2007), while it has been proposed as a potential tumor suppressor in bladder (Tabassum *et al.*, 2003), stomach (Jin *et al.*, 2007) and liver (Passino *et al.*, 2007) cancers.

In breast cancer, we have previously shown that p75^{NTR} is expressed in the majority of breast tumors (Descamps *et al.*, 2001a), and preferentially in basal-like breast carcinomas (Reis-Filho *et al.*, 2006). The stimulation of p75^{NTR} leads to increased breast cancer cell survival and resistance to apoptosis, by promoting the activation of the transcriptional factors NF- κ B (Descamps *et al.*, 2001b) and p21^{waf1} (Verbeke *et al.*, 2010). Furthermore, the activation of NF- κ B requires the binding of TNF receptor-associated death domain protein (TRADD) on the death domain of p75^{NTR} (El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003) and the brain-expressed X-2 protein (BEX2), which binds the death domain of p75^{NTR}, plays a key role in the downstream NF- κ B activation (Naderi *et al.*, 2007). Despite these data on initial signaling activated by p75^{NTR} in breast cancer cells, there is no information on potential changes induced by p75^{NTR} at the proteome level.

In the present study, we have used a proteomic approach to investigate proteome modifications induced by p75^{NTR} in breast cancer cells. Breast cancer cell lines have been described to express lower levels of p75^{NTR} than breast tumor biopsies (14) and therefore we first stably overexpressed p75^{NTR} in the MCF-7 cell line to restore a p75^{NTR} level similar to *in vivo* expression. Overexpressing *versus* control cells were treated or not with the well known pro-apoptotic agent tumor necrosis factor (TNF)-related-apoptosis-inducing-ligand (TRAIL).

We then separated proteins of total cell lysate using two-dimensional electrophoresis and regulated proteins were identified by MALDI-TOF/TOF analysis. Several proteins that exhibited a different expression level when p75^{NTR} was overexpressed were identified, pointing to potential mechanisms used by this receptor to promote cell survival and resistance to apoptosis.

RESULTS

Establishment and validation of p75^{NTR} overexpressing cells. In order to investigate the impact of p75^{NTR} on the proteome of breast cancer cells, we overexpressed it in the MCF-7 cells. After cell transfection and selection, we first validated the p75^{NTR} overexpression at the mRNA level by Q-PCR (Fig. 2A). The amplification curves show an increase of 10 cycles between the +p75^{NTR} cells and control cells, indicating a 1000 fold increase of p75^{NTR} mRNA. The reference gene was found at the same level of expression between +p75^{NTR} and control cells (data not shown). The overexpression of p75^{NTR} was also observed at the protein level by Western blot (Fig. 2B). A well defined classical double band (Pincheira *et al.*, 2009, Unsain *et al.*, 2008) was observed around 70-75 kDa in the lane corresponding to +p75^{NTR} cells. We also observed here that the insertion of the empty vector did not affect the amount of endogenous p75^{NTR}. Furthermore, immunocytochemistry confirmed a higher level of p75^{NTR} in the +p75^{NTR} cells (Fig. 2C) as indicated by comparison of green intensity. Confocal analysis indicated that the overexpressed p75^{NTR} was correctly addressed to the cell membrane. Of note, green intensity observed between control cells and +p75^{NTR} cells is not proportionate because of different exposure times. Finally, the overexpression of p75^{NTR} did not modify the morphological characteristics of MCF-7 cells (Fig. 2D).

Proteome changes in p75^{NTR} overexpressing cells. Proteins from both +p75^{NTR} and control cells, treated or not with the pro-apoptotic agent TRAIL, were separated by 2-DE before analysis with PDQuest software. As indicated, two different extractions were

performed in order to avoid the biological bias, and two different gels were run for each extraction to eliminate the technical bias. So we obtained and analyzed by PDQuest a total of 16 gels perfectly reproducible (Fig. 3). A representative example of these gels is shown (Fig. 4). The spot distribution observed here is consistent and very similar to what was described for the MDA-MB-231 cells (Lottin *et al.*, 2002). Nearly 800 spots were obtained in the range of molecular weight 15-250 kDa and pI 4-7. Software analysis allowed the detection of 9 differential spots between the different experimental conditions (Fig. 4). These variations were induced either by TRAIL treatment or by the p75^{NTR} overexpression under TRAIL treatment. Figure 5 displays these variations with gel the magnification for spots of interest. For each spot, there are four pictures corresponding to the four conditions: “empty vector” cells, +p75^{NTR} cells, “empty vector” cells treated with TRAIL and +p75^{NTR} cells treated with TRAIL. On the PDQuest generated histograms, we can see four columns per condition, corresponding to the four technical replicates of each culture condition (Fig. 5). Mass spectrometry analysis, performed on a MALDI-TOF/TOF apparatus, allowed the identification of the 9 spots (Table 1). Representative mass spectra obtained for heat shock protein 27 are shown in Figure 6 and all spectra and information used for protein identification are in supplemental data. We observed three different cases: proteins induced by TRAIL treatment with no influence of p75^{NTR} (spectrin alpha-chain, the ribosomal protein RPLP0), proteins increased by p75^{NTR} under TRAIL stimulation (cytokeratin-8, -18, -19) and one protein less expressed with overexpression of p75^{NTR} under TRAIL treatment (HSP27).

DISCUSSION

The effects of p75^{NTR} on both apoptosis and cell survival was classically described in neuronal-like models such as PC12 cells, but proteome changes induced by p75^{NTR} have never been reported and our present study provides a pioneer investigation in this area. The first point that we have observed is that the sole overexpression of p75^{NTR} did not induce any

proteome modification by itself, whereas in case of a stress produced by the pro-apoptotic agent TRAIL, this overexpression induced several modifications. The requirement of an apoptotic stress for the induction of anti-apoptotic signaling from growth factor receptors has already been reported, and in breast cancer cells it has been shown with the activation of the serine/threonine kinase Akt following fibroblast growth factor receptor activation (Vandermoere *et al.*, 2005). Together, there are two different types of proteome changes that have been detected in this study: protein induced by TRAIL with no impact of p75^{NTR} overexpression and proteins regulated by p75^{NTR} overexpression under TRAIL treatment.

Proteins induced by TRAIL with no impact of p75^{NTR} overexpression. Spectrin is a cytoskeletal protein that lines the intracellular side of the plasma membrane of many cell types, forming a scaffolding and playing an important role in maintenance of plasma membrane integrity and cytoskeletal structure by binding short actin filament. It has been demonstrated that it can be cleaved by caspase-3 to give rise to a 150 kDa fragment (Williams *et al.*, 2003). Our study shows that a TRAIL treatment is able to induce the cleavage of spectrin in MCF-7 cells. It is interesting to note that this breast cancer cell line lacks caspase-3; the spectrin cleavage can nevertheless be performed by caspase-7, which is structurally and functionally close to caspase 3 (Liang *et al.*, 2001). Furthermore, it is well described that both intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis can lead to the cleavage of spectrin under a stress treatment (Kulkarni *et al.*, 2006). Spectrin fragment, which acts in tetramer complexes, also regulates the balance between calpains- and caspases-mediated cell death (Bignone and Baines, 2003). High concentration of alpha II spectrin fragment has been described to inhibit calpains but not caspases. However, the physiological significance of this calpain inhibition by spectrin fragment remains unclear. In our study, TRAIL induced spectrin cleavage, and this cleavage was not influenced by p75^{NTR} level. Spectrin cleavage is considered as an early marker of apoptosis and the fact that we observed the fragment under TRAIL treatment illustrates the initiation of apoptosis in breast cancer cells. Given that

p75^{NTR} overexpression had no impact on spectrin cleavage in our experiments, we can postulate that the anti-apoptotic activity of p75^{NTR} involves other intermediates.

RPLP0 is a structural subunit of the ribosomal complex, localized in both cytoplasm and nucleus, which is involved in mRNA translation. In our study, we found that RPLP0 is increased upon TRAIL treatment in both control and p75^{NTR} overexpressing cells. The RPLP0 mRNA is usually used as a reference gene in PCR or RT-PCR and has been widely used in mRNA quantification of cancer samples, including breast cancer cells (Lyng *et al.*, 2008). However, it has been shown that RPLP0 is not the more stable reference gene in breast cancer cells (McNeill *et al.*, 2007). Analysis by RT-PCR of a set of breast tumor mRNA extracts has shown that other genes are statistically more stable than RPLP0. Also, RPLP0 mRNA was found to be up-regulated in ovarian and endometrial tumors compared to control tissues (Artero-Castro *et al.*, 2011). To our knowledge, we are the first to show an upregulation of RPLP0 under stress induced by a pro-apoptotic agent, reinforcing the idea that RPLP0 should be used with caution as a reference for gene expression in cancers.

Proteins regulated by p75^{NTR} overexpression under TRAIL treatment. In this study, we identified the three well described cytokeratin (-8, -18 and -19) that are known to be involved in cell resistance to apoptosis and survival pathways. Cytokeratin-8 fragment and cytokeratin-18 fragment are known to form an heterodimere complex under stress condition (Waseem *et al.*, 2004). Cytokeratin-8, -18 and -19 and their fragments were found co-localized in cytoplasmic inclusion in MCF-7 cells under TRAIL-induced apoptosis (MacFarlane *et al.*, 2000). This may be a component of the cell death program required to prevent the spread of cell damage before removal of the apoptotic cell by phagocytosis. Death effector domain containing DNA binding protein (DEDD), a highly conserved and ubiquitous protein, exists predominantly as mono- or diubiquitinated. Ubiquitinated DEDD interacts with the K8/18 intermediate filament, in order to facilitate their degradation during apoptosis (Lee *et al.*, 2002). It has also been demonstrated that the complexes K8/K18 can sequester caspases and so decrease apoptosis (Lin *et al.*, 2008); this complex also acts as

a modulator of apoptotic pathways by controlling the trafficking of some receptors like FasR at the cell surface (Gilbert *et al.*, 2001). For cytokeratin-18, our study evidenced an increase of both, the full length protein and a fragment, when p75^{NTR} was overexpressed. That could therefore participate in the anti-apoptotic function of this receptor. A comparative study demonstrated that cytokeratin-8 could be involved in drug resistance mechanisms, and more precisely to the 5-FU resistance of MCF-7 cells, with a potential relation with 14-3-3sigma (Zheng *et al.*, 2010). Concerning cytokeratin-19 it has been reported that this protein can be secreted in the extracellular matrix and have a pro-metastatic effect (Alix-Panabieres *et al.*, 2009). The fragment of cytokeratin-19 identified in this study is described as Cyfra21-1, which is used as a biomarker of carcinomas that can be assayed in blood and urine (Dittadi *et al.*, 1996). This cytokeratin fragment, induced by caspases, can be found in some inclusion in the MCF-7 cells in TRAIL-induced apoptosis as reported for cytokeratin-8 and -18 (MacFarlane *et al.*, 2000). Together, our study confirms that cytokeratin regulations are induced during breast cancer cell apoptosis and that p75^{NTR} clearly interferes with this process. Precise analysis of cytokeratin distribution in breast epithelial cells was published in the early 90's with the demonstration that normal breast epithelial cells produce cytokeratins -5, -6, -7 and -17, whereas tumor cells produce mainly keratins -8, -18 and -19 (Trask *et al.*, 1990). This distribution was secondarily confirmed in tumor samples (Page *et al.*, 1999) and cytokeratin immunodetection is now eventually used at the clinical level to help discriminate benign from malignant cells on histopathological slides. It is interesting to note that p75^{NTR} overexpression upregulates cytokeratins -8, -18 and -19 that are overexpressed in tumor cells, and although there are various potential regulators of cytokeratin expression, our data reveal that p75^{NTR} can influence cytokeratin levels in breast cancer.

HSP27 is a cytoplasmic protein known to be involved in stress resistance and actin organization. Heat shock proteins such as HSP90, HSP70 and HSP27 are induced in response to a wide variety of physiological and environmental stress, including heat, reactive oxygen species or anticancer drugs, such as TRAIL, in order to protect cells from apoptosis (Zhuang *et al.*, 2010). HSP27 can activate protective pathways such as NF- κ B in

hepatocellular carcinoma cells (Guo *et al.*, 2009), and it is interesting to note that p75^{NTR} upregulates NF- κ B in breast cancer (El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003, Naderi *et al.*, 2007). In our case, p75^{NTR} is overexpressed and so NF- κ B might be activated without the necessity of HSP27 implication. HSP27 upregulation decreases the efficiency of Herceptin treatment by increasing Her2 protein stability in SK-BR-3 breast cancer cells (Kang *et al.*, 2008). It has also been reported that HSP27 can differentiate tolerogenic macrophages and may therefore support human breast cancer progression (Banerjee *et al.*, 2011). These macrophages lose the capacity to kill cancer cells but become extremely proangiogenic, inducing significant neovascularization, a process that is critically important for tumor development. In lung cancer, a down-regulation by siRNA of HSP27 sensitizes the cell to a TRAIL-induced apoptosis (Zhuang *et al.*, 2010). It has been shown that the expression of HSP27 is under the influence of the transcription factor Brn-3b in breast cancer cells (Fujita *et al.*, 2011). Interestingly, a recent report described that the transcriptional factor Brn-3b is regulated by the estrogen receptor- α and nerve growth factor receptors, through the activation of the MAPK pathway (Ounzain *et al.*, 2011). In our case, the down-regulation of HSP27 protein is correlated with the overexpression of p75^{NTR} under a TRAIL treatment and therefore our results suggest that p75^{NTR} overexpression decreases cellular stress, subsequently diminishing the necessity for HSP27 synthesis.

Conclusion. Our study is the first to identify the global proteome modification induced by the overexpression of p75^{NTR} in breast cancer cells. We found that p75^{NTR} can act on the modulation of several proteins. As p75^{NTR} has been shown to be overexpressed in breast tumors (Descamps *et al.*, 2001a), the proteome changes that we observed in our study could also occur *in vivo* and therefore impact the proteome content of breast tumors. In addition, breast cancer cells produce neurotrophins and the changes in proteome induced by p75^{NTR} overexpression that we report here may provide indications on the mechanisms at play in the neurotrophin-induced tumor cell resistance to apoptosis. Finally, our study emphasizes that

proteomics can be used to delineate the impact of membrane receptor overexpression in tumor cells, underlining the broad potential applications of this approach in oncology.

MATERIALS AND METHODS

The work-flow used in this study is presented in Figure 1.

Cell Culture. MCF-7 breast cancer cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and routinely grown as a monolayer. They were cultured in Minimal Essential Medium (MEM) (Gibco®) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% non-essential amino acids, 5 µg/ml insulin, 40 U/ml penicillin-streptomycin, 40 µg/ml gentamycin, at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Establishment of p75^{NTR} overexpressing cells. The p75^{NTR} expression vector (pCTAP-p75^{NTR}) was prepared by inserting the human p75^{NTR} cDNA (p75^{NTR}: NM_002507.3) into the pCTAP-A vector (Stratagene) between the restricted enzyme sites EcoRI and XhoI. Cell transfections were done using the Cell Line Nucleofector Kit V (Amaxa) according to the manufacturer's instructions. Cells were selected with 600 µg/ml G418 (Invitrogen), the resulting G418 resistant cell populations were stored as frozen stocks and used for all the experiments within 20 passages. Expression of p75^{NTR} was not modified with passages in culture as revealed by western blot analysis.

RT-PCR. Total RNA from MCF-7 breast cancer cells were isolated with RNeasy kit (Qiagen) followed by a DNase treatment. 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 p75^{NTR} 5'-ACGGCTACTACCAGGATGAG-3' and 5'-TGGCCTCGTCCGAATACGTG-3'. The

subsequent PCR conditions were carried out in the following manner: 95°C for 30 s, 58°C for 40 s and 72°C for 40 s. Data were analyzed using the MX4000 PCR system software (Stratagene) with the SYBRGreen option (including dissociation curves).

Western blot analysis. Protein extraction of subconfluent MCF-7 breast cancer cells was performed in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% NP-40, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 mM orthovanadate, 1% SDS, 1% protease inhibitors) 30 min at 4°C. Insoluble material was removed by centrifugation at 4°C for 20 min at 14,800 g after 6 min at 95°C. Total protein concentration was determined using BCA assay (Sigma). 30 µg of lysates were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel, transferred onto a nitrocellulose membrane (0.45 µm) in transfer buffer (48 mM Tris-Base, 39 mM Glycine, 0.04% SDS, 20% (v/v) methanol) and blocked for 1h at room temperature in Tris-buffered saline with Tween-20 (TBS-T) (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20) and 5% BSA (for actin) or skimmed milk (for p75^{NTR}). Incubation with primary antibodies (anti-actin: 1/10,000 and anti-p75^{NTR}: 1/2,000) was performed in blocking buffer overnight at 4°C. After washing with TBS-T, membranes were incubated with anti-rabbit IgG peroxidase antibody (Jackson laboratories, 1/10,000) for 1h at room temperature. The reaction was revealed using the kit West Pico chemiluminescent substrate (Pierce) and LAS-4000 mini from Fujifilm Life Science.

Immunofluorescence. p75^{NTR} overexpressing cells (+p75^{NTR}) and control MCF-7 cells were seeded onto type I collagen coated-glass coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde solution (20 min, 4°C). Cells were PBS washed and permeabilized 20 min at room temperature with a PBS solution containing 0.05% saponin and 50 mM NH₄Cl. After 2 PBS washes, cells were blocked 30 min in PBS, 0.05% saponin and 2% BSA. Primary rabbit polyclonal antibody against p75^{NTR} (1/500) was incubated with cells overnight at 4°C. After 6 PBS washes, the secondary donkey anti-rabbit AlexaFluor 488 antibody (Invitrogen, 1/4000 in blocking solution) was incubated for 1h at 37°C. In control experiments, cells were not

incubated with the primary antibody. After 6 washes, slides were mounted with Mowiol and cells were analyzed by ECLIPSE Ti-U Nikon fluorescent microscope and photographed.

Sample preparation for two-dimensional electrophoresis. Each culture condition had 2 independent extractions. MCF-7 breast cancer cells grown until 80% of confluence, were starved for 18h in MEM without FBS supplemented by 2 µg/ml of fibronectin and 30 µg/ml of transferrin, and then treated or not with the proapoptotic agent TRAIL for 3h at 5 ng/ml. After 2 washes with an isotonic buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl pH 7.5), cells were harvested in 1 ml of isotonic buffer per 100 mm Petri dish. Cells were centrifuged 5 min at 1,000 rpm and the volume of cell pellet was determined. Then, 1 volume of isotonic buffer was used to resuspend the cells plus 8 volumes of 1.25X concentrated lysis buffer (final concentration: urea 7 M, thiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 40 mM, spermine base 20 mM). After 30 min of incubation at room temperature, the lysate was centrifuged 15 min at 10,000 rpm to precipitate nucleic acids. The protein supernatant was then carefully collected and the protein concentration estimated using a Bradford-type protein assay (Bio-Rad). Finally, 0.5% by volume of carrier ampholytes 3-10 (Bio-Lyte® 3/10, Bio-Rad) was added, and protein aliquots (450 µg per sample) were stored at -80°C until use.

Two dimensional electrophoresis. For each condition, 2 independent two dimensional electrophoresis (2DE) gels were performed for each extraction. IEF was carried out using 18 cm IPG Strips pH 4–7 (Bio-Rad). IPG strips were reswollen 2 h in 345 mL DeStreak (Hydroxyethyl disulfide, GE Healthcare Bio-Sciences) rehydration solution and 0.5% v/v carrier ampholytes 3–10 (Bio-Lyte® 3/10, Bio-Rad). The samples (450 µg) were then cup-loaded near the anode of the IPG strips and focused in a Protean IEF cell (Bio-Rad) at a temperature of 20°C. The IPG strips were initially conditioned for 30 min at 250V (rapid voltage ramping), linearly ramped to 1000 V (1 h) and maintained at 1000 V for 1 h more. Then the electric voltage was slowly increased to reach 10 000 V in 1 h and focused at this voltage to give a total of 45 kVh. After focusing, the strips were equilibrated for 2x15 min in 6M Urea, 30% w/v glycerol, 2% w/v SDS, 0.125M Tris, 0.1M HCl, containing either 50mM

DTT (first equilibration step) or 150mM iodoacetamide (second equilibration step). The equilibrated IPG strips were sealed on top of 10% polyacrylamide gels (20 cm x 18.3 cm x 1 mm) and SDS-PAGE was conducted at 25 V for 1 h, followed by 9W/gel until the dye front reached the bottom of the gel. After migration, the gels were washed 3x5 min with ddH₂O and stained using Bio-Safe™ Coomassie (Bio-Rad) according to manufacturer recommendations.

Spot detection and quantification. The gels were first scanned on GS800 scanner (Bio-Rad). Spot detection, quantitation, and analysis were performed using the PDQuest™ 2-D Analysis Software, version 8.0 (Bio-Rad). Gels were grouped by treatment condition and each group processed using the same analysis parameters. Spot detection parameters were selected using the Spot Detection Wizard of PDQuest. Since the different groups of gels varied in degree of streaking, the spot detection parameters were optimized and applied across all gels. Limits were put on the horizontal and vertical radius of a spot to minimize the effect of streaking and maximize the number of spot detected. Other selections used in all analyses included the floating ball method for background subtraction, a pixel size of 5 x 5 for spot detection, and the power-mean for noise filtering. We used the manual matching function instead of automated routine for gel matching to obtain the highest gel matching. Spot detection and quantitation were determined after background subtraction and noise filtering.

In-gel protein digestion. The protein spots were excised manually and washed 5 times for 6 min with 100 µl water. Then the gel spots were soaked in acetonitrile and dried under vacuum before rehydration with a reduction buffer (ammonium bicarbonate 100 mM, DTT 10 mM) 1 h at 56°C and 5 min at room temperature. After removing this buffer, gel spots were incubated with an alkylation buffer (ammonium bicarbonate 100 mM, iodoacetamide 55 mM) 45 min at room temperature and protected from light. Then, protein spots were washed with a 25 mM ammonium bicarbonate buffer followed by acetonitrile and finally dried under vacuum. The gel pieces were re-swollen in 100 µl of 25 mM ammonium bicarbonate with 125

ng of Trypsin Gold (Mass spectrometry grade, Promega) 1 h on ice. The protein spots were incubated 12 h at 37°C after addition of 30 µl of 25 mM ammonium bicarbonate.

Mass Spectrometry analysis. The MALDI target plate (AnchorChip™, Bruker Daltonics) was covered with extracted peptides mixed up with α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid matrix (0.3 mg/ml in acetone:ethanol, 3:6 v/v). The molecular mass measurements were performed in automatic mode using FlexControl™ 3.3 software on an Ultraflex™ II TOF/TOF instrument and in the reflectron mode for MALDI-TOF peptide mass fingerprint (PMF) or LIFT mode for MALDI-TOF/TOF peptide fragmentation fingerprint (PFF). External calibration over a 1000-3200 mass range was performed using the $[M+H]^+$ monoisotopic ions of bradikinin 1-7, angiotensin I, angiotensin II, substance P, bombesin, and adrenocorticotrophic hormone (clip 1–17 and clip 18–39) from a peptide calibration standard kit (Bruker Daltonics). Briefly, an accelerating voltage of 25 kV, a reflector voltage of 26.3 kV and a pulsed ion extraction of 160 ns were used to obtain the MS spectrum. Each spectrum was produced by accumulating data from 800 laser shots. A maximum of five precursor ions per sample were chosen for LIFT-TOF/TOF MS/MS analysis. Precursor ions were accelerated to 8 kV and selected in a timed ion gate. Metastable ions generated by laser-induced decomposition (LID) were further accelerated by 19 kV in the LIFT cell and their masses measured in reflectron mode. Peak lists were generated from MS and MS/MS spectra using Flexanalysis™ 3.3 software (Bruker Daltonics). Parameters and thresholds used for MS peak picking were: Baseline subtraction, algorithm TopHat ; smoothing, Savitzky-Golay (width 0.2 m/z & 1 cycle); peak detection algorithm = SNAP; Signal to noise threshold = 6; Quality factor threshold = 50. Parameters and thresholds used for MS/MS peak picking were: Baseline subtraction, algorithm TopHat; Smoothing, Savitzky-Golay (width 0.15 m/z & 4 cycles); peak detection algorithm = SNAP; Signal to noise threshold = 3; Quality factor threshold = 30. Database searches, through Mascot 2.2.1 (Matrix Science Ltd, London, UK), using combined PMF and PFF datasets were performed against the UniProt 2010_10 (number of entries: 20253 in Homo sapiens Taxonomy) database via ProteinScape 2.1 (Bruker Daltonics). A mass

tolerance of 75 ppm and 1 missing cleavage site for PMF and MS/MS tolerance of 0.5 Da and 1 missing cleavage site for MS/MS search were allowed. Carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine residues were also considered. Relevance of protein identities was judged according to the probability based Mowse score calculated with a *P*-value of 0.05 ($p < 0.05$).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. S. Duban-Deweere for mass spectrometry analyses (Centre d'Analyse Protéomique de l'Artois). The mass spectrometry facilities used for this study were funded by the European Union (FEDER), the Fonds d'Industrialisation du Bassin Minier (FIBM), the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and l'Université d'Artois.

REFERENCES

- ALIX-PANABIERES, C., VENDRELL, J.P., SLIJPER, M., PELLE, O., BARBOTTE, E., MERCIER, G., JACOT, W., FABBRO, M. and PANTEL, K. (2009). Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Res* 11: R39.
- ARTERO-CASTRO, A., CASTELLVI, J., GARCIA, A., HERNANDEZ, J., CAJAL, S.R. and LLEONART, M.E. (2011). Expression of the ribosomal proteins Rplp0, Rplp1, and Rplp2 in gynecologic tumors. *Hum Pathol* 42: 194-203.
- BANERJEE, S., LIN, C.F., SKINNER, K.A., SCHIFFHAUER, L.M., PEACOCK, J., HICKS, D.G., REDMOND, E.M., MORROW, D., HUSTON, A., SHAYNE, M. *et al.* (2011). Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Res* 71: 318-27.
- BIGNONE, P.A. and BAINES, A.J. (2003). Spectrin alpha II and beta II isoforms interact with high affinity at the tetramerization site. *Biochem J* 374: 613-24.
- BLOCHL, A. and BLOCHL, R. (2007). A cell-biological model of p75^{NTR} signaling. *J Neurochem* 102: 289-305.
- BRUFISKY, A. (2010). Trastuzumab-based therapy for patients with HER2-positive breast cancer: from early scientific development to foundation of care. *Am J Clin Oncol* 33: 186-95.
- COLLINS, B.C., LAU, T.Y., O'CONNOR, D.P. and HONDERMARCK, H. (2009). Cancer proteomics--an evolving battlefield. Conference on Cancer Proteomics 2009: Mechanistic Insights, Technological Advances & Molecular Medicine. *EMBO Rep* 10: 1202-5.

COM, E., LAGADEC, C., PAGE, A., EL YAZIDI-BELKOURA, I., SLOMIANNY, C., SPENCER, A., HAMMACHE, D., RUDKIN, B.B. and HONDERMARCK, H. (2007). Nerve growth factor receptor TrkA signaling in breast cancer cells involves Ku70 to prevent apoptosis. *Mol Cell Proteomics* 6: 1842-54.

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.

DITTADI, R., BARIOLI, P., GION, M., MIONE, R., BARICHELLO, M., CAPITANIO, G., COCCO, G., CAZZOLATO, G., DE BIASI, F., PRATURLON, S. *et al.* (1996). Standardization of assay for cytokeratin-related tumor marker CYFRA21.1 in urine samples. *Clin Chem* 42: 1634-8.

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.

FUJITA, R., OUNZAIN, S., WANG, A.C., HEADS, R.J. and BUDHRAM-MAHADEO, V.S. (2011). Hsp-27 induction requires POU4F2/Brn-3b TF in doxorubicin-treated breast cancer cells, whereas phosphorylation alters its cellular localisation following drug treatment. *Cell Stress Chaperones*.

GILBERT, S., LORANGER, A., DAIGLE, N. and MARCEAU, N. (2001). Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J Cell Biol* 154: 763-73.

GUO, K., KANG, N.X., LI, Y., SUN, L., GAN, L., CUI, F.J., GAO, M.D. and LIU, K.Y. (2009). Regulation of HSP27 on NF-kappaB pathway activation may be involved in metastatic hepatocellular carcinoma cells apoptosis. *BMC Cancer* 9: 100.

HOCHGRAFE, F., ZHANG, L., O'TOOLE, S.A., BROWNE, B.C., PINESE, M., PORTA CUBAS, A., LEHRBACH, G.M., CROUCHER, D.R., RICKWOOD, D., BOULGHOURJIAN, A. *et al.* (2010). Tyrosine phosphorylation profiling reveals the signaling network characteristics of Basal breast cancer cells. *Cancer Res* 70: 9391-401.

HONDERMARCK, H., TASTET, C., EL YAZIDI-BELKOURA, I., TOILLON, R.A. and LE BOURHIS, X. (2008). Proteomics of breast cancer: the quest for markers and therapeutic targets. *J Proteome Res* 7: 1403-11.

JIN, H., PAN, Y., HE, L., ZHAI, H., LI, X., ZHAO, L., SUN, L., LIU, J., HONG, L., SONG, J. *et al.* (2007). p75 neurotrophin receptor inhibits invasion and metastasis of gastric cancer. *Mol Cancer Res* 5: 423-33.

KANG, S.H., KANG, K.W., KIM, K.H., KWON, B., KIM, S.K., LEE, H.Y., KONG, S.Y., LEE, E.S., JANG, S.G. and YOO, B.C. (2008). Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability. *BMC Cancer* 8: 286.

KOLCH, W. and PITT, A. (2010). Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 10: 618-29.

KULKARNI, K., SELESNIEMI, K. and BROWN, T.L. (2006). Interferon-gamma sensitizes the human salivary gland cell line, HSG, to tumor necrosis factor-alpha induced activation of dual apoptotic pathways. *Apoptosis* 11: 2205-15.

LEE, J.C., SCHICKLING, O., STEGH, A.H., OSHIMA, R.G., DINSDALE, D., COHEN, G.M. and PETER, M.E. (2002). DEDD regulates degradation of intermediate filaments during apoptosis. *J Cell Biol* 158: 1051-66.

LIANG, Y., YAN, C. and SCHOR, N.F. (2001). Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene* 20: 6570-8.

LIN, Y.M., CHEN, Y.R., LIN, J.R., WANG, W.J., INOKO, A., INAGAKI, M., WU, Y.C. and CHEN, R.H. (2008). eIF3k regulates apoptosis in epithelial cells by releasing caspase 3 from keratin-containing inclusions. *J Cell Sci* 121: 2382-93.

LOTTIN, S., VERCOUTTER-EDOUART, A.S., ADRIAENSSENS, E., CZESZAK, X., LEMOINE, J., ROUDBARAKI, M., COLL, J., HONDERMARCK, H., DUGIMONT, T. and CURGY, J.J. (2002). Thioredoxin post-transcriptional regulation by H19 provides a new function to mRNA-like non-coding RNA. *Oncogene* 21: 1625-31.

LYNG, M.B., LAENKHOLM, A.V., PALLISGAARD, N. and DITZEL, H.J. (2008). Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer* 8: 20.

MACFARLANE, M., MERRISON, W., DINSDALE, D. and COHEN, G.M. (2000). Active caspases and cleaved cytokeratins are sequestered into cytoplasmic inclusions in TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biol* 148: 1239-54.

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.

MCNEILL, R.E., MILLER, N. and KERIN, M.J. (2007). Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. *BMC Mol Biol* 8: 107.

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.

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.

OUNZAIN, S., BOWEN, S., PATEL, C., FUJITA, R., HEADS, R.J. and BUDHRAM-MAHADEO, V.S. (2011). Proliferation-associated POU4F2/Brn-3b transcription factor expression is regulated by estrogen through ER-alpha and growth factors via MAPK pathway. *Breast Cancer Res* 13: R5.

PAGE, M.J., AMESS, B., TOWNSEND, R.R., PAREKH, R., HERATH, A., BRUSTEN, L., ZVELEBIL, M.J., STEIN, R.C., WATERFIELD, M.D., DAVIES, S.C. *et al.* (1999). Proteomic

definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mammoplasties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12589-94.

PASSINO, M.A., ADAMS, R.A., SIKORSKI, S.L. and AKASSOGLU, K. (2007). Regulation of hepatic stellate cell differentiation by the neurotrophin receptor p75NTR. *Science* 315: 1853-6.

PINCHEIRA, R., BAERWALD, M., DUNBAR, J.D. and DONNER, D.B. (2009). Sall2 is a novel p75NTR-interacting protein that links NGF signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth. *EMBO J* 28: 261-73.

QUANN, E.J., KHWAJA, F. and DJAKIEW, D. (2007). The p38 MAPK pathway mediates aryl propionic acid induced messenger rna stability of p75 NTR in prostate cancer cells. *Cancer Res* 67: 11402-10.

REIS-FILHO, J.S., STEELE, D., DI PALMA, S., JONES, R.L., SAVAGE, K., JAMES, M., MILANEZI, F., SCHMITT, F.C. and ASHWORTH, A. (2006). Distribution and significance of nerve growth factor receptor (NGFR/p75NTR) in normal, benign and malignant breast tissue. *Mod Pathol* 19: 307-19.

ROCHA, A.S., RISBERG, B., MAGALHAES, J., TROVISCO, V., DE CASTRO, I.V., LAZAROVICI, P., SOARES, P., DAVIDSON, B. and SOBRINHO-SIMÕES, M. (2006). The p75 neurotrophin receptor is widely expressed in conventional papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 37: 562-8.

SCHOR, N.F. (2005). The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol* 77: 201-14.

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

TRASK, D.K., BAND, V., ZAJCHOWSKI, D.A., YASWEN, P., SUH, T. and SAGER, R. (1990). Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2319-23.

TRUZZI, F., MARCONI, A., LOTTI, R., DALLAGLIO, K., FRENCH, L.E., HEMPSTEAD, B.L. and PINCELLI, C. (2008). Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* 128: 2031-40.

UNSAIN, N., NUNEZ, N., ANASTASIA, A. and MASCO, D.H. (2008). Status epilepticus induces a TrkB to p75 neurotrophin receptor switch and increases brain-derived neurotrophic factor interaction with p75 neurotrophin receptor: an initial event in neuronal injury induction. *Neuroscience* 154: 978-93.

VANDERMOERE, F., EL YAZIDI-BELKOURA, I., ADRIAENSSENS, E., LEMOINE, J. and HONDERMARCK, H. (2005). The antiapoptotic effect of fibroblast growth factor-2 is mediated through nuclear factor-kappaB activation induced via interaction between Akt and IkappaB kinase-beta in breast cancer cells. *Oncogene* 24: 5482-91.

VERBEKE, S., MEIGNAN, S., LAGADEC, C., GERMAIN, E., HONDERMARCK, H., ADRIAENSSENS, E. and LE BOURHIS, X. (2010). Overexpression of p75(NTR) increases survival of breast cancer cells through p21(waf1). *Cell Signal* 22: 1864-73.

VERCOUTTER-EDOUART, A., LEMOINE, J., SMART, C.E., NURCOMBE, V., BOILLY, B., PEYRAT, J. and HONDERMARCK, H. (2000). The mitogenic signaling pathway for fibroblast

growth factor-2 involves the tyrosine phosphorylation of cyclin D2 in MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Lett* 478: 209-15.

WASEEM, A., KARSTEN, U., LEIGH, I.M., PURKIS, P., WASEEM, N.H. and LANE, E.B. (2004). Conformational changes in the rod domain of human keratin 8 following heterotypic association with keratin 18 and its implication for filament stability. *Biochemistry* 43: 1283-95.

WILLIAMS, S.T., SMITH, A.N., CIANCI, C.D., MORROW, J.S. and BROWN, T.L. (2003). Identification of the primary caspase 3 cleavage site in alpha II-spectrin during apoptosis. *Apoptosis* 8: 353-61.

ZHENG, G., PENG, F., DING, R., YU, Y., OUYANG, Y., CHEN, Z., XIAO, Z. and HE, Z. (2010). Identification of proteins responsible for the multiple drug resistance in 5-fluorouracil-induced breast cancer cell using proteomics analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 1477-88.

ZHUANG, H., JIANG, W., CHENG, W., QIAN, K., DONG, W., CAO, L., HUANG, Q., LI, S., DOU, F., CHIU, J.F. *et al.* (2010). Down-regulation of HSP27 sensitizes TRAIL-resistant tumor cell to TRAIL-induced apoptosis. *Lung Cancer* 68: 27-38.

Spot Number	Protein Name	Accession Number	MW (kDa)	PI	Score Mascot	Peptide Sequence (MS2)	Score MS2	Percentage of Coverage
0026	CK18 Fragment	P05783	20.2	5.0	241.8	KVKLEAEIATYRR KLEAEIATYRR RTVQSLEIDLSMRN RAQYDELARK	70.3 62.7 61.1 47.6	19.5
0208	CK8 Fragment	P05787	45	5.0	316.7	RASLEAAIADAEQRG RLEGLTDEINFLRQ KLSELEAALQRA	121.5 110.7 86.3	49.9
0209	CK8 Fragment	P05787	45	5.0	291.8	RASLEAAIADAEQRG RLEGLTDEINFLRQ KLSELEAALQRA	105.7 99.9 87.9	54.9
1210	CK18	P05783	47.9	5.2	212.7	RAQIFANTVDNARI RVLQIDNARL KVKLEAEIATYRR	100.7 76.9 35.0	45
1905	Spectrin Fragment	Q13813	150	5.2	400.7	KSDESGQALLAAGHYASDEVRE KALINADELASDVAGAEALLDRH KHQAFEELSANQSRV KHQALQAEIAGHEPRI	153.1 134.6 71.3 43.3	15.9
3110	HSP27	P04792	22.8	5.0	224.1	KLATQSNEITIPVFESRA RQDEHGYISRC RLFDQAFGLPRL	116.0 54.3 53.9	36.1
4012	CK19 Fragment	P08727	21.1	4.9	296.4	RQSSATSFGLGGGSRVF RVLQIDNARL RVLDELTLART	164.1 74.8 57.6	36.8
5105	RPLP0	P05388	34.3	5.6	306.8	KTSEFFQALGITTKI RAGAIAFCEVTFACNTGLGPEKT RVALSVETDYTEFPLAEKV	115.8 113.7 77.3	49.5
6106	RPLP0	P05388	34.3	5.6	348.0	RAGAIAFCEVTFACNTGLGPEKT RVALSVETDYTEFPLAEKV KTSEFFQALGITTKI KEDLTEIRDMLANIKV	123.6 106.9 89.1 28.4	65.9

Table 1 : Mass spectrometry identification of the proteins regulated by TRAIL and p75^{NTR} overexpression. This table sums up the principal information obtained by mass spectrometry to identify the proteins. Spot number, protein name, accession number, molecular weight, PI, mascot score, peptide sequence, MS2 score for each peptide and the global percentage of coverage sequence are indicated for each protein.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Work-flow used for studying the proteome changes induced by p75^{NTR} overexpression in breast cancer cells.

Figure 2: Validation of p75^{NTR} overexpression in MCF-7 breast cancer cells. A: Total RNA from MCF-7 breast cancer cells was isolated, reverse-transcribed and analyzed by Real Time-PCR. The amplification curves are shown for cells overexpressing p75^{NTR} (+p75^{NTR}) and the empty vector transfected cells as control. For +p75^{NTR} and control cells, the 3 different colors of the amplification curves represent triplicates. **B:** Protein extracts of “empty vector” and +p75^{NTR} were also analyzed by Western blot. **C:** Immunocytochemistry (upper lane) and confocal microscopy (lower lane) analysis of p75^{NTR} expression. For negative control, primary antibody was omitted. **D:** Microscopy analysis of +p75^{NTR} versus control cells.

Figure 3: Reproducibility of the 2DE strategy. A: The different technical replicates are listed with, for each of them, the number of detected spots by PDQuest (in red). E=Extraction and G=Gel **B:** Representative gel of each condition with, in the lower left corner, the mean spot number (M) for each condition and the standard deviation (SD) in percentage.

Figure 4: Representative 2DE gel obtained for +p75^{NTR} breast cancer cells. This gel was obtained as described in material and methods for +p75^{NTR} cells treated with TRAIL (5 ng/ml until 3 h), after a colloidal Coomassie Blue staining.

Figure 5: Differential proteins in +p75^{NTR} breast cancer cells and relative abundance. Gel quantitative analysis was performed with the PDQuest software. **A and D:** cytokeratin-18. **B and C:** cytokeratin-8. **E:** spectrin alpha-chain 2. **F:** heat shock protein 27. **G:** cytokeratin-19. **H:** 60S acidic ribosomal protein P0. Histograms were generated automatically by the PDQuest software for each spot of the analysis. Green columns are for “empty vector” conditions, red ones correspond to “empty vector” cells treated by TRAIL, blue columns are for +p75^{NTR} conditions and finally purple columns represents +p75^{NTR} breast cancer cells

treated by TRAIL. The bigger column represents the maximum spot intensity observed between the four replicates gels, and the other are expressed in function of this reference.

Figure 6: MALDI-TOF and MS-MS spectra corresponding to HSP27. Shown are MALDI-TOF (A) and MS-MS (B) spectra of spot number 3110 presented in Fig. 4. The spot was excised from the gel and trypsin-digested. After MALDI-TOF and database searching, 6 tryptic peptides matched with theoretical masses, leading to sequence coverage of 36%, provided a clear identification of HSP27 that was confirmed by sequencing of three peptides by MS-MS. The amino-acid sequence underlined once corresponds to the 6 tryptic peptides obtained in MS and the sequences underlined twice corresponded to the 3 peptides obtained in MS-MS (C).

Figure 1

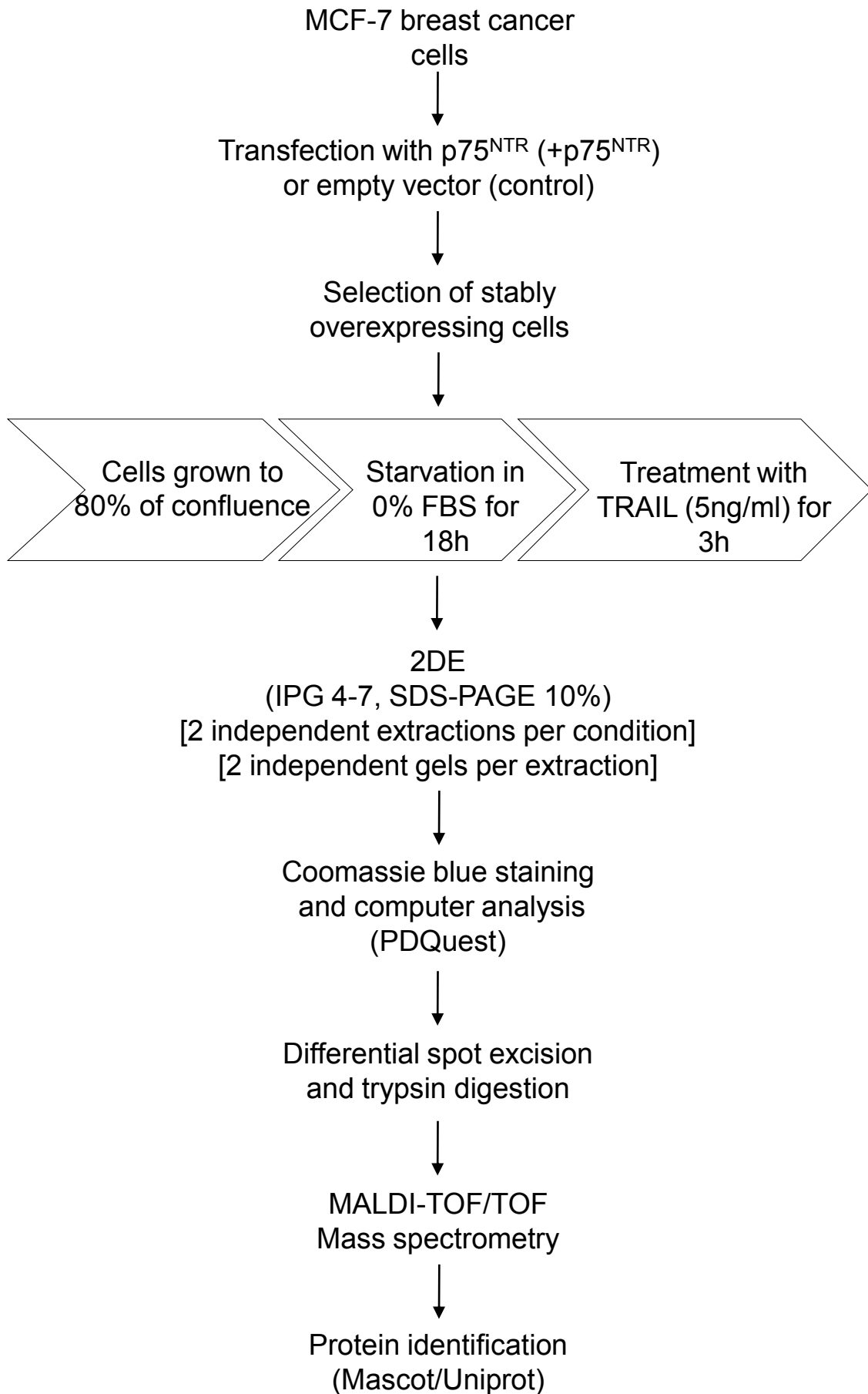


Figure 2

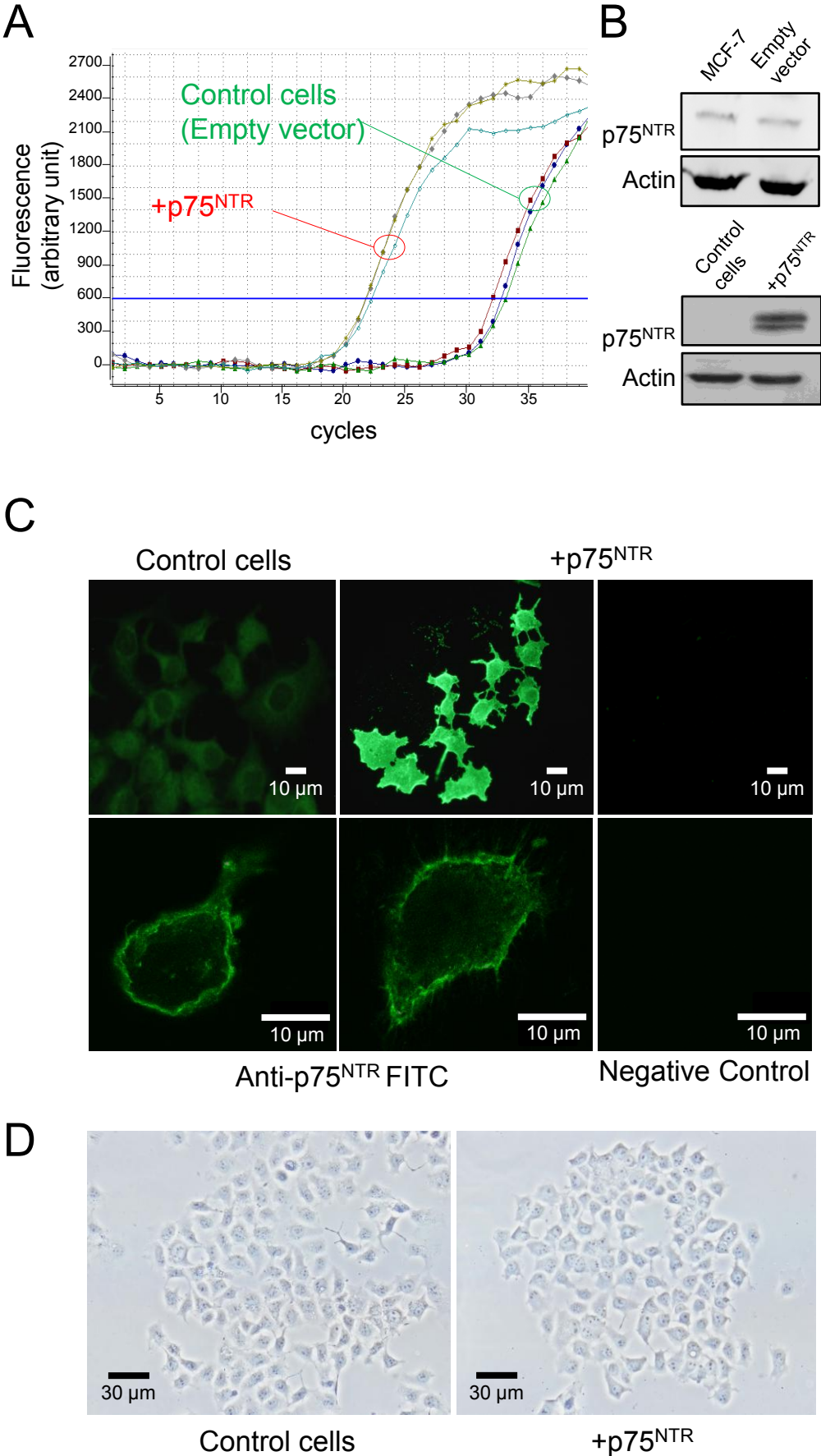
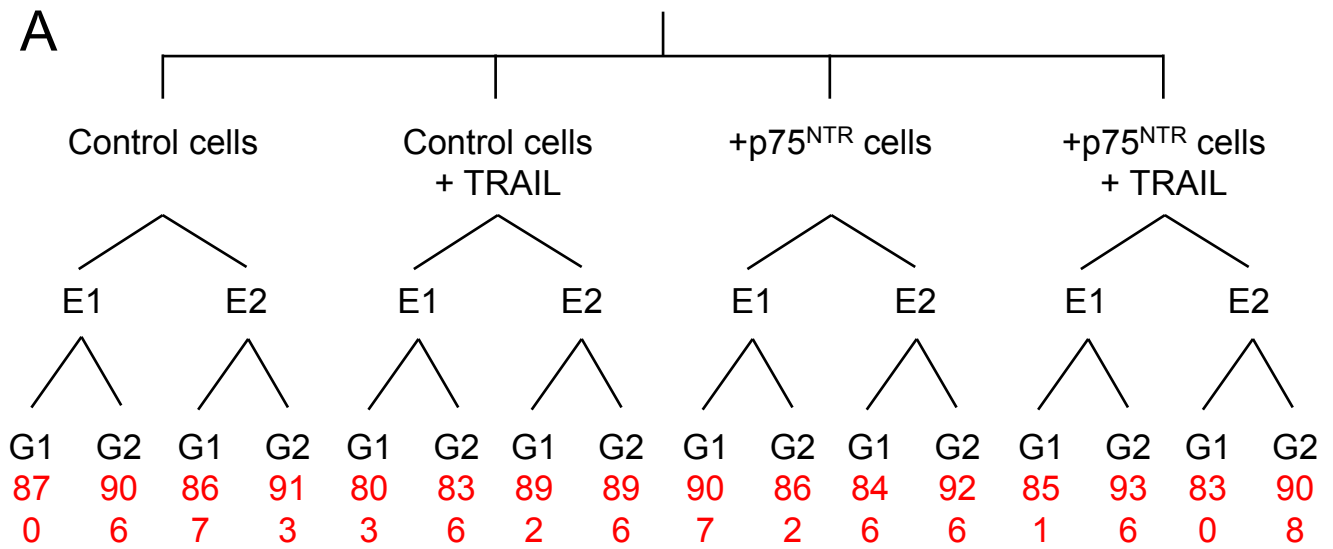


Figure 3

A



B

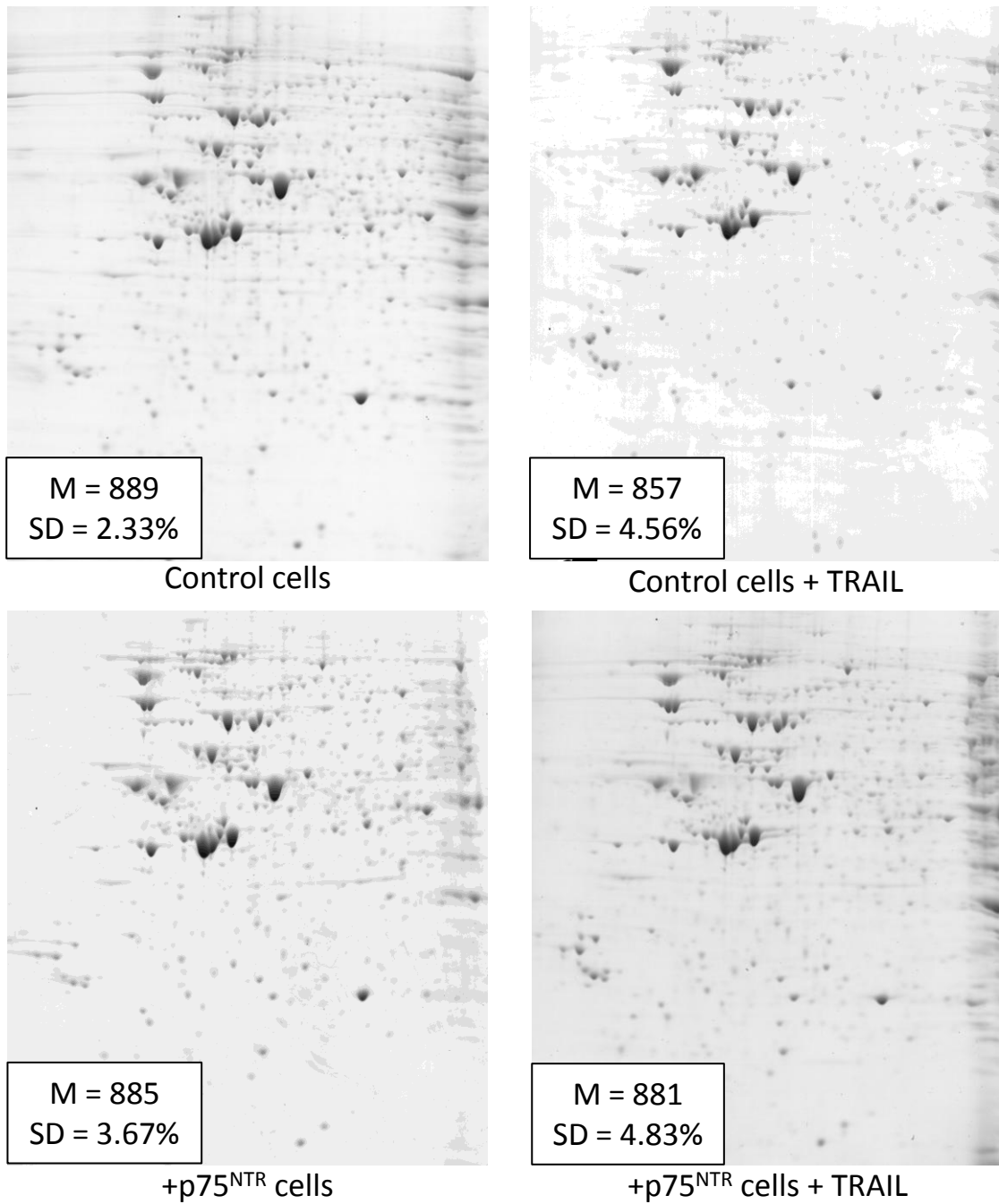


Figure 4

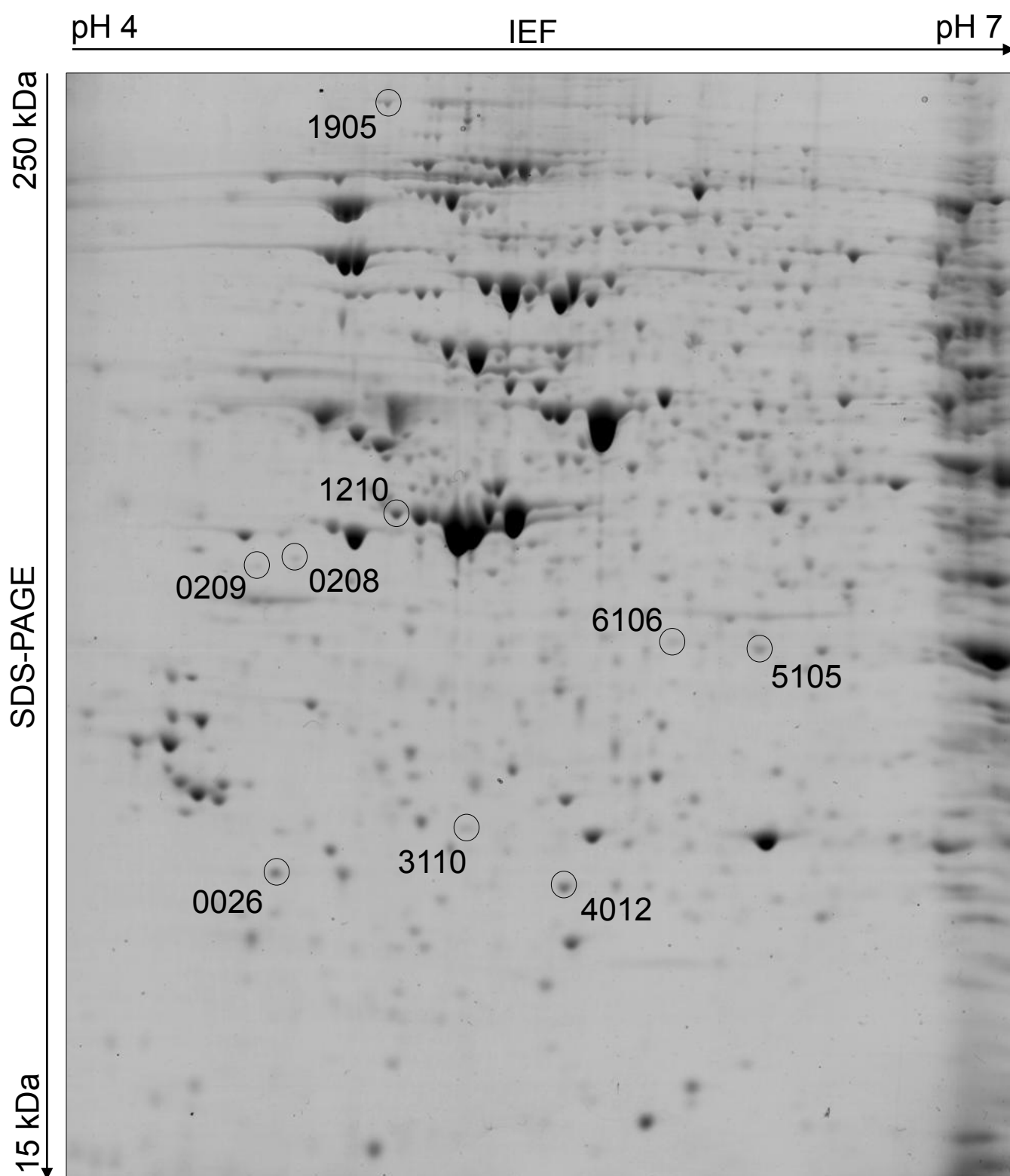
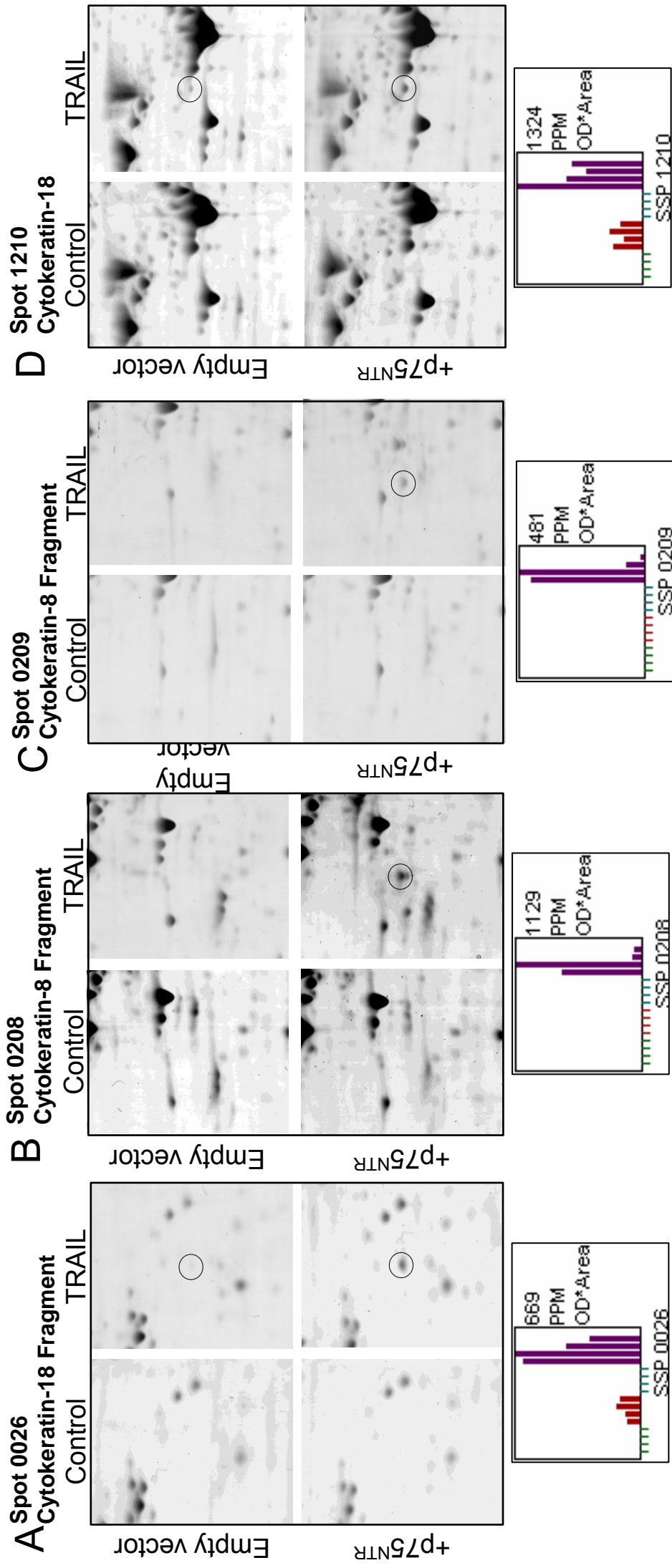


Figure 5



Wilmet *et al.*

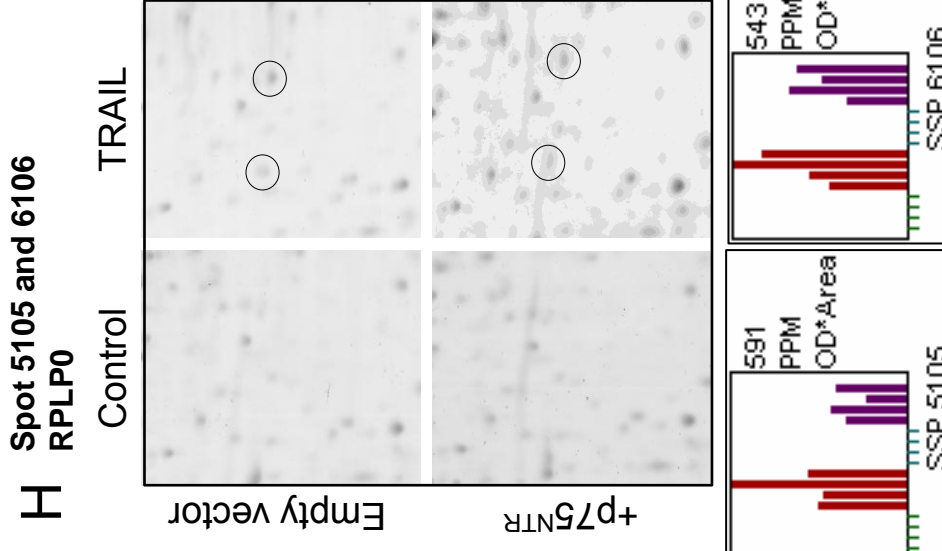
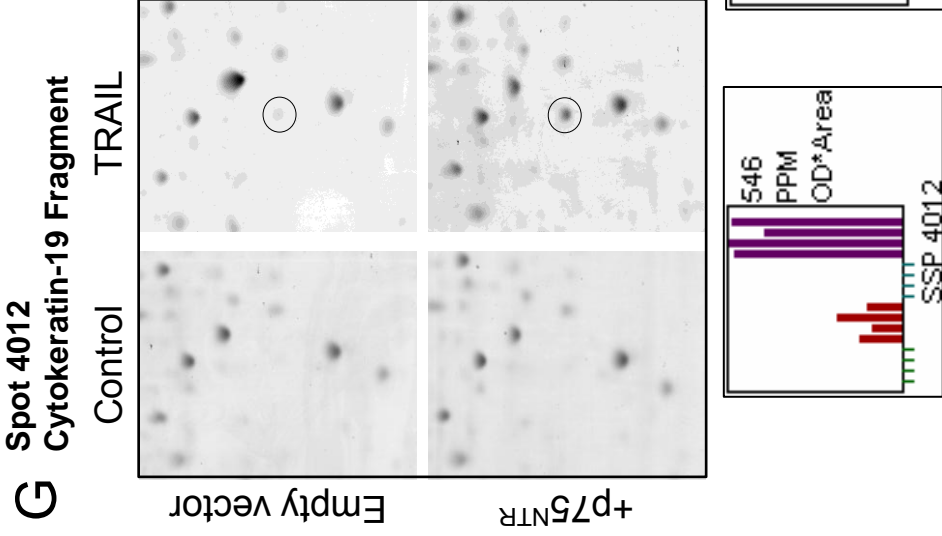
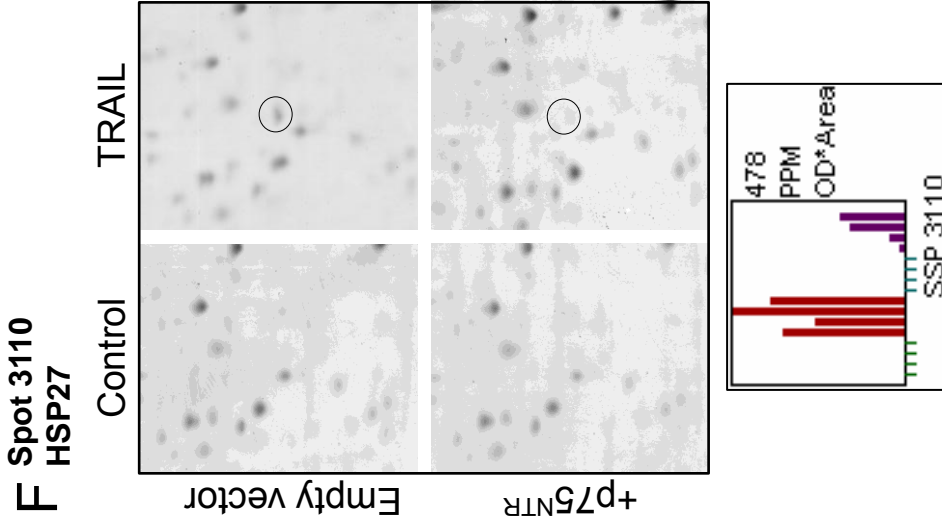
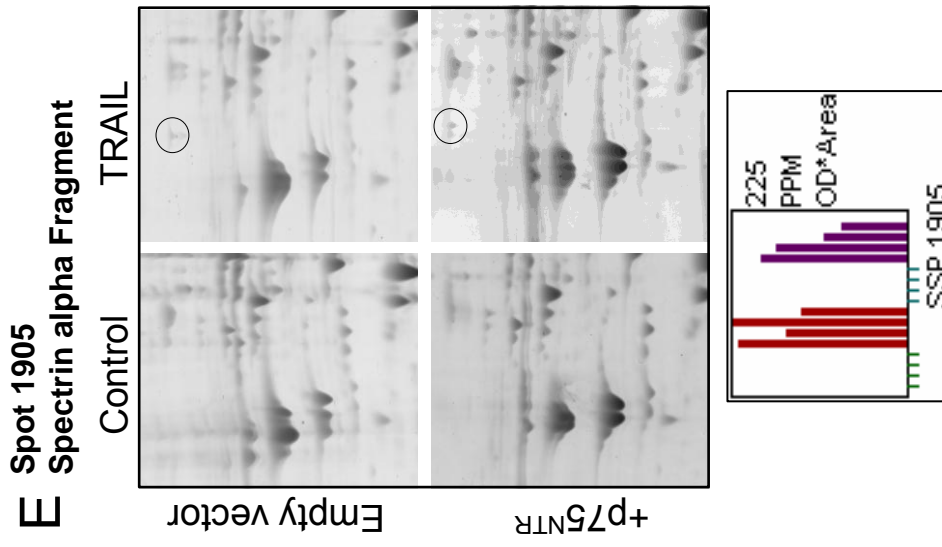
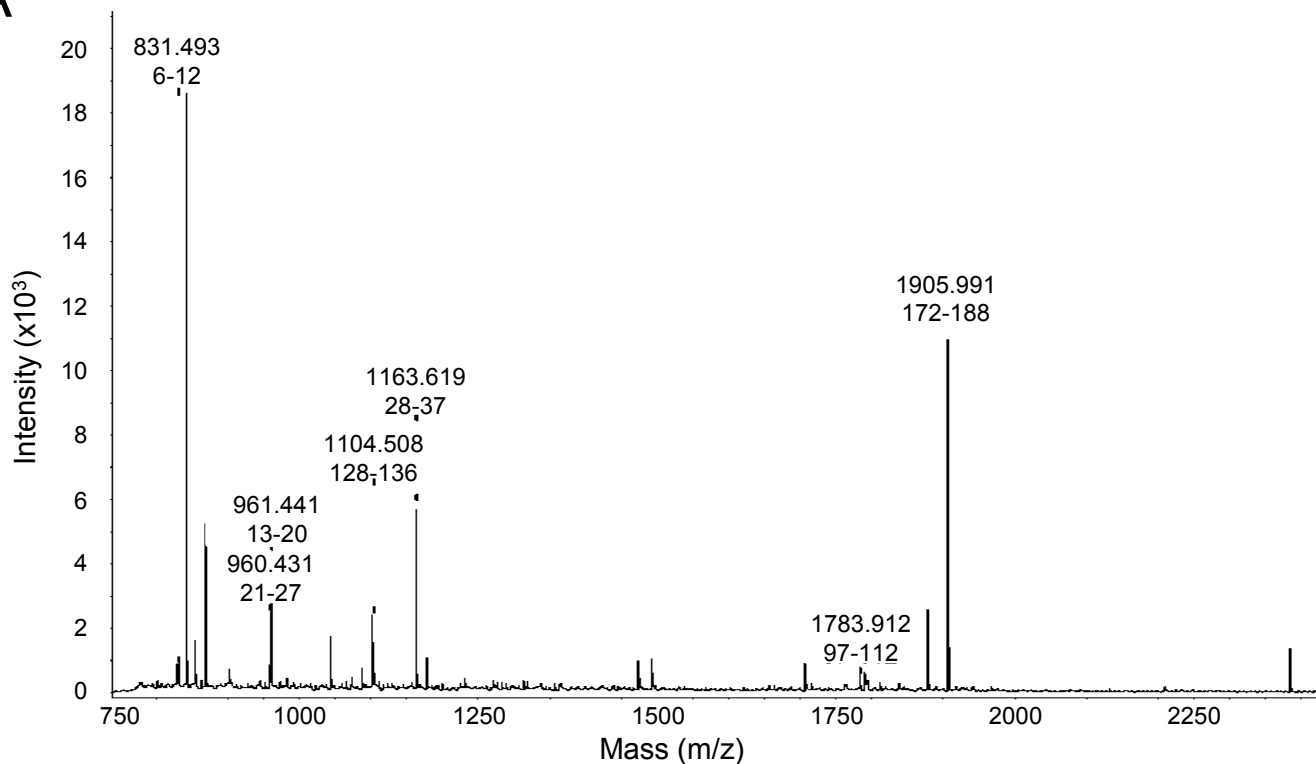
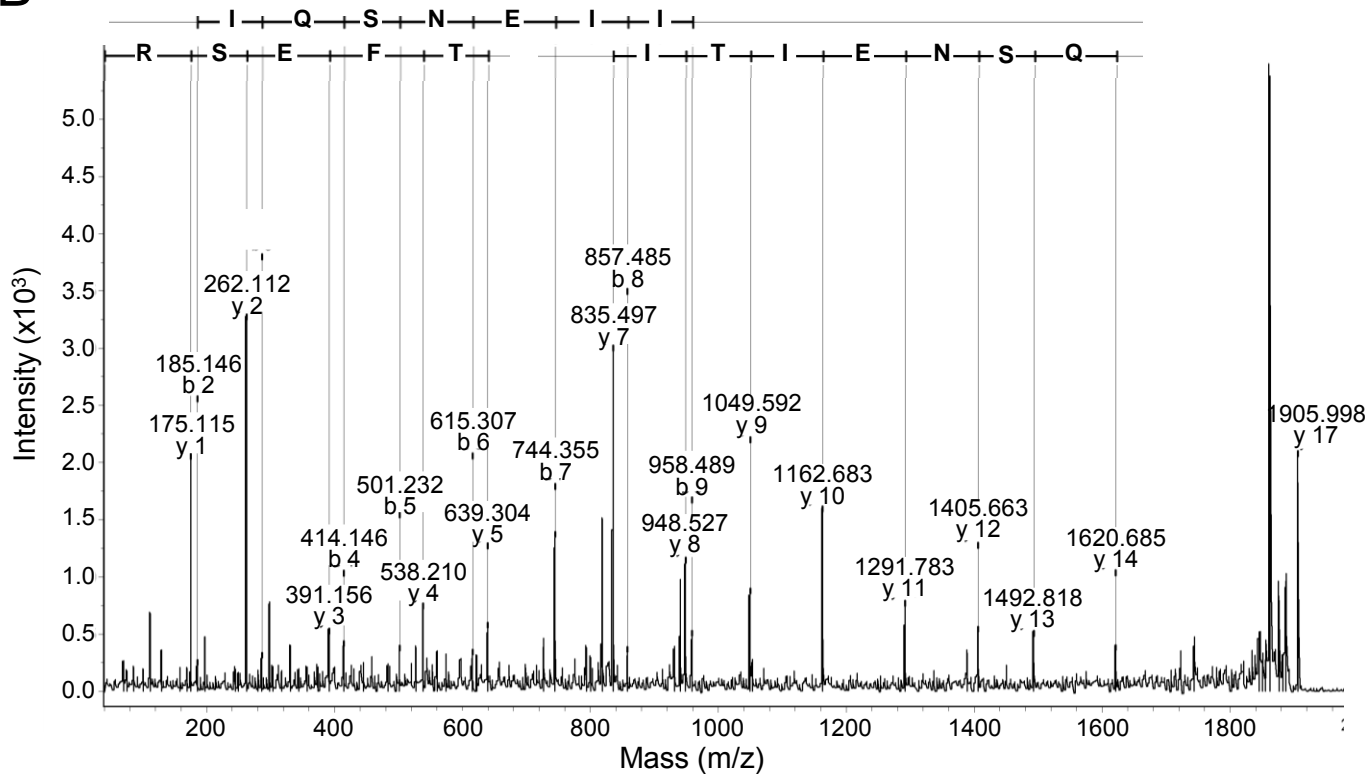


Figure 6

A



B



C

MTERRVPFSL ¹⁰LRGPSWDPFR ²⁰DWYPHSRLFD ³⁰QAFGLPRLPE ⁴⁰AWSQWLGGSS ⁵⁰WPGYVRPLPP ⁶⁰AAIESPAVAA
 PAYSRLSRQ ⁸⁰LSSGVSEIRH ⁹⁰TADRWRVSLD ¹⁰⁰VNHFAPELDT ¹¹⁰VKTKDGVVEI ¹²⁰TGKHEERQDE ¹³⁰HGYISRCFTR ¹⁴⁰
 KYTLPPGVDP ¹⁵⁰TQVSSLSLPE ¹⁶⁰GTLTVEAPMP ¹⁷⁰KLATQSNEIT ¹⁸⁰IPVTFERSAQ ¹⁹⁰LGGPEAAKSD ²⁰⁰ETAAK

Supplementary Data

Mass spectrometry data are listed here and follow this ranking:

- Spot 0026: Cytokeratin-18 fragment
- Spot 0208: Cytokeratin-8 fragment
- Spot 0209: Cytokeratin-8 fragment
- Spot 1210: Cytokeratin-18
- Spot 1905: Spectrin alpha fragment
- Spot 3110: HSP27
- Spot 4012: Cytokeratin-19 fragment
- Spot 5105: RPLP0
- Spot 6106: RPLP0

For each spot, the MALDI-TOF spectrum and the MS-MS spectra are shown, followed by sequence data and the spectrum-corresponding peak list. Several other information are also listed for each protein, such as the accession number, the database, chemical modifications, scores, molecular weight, pI, sequence coverage and the number of unique peptides (for MALDI-TOF only).

Ces Supplementary Data seront disponibles on-line sur le site web du journal "International Journal of Developmental Biology" (http://www.ijdb.ehu.es/web/).
--

RESULTATS

II- STRATEGIE CIBLEE : LE TAP-TAG

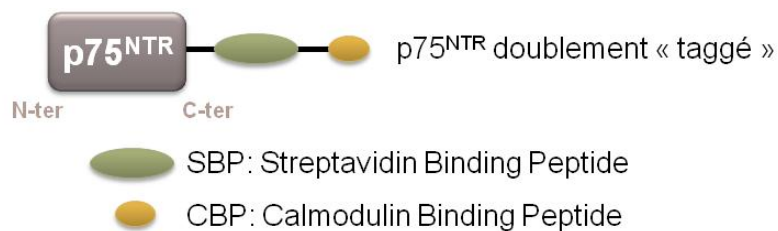
Dans cette dernière partie de mon travail, nous avons recherché les protéines partenaires de p75^{NTR} dans les cellules de cancer du sein en condition de survie.

A- Problématique et stratégie

Le but de notre étude est de décrypter la voie de signalisation de survie de p75^{NTR} par l'identification des partenaires associés requis pour sa signalisation. Pour cela, nous avons choisi une approche protéomique fonctionnelle : le TAP-Tag. Cet outil d'analyse protéomique, adapté de la technique dite de Rigaut (Rigaut *et al.*, 1999), nous permettrait de purifier les complexes protéiques p75^{NTR}/partenaires associés de façon plus aisée. En effet, le fait de surexprimer le récepteur p75^{NTR} facilite l'obtention d'une plus grande quantité de ce récepteur à la membrane plasmique. De ce fait, l'extraction de p75^{NTR} et l'obtention des complexes associés deviennent plus aisées et ainsi l'identification des protéines de ces complexes par spectrométrie de masse plus facile. Cette technologie basée sur une double chromatographie d'affinité nous permet également de nous affranchir de l'utilisation d'anticorps en immunoprécipitation. Il est connu que l'utilisation d'anticorps est à l'origine d'associations aspécifiques à ce dernier, elles-mêmes responsables de la présence de protéines contaminantes dans l'immunoprécipitat. Le TAP-tag a déjà été utilisé dans de nombreux modèles biologiques différents comme la levure (Dziembowski *et al.*, 2004), le cancer du poumon (Haura *et al.*, 2011, Kim *et al.*, 2011) ou le cancer du sein (Nassa *et al.*, 2011a, Tarallo *et al.*, 2011). De plus, la stratégie TAP-tag a récemment été employée pour l'étude de la signalisation de la protéine suppresseur de tumeur PTEN, impliquée dans l'apoptose des cellules (Maddika *et al.*, 2011). Il est intéressant de noter que la stratégie TAP-tag présente de nombreuses variations en terme de nature des « tags » utilisés (Drakas *et al.*, 2005). Cependant, notons que l'ensemble de ces travaux est effectué sur des protéines cytosoliques ou nucléaires. Il n'existe à ce jour que très peu d'articles relatant une stratégie TAP-tag sur une protéine membranaire (Li *et al.*, 2004). Ce constat fait de nos travaux une étude à la fois novatrice dans le domaine de l'étude d'une protéine transmembranaire, mais à la fois complexe à réaliser.

Le TAP-tag (Tandem Affinity Purification-tag ; Stratagene®) repose sur une surexpression de la protéine cible suivie de deux chromatographies d'affinité successives, permettant de purifier cette protéine ainsi que ses partenaires. Afin de permettre cette double purification, la protéine surexprimée, ici p75^{NTR}, possède un double marquage à l'aide de deux fragments peptidiques : SBP (Streptavidin Binding Peptide) et CBP (Calmodulin Binding Peptide). Deux options s'offraient à nous, à savoir « tagger » le récepteur en C-terminal ou en N-terminal. Bien que les tags soient de petite taille, un marquage en N-terminal aurait pu générer un

encombrement stérique engendrant ainsi un mauvais recrutement du ligand NGF. Dans l'optique de garder un récepteur fonctionnel et sensible au NGF, nous avons opté pour un marquage en C-terminal, dont les risques sont potentiellement de gêner le recrutement de certains partenaires protéiques. Les séquences des peptides « tag » sont présentées dans la Figure 19. Une fois la protéine p75^{NTR} doublement « taggée » surexprimée dans les cellules MCF-7, une extraction protéique en condition native est réalisée puis l'ensemble des protéines récupérées est passé sur une première colonne d'affinité constituée de billes de streptavidine. Grâce au « tag » SBP, les complexes p75^{NTR}/partenaires seront alors retenus dans cette colonne. Une élution de cette dernière est alors réalisée et les protéines récoltées sont ensuite introduites dans une seconde colonne d'affinité, cette fois-ci composée de billes de calmoduline. Lors de cette seconde purification sur colonne de billes de calmoduline, c'est le tag CBP qui permet de retenir les complexes d'intérêt.



SBP tag : MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQQQREPSGGCKLG
 CBP tag : KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL

Figure 19 : Structure du récepteur p75^{NTR} doublement « taggé » et séquences en acides aminés des « tags ». Les 2 « tags » SBP et CBP sont ajoutés en C-terminal du récepteur p75^{NTR}. Ces « tags » ont un poids moléculaire de 4,9 kDa et 2,8 kDa respectivement.

Il a déjà été montré par d'autres équipes que grâce à cette stratégie, il est possible de purifier et d'identifier, à la suite d'une analyse par spectrométrie de masse, des complexes protéiques de manière la plus spécifique possible (Puig *et al.*, 2001, Volkel *et al.*, 2010). Dans le cadre de notre étude, la séparation des complexes p75^{NTR}/partenaires en SDS-PAGE nous permettra d'identifier par spectrométrie de masse de type LC-MS/MS les protéines recrutées par p75^{NTR} lors de la signalisation de survie du récepteur dans les cellules cancéreuses mammaires.

RESULTATS

B- Matériels et méthodes

Lignée cellulaire : Pour cette étude, nous avons utilisé la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection). Les MCF-7 sont des cellules épithéliales qui proviennent d'effusions pleurales d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome du sein. Cette lignée hormono-sensible est bien caractérisée.

Culture des cellules : Les cellules cancéreuses sont entretenues dans des boîtes de culture de 75 cm² (Starstedt) où elles prolifèrent en monocouche dans un milieu complet. Ce dernier est composé d'EMEM (Eagle Minimum Essential Medium ; Lonza®) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Gibco Invitrogen Corporation®), 2 mM de L-glutamine, 1% d'acides aminés non essentiels et d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine 40 U/ml et gentamycine 40 µl/ml ; Cambrex). Les cellules sont cultivées dans une atmosphère humide à 37°C et enrichie à 5% de CO₂. Le milieu de culture est changé tous les deux jours et à pré-confluence (80%), les cellules sont décollées par addition d'une solution de trypsine / 0,25% EDTA, et réensemencées au dixième.

PCR et ajout des sites de restrictions : Le fragment d'ADNc de p75^{NTR} humain (à disposition dans le laboratoire dans un vecteur pIND) et codant la protéine entière est amplifié par PCR en utilisant des oligonucléotides contenant des sites de restriction compatibles avec les sites présents dans le vecteur final pCTAP. Les amorces utilisées en PCR sont les suivantes (les séquences colinéaires à la séquence de p75^{NTR} sont indiquées en italique) :

- Oligonucléotide 5' :

5' ATGC**GAATTC**ATGGGGGCAGGTGCC 3' 25 nucléotides

EcoRI

- Oligonucléotide 3' :

5' TCC**CTCGAG**TCGCACCGGGGATGTG 3' 25 nucléotides

XhoI

La PCR s'effectue dans un mélange contenant 100 ng d'ADN (vecteur pIND) auxquels sont ajoutés notamment les amorces spécifiques (10 ng chacune) ainsi que l'enzyme Phusion diluée au 1/100. Le cycle de la PCR est composé de la manière suivante : 10 secondes à 98°C (étape de dénaturation), 30 secondes à 50°C (étape d'appariement), et 45 secondes à 72°C (étape d'élongation). Ce cycle a été répété 34 fois pour une amplification totale de 35 cycles PCR. Grâce à ce protocole, nous nous attendons à obtenir un fragment amplifié de 1284 pb correspondant à la taille du cDNA de p75^{NTR}. L'amplifiat obtenu est alors cloné dans

le vecteur d'expression pCTAP (Stratagen®) par les coupures enzymatiques EcoRI et XhoI. L'ADNc de p75^{NTR} est inséré, grâce aux enzymes de restriction, de façon orientée, au niveau du multi-site de clonage (MCS) dans le plasmide pCTAP de sorte que le double « tag » SBP/CBP soit en C-terminal de p75^{NTR} (Figure 20).

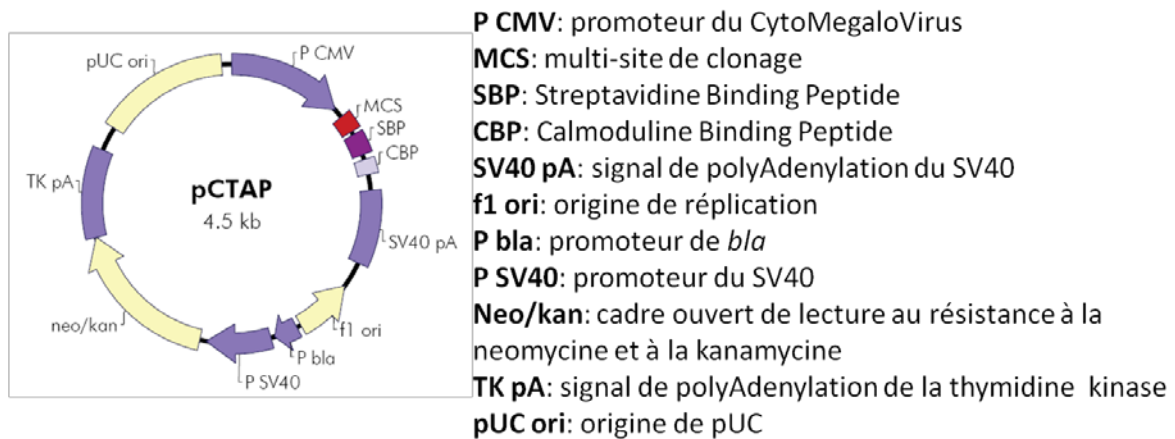


Figure 20. Carte du vecteur d'expression pCTAP. La séquence du récepteur p75^{NTR} est insérée au niveau du multi-site de clonage (en rouge) à l'aide des enzymes de restriction XhoI et EcoRI.

Amplification bactérienne : Afin de vérifier la bonne séquence de l'ADNc de p75^{NTR} doublement « taggé », une amplification du vecteur pCTAP-p75^{NTR} a été nécessaire. L'amplification du plasmide se fait en bactéries *Escherichia coli* compétentes. Cinq µl de plasmide sont mélangés à 25 µl de suspension bactérienne et laissés sur la glace 30 minutes. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique 1 minute 30 à 42°C puis immédiatement remises 2 minutes sur glace. Cinq cent µl de milieu LB liquide (10% Bacto-Tryptone, 5% NaCl, 5% extrait de levure) sont ajoutés et les bactéries sont mises à incuber 1 heure 30 minutes à 37°C. Les bactéries sont enfin étalées sur une boîte de milieu LB agar (15/1000ème) contenant l'antibiotique de sélection, ici la kanamycine (50 µg/l). Après une incubation d'une nuit à 37°C, une des colonies formées est ensemencée dans 10 ml de LB contenant la kanamycine et incubée une journée afin d'amplifier la colonie sélectionnée. Enfin, quelques gouttes de la suspension obtenue sont ajoutées à 100 ml de milieu LB liquide plus kanamycine et incubées sur la nuit à 37°C et sous agitation dans le but d'obtenir une grande quantité de ces bactéries contenant le vecteur d'expression pCTAP-p75^{NTR}, en vue de l'extraction plasmidique.

Extraction plasmidique et digestion enzymatique : L'extraction et la purification du plasmide sont réalisées à l'aide du Kit MidiPrep (Macherey-Nagel). En résumé, les bactéries sont culotées puis lysées. Après l'étape de neutralisation qui permet de stopper la lyse et de précipiter les protéines et l'ADN chromosomal, le tout est filtré et passé sur la colonne de purification. L'ADN plasmidique est ensuite élué et récupéré dans un tube de 15 ml. De

RESULTATS

l'isopropanol y est mélangé afin de précipiter l'ADN. Les plasmides sont alors sédimentés par centrifugation, le surnageant est éliminé puis le culot obtenu est lavé avec de l'éthanol 70° et transféré dans un tube eppendorf pour être centrifugé. Le surnageant est éliminé et le reste de l'éthanol est évaporé à l'air libre. Le culot est enfin repris dans 100 µl d'eau MilliQ et dosé par spectrométrie à 260 nm. Par la suite, le plasmide ainsi purifié va subir une digestion enzymatique afin de vérifier la bonne présence et la bonne taille de l'insert p75^{NTR}. Le mélange de digestion enzymatique avec les enzymes de restriction EcoRI et XhoI suit les proportions suivantes : 50 µl de solution plasmidique avec 2 µl de chaque enzyme de restriction. Cette digestion s'effectue pendant 1 heure et 40 minutes à 37°C. Enfin, le digestat subit une électrophorèse en gel d'agarose 1% pendant 40 minutes sous une tension de 100V. Le résultat du gel d'agarose est apprécié grâce au Chemidoc (excitation UV).

Séquençage de l'insert : Après extraction et purification, le séquençage du plasmide pCTAP-p75^{NTR} a été confié à la société Genoscreen (<http://www.genoscreen.fr/>) qui a réalisé un séquençage double brin de l'insert p75^{NTR}. L'insert étant d'une longueur voisine de 1300 pb, le séquençage est réalisé par chevauchement de 4 séquences obtenues à l'aide des amorces suivantes :

- T3 : 5' ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA 3'
- R2 : 5' CGT GCT GGC TAT GAG GTC TT 3'
- F1 : 5' GAG GCA CCT CCA GAA CAA GA 3'
- R1 : 5' CGG TGG TCT TCT CGT CCA T 3'

Transfection des cellules : La transfection est de type électroporation et est réalisée par le Nucleofector Amaxa™. Les cellules MCF-7 doivent atteindre une confluence de 60% avant la transfection. Les cellules sont décollées à la trypsine/EDTA puis comptées sur lame de Malassez. Deux millions de MCF-7 sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 100 µl de solution de nucléofection du kit V (Cell Line Nucleofector™ Solution V). A ces 100 µl de suspension cellulaire sont ajoutés 2 µg d'ADN plasmidique (pCTAP/p75^{NTR}) et 0,5 µg de vecteur contrôle GFP. Le tout est transféré dans une cuvette Amaxa qui est ensuite placée dans le Nucleofector™. Le programme d'électroporation adéquat pour les MCF-7 est sélectionné (E-014). Les cellules sont récupérées dans du milieu de culture à 10% de sérum chaud (37°C), puis sontensemencées soit dans une boîte de Pétri 100 mm contenant 10 ml de ce milieu également chaud, soit dans une flasque 75 mm². Les cellules doivent impérativement rester 24 heures dans le milieu complet avant tout traitement.

Nous avons établi et sélectionné une lignée surexprimant le récepteur chimérique p75^{NTR} comme précédemment décrit dans l'article. Rappelons ici que la surexpression a été validée à la fois par PCR quantitative (Figure 2A de l'article), par Western blot (Figure 2B de l'article) et par immunocytochimie (Figure 2C de l'article). Notons également que cette surexpression n'entraîne aucune modification morphologique de cellules MCF-7 (Figure 2D de l'article).

Extraction protéique : Nous avons utilisé le tampon de lyse du kit de Stratagene que ce soit pour les Western blots ou pour les extractions du TAP-tag. Bien que nous ne connaissions pas la composition de ce tampon de lyse, nous avons adapté le protocole de Stratagene de la manière suivante. Le milieu de culture est tout d'abord éliminé puis les cellules sont rincées 2 fois au PBS1X sur glace à 4°C. Après élimination du dernier rinçage, 200 µL de tampon de lyse (1 ml de tampon de lyse Stratagene + 10 µl de PIC + 10 µl de PMFS) sont ajoutés sur les cellules qui sont immédiatement placées à -80°C pendant au moins 1h. S'en suit une série de congélation / décongélation : -80°C pendant 20 min puis +4°C pendant 20 min et ce 3 fois de suite. Ces cycles favorisent la lyse des membranes plasmiques et donc l'extraction des protéines membranaires. Puis, les lysats cellulaires sont récoltés et clarifiés par centrifugation à 14800 g pendant 20 min. Le surnageant est alors transféré dans un nouveau tube et les extraits protéiques ainsi obtenus sont alors dosés par la méthode BCA (Sigma).

Western blot : Pour les Western blots, 30 µg d'extrait protéique sont déposés sur un gel à 10 % d'acrylamide, puis séparés par le protocole suivant : 180 V pendant 10 min et 200 V pendant 35 min. Les protéines sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm) dans le tampon de transfert (48 mM Tris-Base, 39 mM Glycine, 0,0375% SDS, 20 % (v/v) méthanol) et saturées pendant 1 h à température ambiante dans un tampon TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl et 0,1 % Tween-20)-Tween/Lait 3% (pour p75^{NTR}) ou dans un tampon TBS/BSA 5% (pour l'actine et TRADD). L'anticorps primaire est incubé à 4°C sur la nuit dans le tampon de saturation. Après 6 lavages de 8 min au TBS-Tween, les membranes sont incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dans le tampon de saturation (Jackson laboratories, 1/10000). Après une autre série de lavages (6 x 8 min au TBS-Tween), la révélation se fait à l'aide d'un kit de chemiluminescence (West Pico substrate, Pierce) et du LAS-4000 mini de Fujifilm Life Science.

Test de survie : Les cellules MCF-7 surexprimant p75^{NTR}, ont été sevrées puis induites en apoptose (grâce à 7,5 ng/ml de TRAIL), ou en survie (présence de l'apoptogène et de 200 ng/ml de NGF). Des conditions contrôles ont été également réalisées : traitement des cellules par le NGF seul ainsi que des cellules maintenues dans le milieu de sevrage et ne subissant aucun traitement apoptogène. Les cellules MCF-7 ont été traitées au TRAIL (TNF-

RESULTATS

related apoptosis-inducing ligand) durant 4 heures. A la fin du traitement, les cellules mortes en suspension dans le milieu de culture ont été récoltées puis ajoutées à l'ensemble des cellules décollées par trypsinisation, fixées 20 minutes à -20°C au Méthanol glacial, puis traitées 15 minutes à l'obscurité par le colorant de Hoechst (1/250^{ème}). Les cellules sont ensuite centrifugées pour être reprises dans un faible volume de PBS1X (40 μl) afin de visualiser les noyaux au microscope à fluorescence en UV. 400 noyaux en moyenne par puits de culture ont été comptés. Les figures caractéristiques des noyaux apoptotiques ont permis de déterminer le pourcentage d'apoptose.

Test de prolifération : Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits dans un milieu complet à raison de 50 000 cellules par puits. Après une nuit de sevrage sans sérum, les cellules sont traitées ou non au NGF à 200 ng/ml. Les cellules sont comptées tous les deux jours à la lame de Malassez et les traitements sont renouvelés également tous les deux jours. Chaque point est fait en triplicat et chaque puits est compté deux fois.

Test d'invasion/migration : Les cellules, préalablement sevrées une nuit dans un milieu sans SVF, sontensemencées (100 000 cellules par puits) dans des chambres de Boyden type Transwell. Ces Transwell sont coatés au collagène la veille : 4 μg par puits pour un test de migration et 40 μg par puits pour un test d'invasion. Les cellules sont alors soumises au traitement, ou non, dans la chambre inférieure (NGF à 200 ng/ml) par le chemoattractant. Après 6 h pour la migration ou 24 h pour l'invasion, les cellules sont fixées une nuit au méthanol glacial à -20°C . Après rinçage, la face supérieure du Transwell est nettoyée de toute cellule puis marquée au Hoechst 33258 (1 mM) pendant 20 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Les membranes sont ensuite montées entre lame et lamelle à l'aide de glycergel. Les cellules sont alors comptées au microscope à fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}}$: 345 nm et $\lambda_{\text{émission}}$: 478 nm). 15 champs au total sont comptés par puits, et chaque puits est réalisé en triplicat.

Test d'activité caspase-9. Après ensemencement et traitement des cellules surexprimantes TAP (NGF à 200 ng/ml et TRAIL à 5 ng/ml), les cellules sont trypsinisées et culotées avant d'être reprises dans 50 μl de tampon de lyse cellulaire du kit « Caspase-9 Colorimetric Assay Kit » (Enzo Life Science) pendant 10 minutes sur glace. Après centrifugation, le surnageant est transféré dans un tube neuf et la concentration protéique est calculée par dosage Bradford. Par la suite, 4 mM de substrat de la caspase-9 (LEDH-pNA) sont ajoutés à 200 ng de protéines et incubés à 37°C pendant 1h. L'activité de la caspase-9 est alors enregistrée par excitation du substrat à 405 nm. Chaque point d'analyse est réalisé en triplicat.

TAP-tag : Par millilitre d'extrait protéique sont ajoutés 4 μl d'EDTA et 0,7 μl de β -Mercapto-éthanol, afin de préparer les protéines à la double chromatographie. Tout d'abord, la résine

de streptavidine est préparée grâce à des étapes de lavage à l'aide du tampon SBB. La résine de streptavidine alors prête à l'emploi est ajoutée à l'extrait protéique. A la suite d'une incubation sur roue tournante à 4°C pendant 2 heures, les complexes p75^{NTR}/protéines associées sont alors fixés sur la résine de streptavidine. Après trois étapes de lavage au SBB, les complexes sont élués de la résine grâce au tampon SEB pendant 30 minutes à 4°C et sur roue. Les complexes protéiques sont récupérés dans le surnageant après une centrifugation de la résine (5 minutes, 1,5 g, 4°C). En parallèle, la résine de calmoduline est lavée avec du tampon CBB. Cette résine est ensuite ajoutée au surnageant contenant l'éluat de la colonne streptavidine. A la suite d'une nouvelle incubation de 2 heures à 4°C et sur roue, la résine de calmoduline contenant les complexes p75^{NTR}/partenaires subit des lavages à l'aide du tampon CBB. Après avoir éliminé le surnageant contenant le tampon de lavage CBB ainsi que les dernières protéines contaminantes, la résine est alors reprise dans 80 µl de tampon de Laemmli (62,5 mM Tris base ; 3% SDS ; 10% Glycérol ; 1% β-Mercapto-éthanol ; pH 6,8). Les protéines sont ensuite chauffées pendant 5 minutes à 100°C afin de les dissocier à la fois de la résine de calmoduline mais également entre elles.

SDS-PAGE et coloration : Afin de séparer les protéines des complexes p75^{NTR}/protéines associées, l'éluat issu de la double chromatographie est déposé sur un gel SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. La migration des protéines s'effectue sous une intensité de 15 mA pendant une heure suivie de 4 heures à 35 mA. Le gel est coloré à l'issue de cette migration. La coloration au bleu de Coomassie colloïdal suit une évolution linéaire et permet, par conséquent, les comparaisons quantitatives relatives. De plus, ce type de coloration est fortement compatible avec l'analyse en spectrométrie de masse. C'est pourquoi, à l'issue de la SDS-PAGE des protéines isolées par double purification, le gel est coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Les protéines sont fixées dans le gel une nuit par une solution contenant 50% d'éthanol et 1,5% d'acide orthophosphorique. Le gel est ensuite lavé deux fois 30 minutes avec une solution à 1,5% d'acide phosphorique, puis incubé pendant 30 minutes dans une solution d'imprégnation (85 ml d'éthanol, 75 g de sulfate d'ammonium et 11,8 ml d'acide phosphorique, QSP 500 ml d'eau mQ). Le gel est enfin coloré une nuit dans la même solution mais complétée de 1,5 g/500 ml de bleu de Coomassie colloïdal G-250 (Sigma®).

Digestion trypsique : Après coloration, les bandes protéiques sont excisées puis décolorées dans une solution composée à 50% d'acétonitrile et à 50% d'une solution d'ammonium bicarbonate à 100 mM pour être digérées par la trypsine qui digère les protéines par rupture des liaisons peptidiques après lysines et arginines. Ces bandes sont ensuite déshydratées par 3 bains d'acétonitrile pur puis séchées au « Speed vac » pendant 30 minutes. Les protéines contenues dans le gel subissent alors des réactions d'alkylation et de

RESULTATS

réduction avant d'être séchées de nouveau. Elles sont ensuite réhydratées sur la glace pendant 1 heure par 100 µl d'une solution de bicarbonate d'ammonium à 25 mM contenant 20 µg/ml de trypsine. L'excédent de la solution contenant la trypsine est aspiré, 30 µl (de quoi recouvrir les morceaux de gel) de la solution à 25 mM de bicarbonate d'ammonium sont ajoutés et le tout est placé 12 heures maximum à 37°C. Les solutions contenant les protéines digérées (sans les gels) sont récupérées dans des tubes Eppendorf puis séchées au « Speed vac » pendant 2 heures afin de récolter les peptides issus de la digestion trypsique.

Analyses par spectrométrie de masse : Le couplage du spectromètre de masse à une colonne de chromatographie de type Nano-LC C18 (Switchos®) permet de séparer les peptides en fonction d'un gradient d'hydrophobicité croissant avant leur entrée dans le spectromètre de masse. Cette dimension supplémentaire de séparation améliore la résolution du signal obtenu. De plus, la pré-colonne C18 permet de concentrer et de dessaler l'échantillon, ce qui évite une étape de dessalage à l'issue de la digestion trypsique. Ici, les digestats tryptiques séchés au « Speed vac » sont repris dans de l'eau acidifiée à 1% avant d'être injectés dans l'appareil de chromatographie liquide par un robot. A la sortie de la colonne de chromatographie, les peptides séparés sont directement dirigés vers une source d'ionisation nanoESI (ElectroSpray Ionisation), puis les ions générés sont analysés dans une trappe ionique en fonction de leur masse (m) et de leur charge (z). L'appareil (LCQ Deca XP Thermo-Electron) génère une première série d'ions identiques à ceux obtenus en « MS classique » (ions pères) qu'il fragmente en ions fils. Sans intervention de notre part, le système sélectionne lui-même l'ion le plus intense des trois derniers générés. Pour chaque ion père fragmenté, le système d'exploitation trace un « spectre de collision » où sont représentés tous les ions fils en fonction de leur rapport m/z . L'écart de masse entre deux ions fils consécutifs de la même série (x , y , z ou a , b , c) correspond à la masse d'un résidu d'acide aminé. Un logiciel permet de reconstituer les séquences en acides aminés des peptides fragmentés à partir des spectres de collision. Ces données sont enfin soumises à Mascot (www.matrix-science.com), base de donnée Sprot 0508 contenant 19294 séquences pour la taxonomie Homo sapiens, pour l'indentification des protéines, avec comme modifications autorisées la carbamidométhylation et les oxydations.

C- Résultats

1- Etablissement de cellules surexprimant p75^{NTR} « taggé »

Par PCR et à l'aide d'amorces spécifiques, nous avons pu amplifier la séquence de p75^{NTR} à partir du plasmide pIND. Le produit de cette PCR a ensuite été déposé sur un gel d'agarose pour visualiser le résultat (Figure 21). Nous constatons sur ce gel la présence d'une bande à environ 1300 pb, correspondant à la séquence de p75^{NTR} (1284 pb).

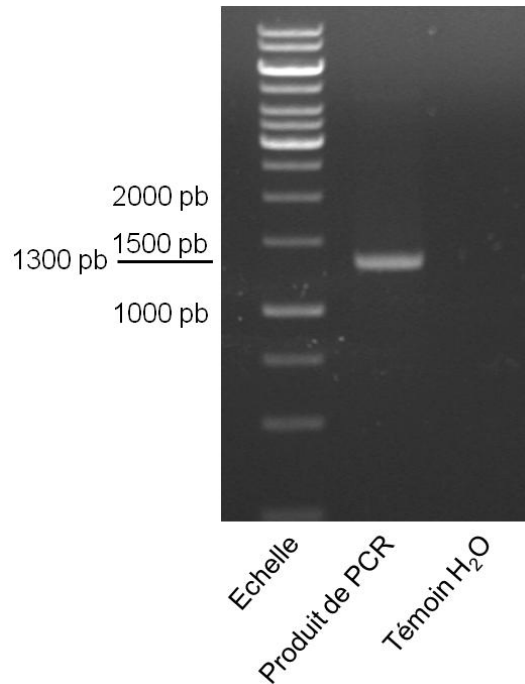


Figure 21. Electrophorèse en gel d'agarose du produit de PCR. Le produit de PCR correspond à l'amplification de la séquence de p75^{NTR} après 35 cycles de PCR. Le témoin H₂O correspond au contrôle négatif de l'expérience, à savoir sans matériel nucléotidique. La bande obtenue aux environs de 1300 pb correspond bien à p75^{NTR} (1294 pb).

De plus, en vue de l'insertion de cette séquence dans un vecteur d'expression, nous avons choisi d'utiliser des amorces d'amplification spécifiques qui ont la particularité d'ajouter en 5' et en 3' des séquences consensus d'enzyme de restriction. De ce fait, en plus d'amplifier la séquence, nous avons ajouté, grâce à ces amorces, les séquences consensus des enzymes EcoRI et XhoI. Ces sites spécifiques sont également présents dans le multi-site de clonage du vecteur d'expression final choisi, à savoir le pCTAP, afin de pouvoir faire une insertion dirigée et orientée dans ce vecteur. Donc, par digestion enzymatique (par EcoRI et XhoI) du vecteur pCTAP (pour le linéariser) et du produit de PCR, nous avons pu créer des extrémités cohésives spécifiques. Par la suite, une étape de ligation a permis de recirculariser le vecteur d'expression pCTAP avec désormais dans sa séquence celle du récepteur p75^{NTR}. Le nouveau vecteur d'expression pCTAP/p75^{NTR} a été amplifié dans des bactéries

RESULTATS

compétentes en présence de kanamycine (antibiotique de sélection). Pour contrôle, nous avons effectué une PCR sur les colonies que nous avons obtenues afin de nous assurer que l'étape d'insertion de la séquence de p75^{NTR} dans le vecteur d'expression pCTAP s'était convenablement déroulée (Figure 22).

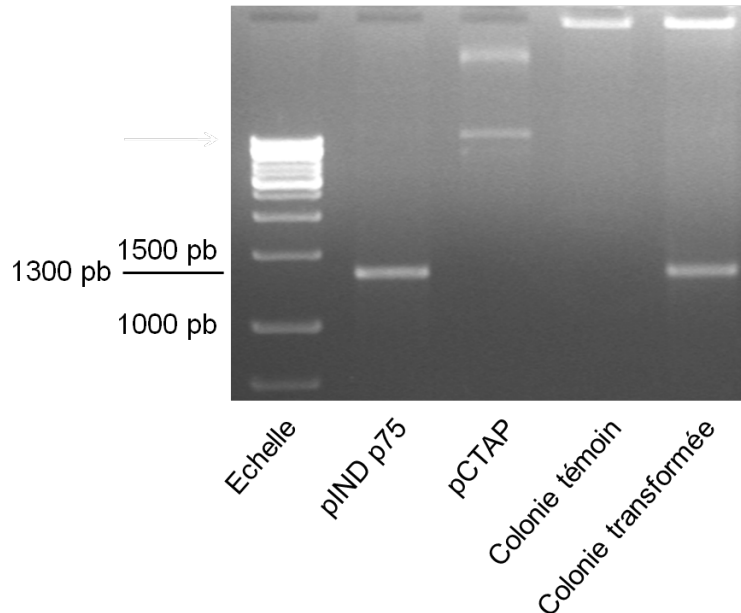


Figure 22. Electrophorèse en gel d'agarose sur les produits de PCR avec les amorces de p75^{NTR} sur les colonies transformées. Comme précédemment, la PCR est effectuée sur 35 cycles. Le pIND p75, le vecteur d'origine à notre disposition, sert ici de contrôle positif. Le vecteur pCTAP et la colonie témoin (non transformée) servent de contrôle négatif à la PCR. Nous constatons la présence d'une bande correspondant à p75^{NTR} dans la colonie transformée et résistante à l'antibiotique.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 22, les colonies transformées portent bien la séquence du p75^{NTR}, identique à celle issue du vecteur pIND. Ceci nous indique que nous avons maintenant à notre disposition un vecteur d'expression (pCTAP/p75^{NTR}) contenant la séquence de notre récepteur mais aussi les séquences de deux « tags » nécessaires à son marquage. De plus, le séquençage de l'insert a été confié à la société Genoscreen (<http://www.genoscreen.fr/>). Les résultats de ce séquençage double brin n'ont montré aucune mutation ou modification de séquence de l'insert (Figure 23). Nous avons donc le vecteur pCTAP contenant la bonne séquence et la bonne orientation du récepteur humain p75^{NTR} à notre disposition.

RESULTATS

Suite à la transfection transitoire du vecteur d'expression pCTAP/p75^{NTR} dans les cellules MCF-7, l'expression du récepteur « taggé » a été vérifiée par Western blot (Figure 6).

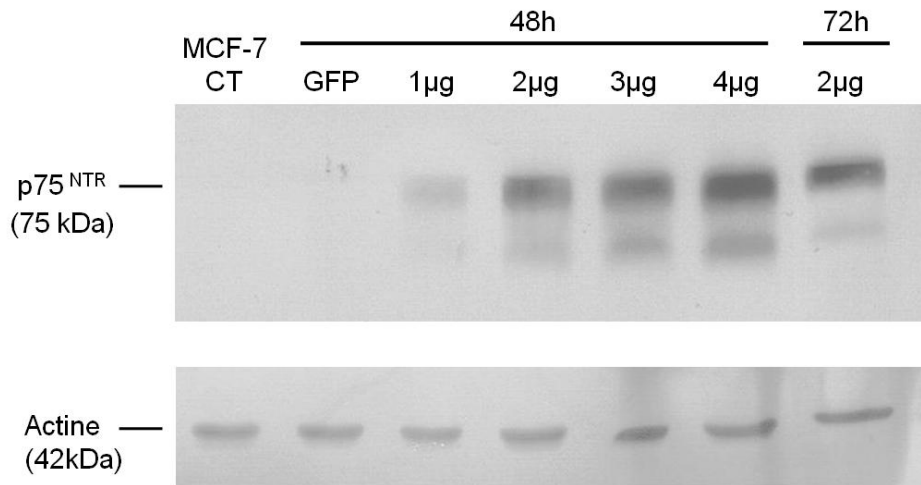


Figure 24. Analyse de l'expression de p75^{NTR} par Western blot. Les cellules MCF-7 sont transfectées par différentes concentrations de plasmide pCTAP/p75^{NTR} (et par un vecteur pMaxGFP exprimant la GFP pour contrôle négatif) par électroporation (Amaxa). L'expression de p75^{NTR} est également observée à différents temps (48h et 72h) après transfection. L'actine sert de contrôle d'équilibrage au Western blot.

Nous pouvons observer sur la figure 24 que le récepteur p75^{NTR} est parfaitement surexprimé par le vecteur pCTAP/p75^{NTR} et ce de manière dose dépendante. De plus, nous conservons une forte surexpression 72 h après transfection. Nous pouvons également noter la présence d'une deuxième bande aux alentours de 65-70 kDa qui pourrait correspondre à une forme non mature de la protéine surexprimée.

L'établissement d'une lignée surexprimant p75^{NTR} est décrit dans notre article (cf. page 108). Brièvement, nous avons confirmé la surexpression de p75^{NTR} au niveau ARN par PCR quantitative et au niveau protéique par Western blot (Figure 2A et 2B de notre article). Nous avons pu constater que la quantité de p75^{NTR} est identique entre les cellules MCF-7 natives et les stables contrôles MOCK, ce qui nous indique que l'insertion du vecteur vide pCTAP n'a aucun impact sur l'expression du récepteur. Enfin, nous avons également validé la surexpression et la localisation de notre protéine chimérique surexprimée stablement par immunocytochimie (Figure 2C de notre article).

2- Influence de la surexpression de p75^{NTR}

Après avoir construit et validé l'outil plasmidique ainsi que construit et validé la lignée cellulaire surexprimant stablement le récepteur « taggé » p75^{NTR}, nous avons étudié différents effets biologiques pour savoir si cette surexpression avait un impact sur ceux-ci.

Tout d'abord, nous avons déterminé si la surexpression de p75^{NTR} dans les cellules MCF-7 pouvait avoir un impact sur la prolifération cellulaire, avec ou sans traitement au NGF (Figure 25).

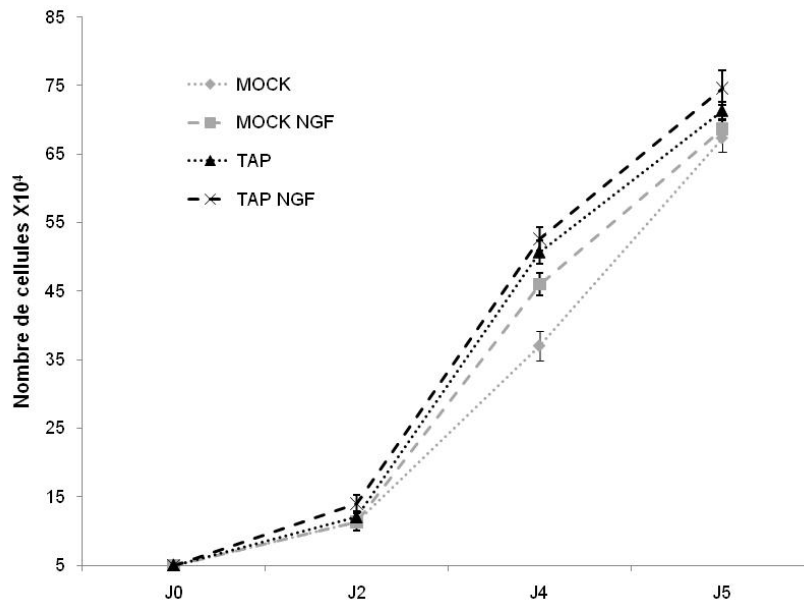


Figure 25. Test de prolifération cellulaire. Les cellules MOCK et TAP sont traitées ou non tous les deux jours avec 200 ng/ml de NGF et sont comptées aux jours 2, 4 et 5 sur lame de Malassez. Chaque point est compté en triplicat.

Nous pouvons constater sur ce graphique que la présence ou non de la surexpression de p75^{NTR} ainsi que le traitement ou non au NGF n'ont que peu ou pas d'impact sur la prolifération des cellules cancéreuses.

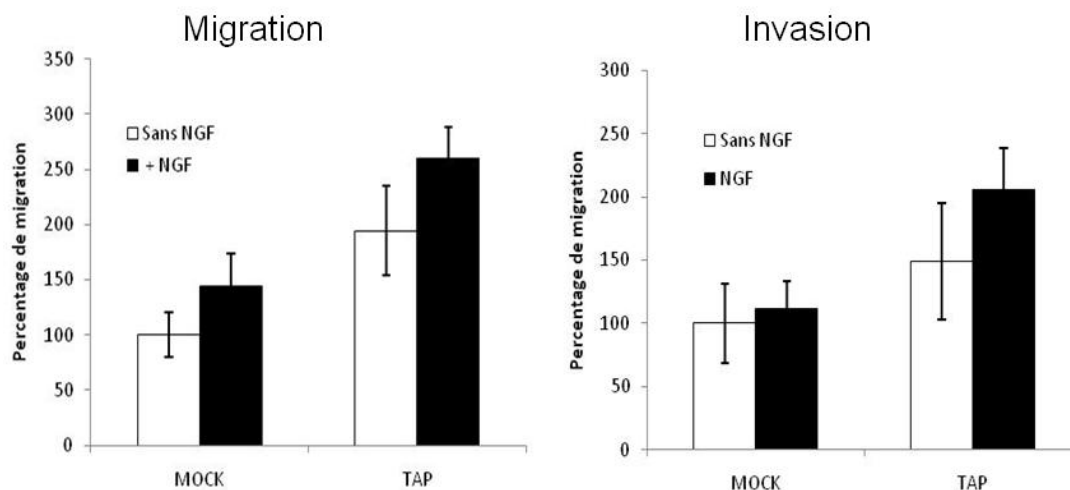


Figure 26. Représentation graphique des résultats des tests de migration et d'invasion MOCK versus TAP. Après ensemencement sur une matrice de collagène de type I, les cellules sont traitées ou non au NGF à 200 ng/ml pendant 6h pour le test de migration et pendant 24h pour le test d'invasion. Chaque condition est réalisée et comptée en triplicat.

RESULTATS

Par la suite, nous avons étudié les effets d'invasion et de migration sur nos deux lignées stables avec ou sans traitement au NGF (Figure 26).

L'analyse de ces résultats nous montre premièrement qu'un traitement au NGF n'a pas d'effet significatif sur la migration et l'invasion des cellules MCF-7. Il en va de même pour la surexpression de p75^{NTR} qui n'influence pas ces effets biologiques.

Enfin, nous avons effectué un test de survie sur nos cellules surexprimantes afin d'évaluer l'impact de la surexpression de p75^{NTR} dans le processus de résistance à l'apoptose (Figure 27).

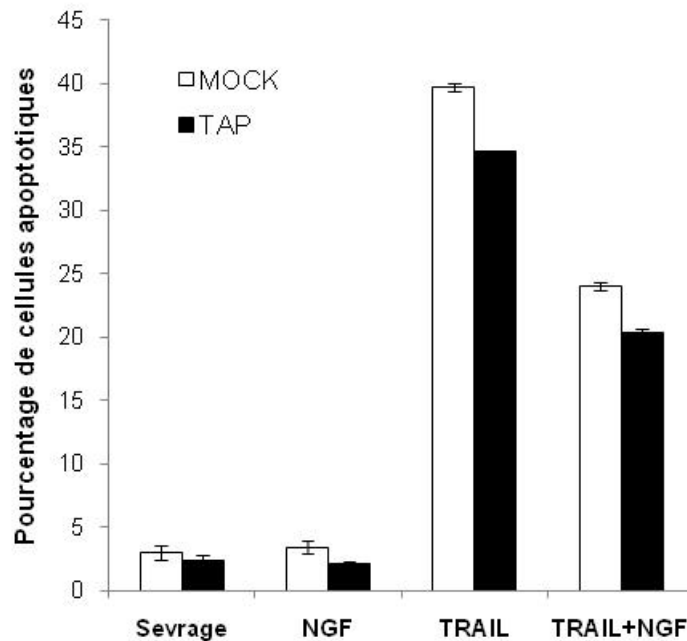


Figure 27. Test de survie sur les cellules stables MOCK et TAP. L'apoptogène utilisé est le TRAIL en présence ou non du NGF. Les cellules sont traitées soit avec 200 ng/ml de NGF, soit par 5 ng/ml de TRAIL, soit en co-traitement TRAIL+NGF pendant 4 h avant analyse de la mort cellulaire par comptage au Hoechst.

En comparant les MOCK et les TAP, que ce soit en condition d'apoptose (TRAIL) ou en condition de survie (TRAIL+NGF), nous pouvons remarquer que la surexpression de p75^{NTR} entraîne une légère diminution de l'apoptose, environ 5%, comparée aux cellules contrôles MOCK. De plus, nous pouvons constater à la fois pour les MOCK et les TAP que le NGF induit une diminution de l'apoptose de l'ordre de 15% comparée à la condition TRAIL seul.

L'effet de survie a également été apprécié par l'étude de l'activité de la caspase-9 dans les conditions de sevrage, de traitement au NGF (à 200 ng/ml), de traitement au TRAIL (à 5 ng/ml) et de co-traitement TRAIL + NGF (Figure 28).

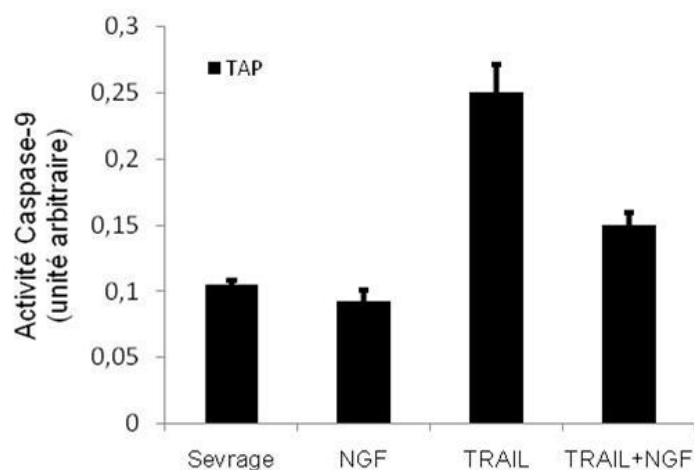


Figure 28. Test d'activité caspase-9. Les cellules TAP sont soumises à 4 conditions de culture différentes : sevrage, traitement au NGF (200 ng/ml), traitement au TRAIL (5 ng/ml) et co-traitement TRAIL + NGF. L'activité de la caspase-9 est enregistrée, après 4 h de traitement, suite à l'excitation de son substrat LEDH-pNA (Enzo Life Science) à 405 nm. Chaque condition est réalisée en triplicat.

Nous pouvons constater que l'activité de la caspase-9 est fortement diminuée en cas de co-traitement TRAIL + NGF, indiquant une diminution de l'action apoptotique du TRAIL et donc un meilleur effet de survie des cellules TAP.

L'ensemble de ces résultats indique que la surexpression de p75^{NTR} ne modifie pas la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires MCF-7. En revanche, elle augmente la survie des cellules traitées par TRAIL. De plus, ces résultats confirment l'action anti-apoptotique de p75^{NTR} et démontrent que le récepteur chimérique est fonctionnel.

3- Identification des partenaires de p75^{NTR} par TAP-tag

Afin d'identifier les partenaires protéiques de p75^{NTR}, nous avons appliqué une stratégie de double purification (TAP-tag) de notre récepteur p75^{NTR} chimérique. Afin de nous assurer du bon déroulement de la double purification, différentes fractions sont collectées au cours de la purification (Figure 29).

RESULTATS

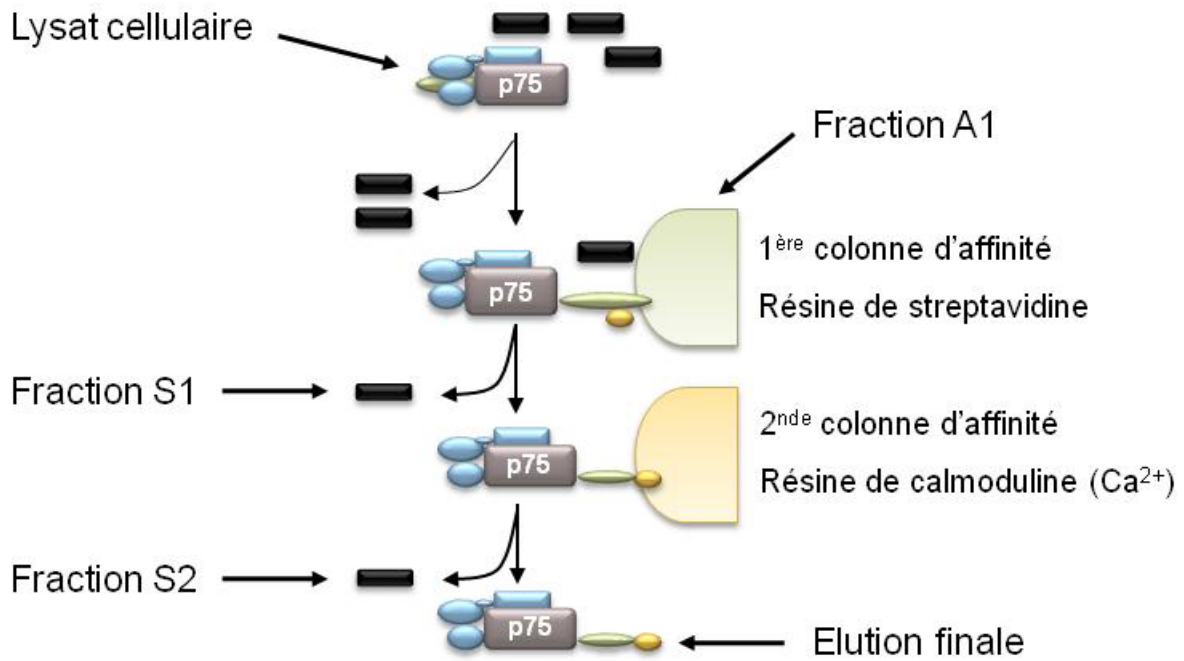


Figure 29 : Schéma de principe de la double purification par TAP-tag. En bleu sont représentés les partenaires de $p75^{NTR}$ et en noir les protéines contaminantes. A1 : aliquot de l'élution de la première résine. S1 : lavage de la première résine d'affinité. S2 : lavage de la seconde résine d'affinité.

Afin de nous assurer de l'efficacité du protocole, nous avons réalisé un TAP-tag en utilisant les cellules surexprimant $p75^{NTR}$. Ainsi, 8 mg d'extraits totaux ont été soumis à la double purification. La quantité de $p75^{NTR}$ dans les différentes fractions a été analysée par Western blot (Figure 30).

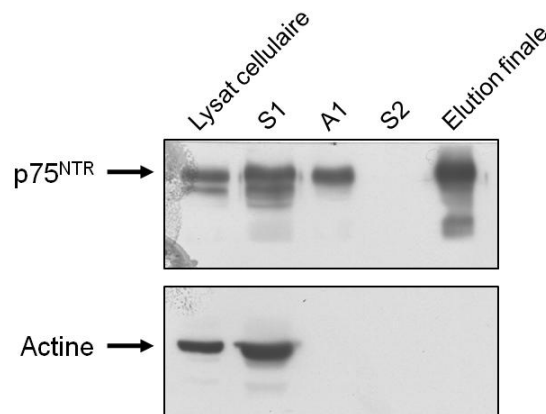


Figure 30 : Analyse de $p75^{NTR}$ dans les différentes fractions du TAP-tag par Western blot. La concentration protéique des différentes fractions ne peut pas être dosée. De ce fait, la piste du lysat cellulaire comporte 30 μ g de protéines alors que la piste de la fraction A1 contient 10 μ l sur les 500 μ l de l'élution de la première purification. L'actine est utilisée pour vérifier la contamination protéique au cours de la purification.

Comme nous pouvons le voir sur le Western blot, $p75^{NTR}$ est présent dans le lysat total, mais aussi dans la première fraction de lavage. Ceci nous indique que la résine de streptavidine

est saturée en récepteur « taggé » et que l'ensemble du pool de récepteur chimérique n'est pas retenu sur cette résine. Comme attendu, les aliquots issus de l'élution des deux résines (fraction A1 et éluat final) contiennent le p75^{NTR} « taggé » tandis que la fraction de lavage S2 en est dépourvue. En revanche, si nous analysons l'actine sur ces mêmes fractions, nous pouvons constater sa présence uniquement dans les lysats totaux et dans la première fraction de lavage, indiquant qu'elle n'est pas retenue sur la première résine de streptavidine. Ces résultats nous informent donc de l'efficacité de la double purification par TAP-tag en terme de purification de la protéine cible, mais aussi en terme d'élimination des protéines contaminantes. En effet, même une protéine aussi abondante que l'actine n'a pas été retenue par la résine de streptavidine et a été éliminée par les étapes de lavage. De plus, l'absence de p75^{NTR} dans la fraction S2 nous indique qu'aucun signal n'est perdu par les étapes de lavage de la résine de calmoduline.

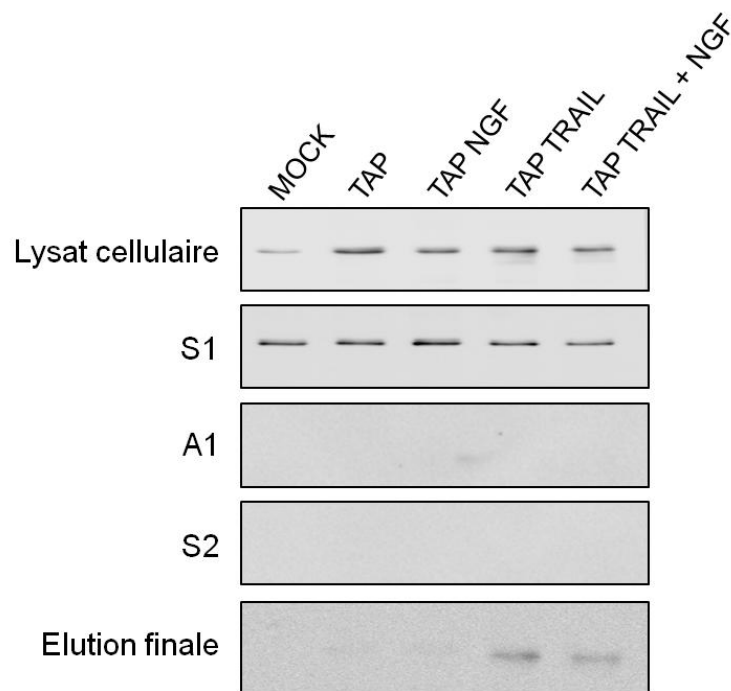


Figure 31 : Analyse par Western blot de TRADD dans les différentes fractions issues du TAP-tag. Comme pour la figure 30, la quantité de protéines déposées pour chaque fraction n'est pas équivalente due à l'impossibilité de doser ces fractions. Cependant, au sein d'une même fraction, ces quantités sont égales entre les différentes conditions. De la même manière, 10 μ l sur les 500 μ l totaux d'élution sont déposés pour la fraction A1.

RESULTATS

Par la suite, nous avons effectué un TAP-tag sur une plus grande quantité de protéines (40 mg) afin de permettre une analyse en spectrométrie de masse, et sur différentes conditions de culture. Les conditions utilisées sont les suivantes : les cellules MOCK en sevrage, les cellules TAP en sevrage, traitées au NGF, traitées avec l'apoptogène TRAIL (condition d'apoptose) et traitées à la fois par le TRAIL et le NGF (condition de survie). Les mêmes fractions ont été récoltées et analysées par Western blot mais cette fois à l'aide d'un anticorps anti-TRADD (Figure 31). En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, TRADD est le seul partenaire protéique connu pour p75^{NTR} dans les cellules cancéreuses mammaires en condition d'apoptose (El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003).

Comme nous pouvons le constater sur ces Western blots, TRADD est présent dans toutes les conditions de culture dans le lysat total des cellules. Il est également présent dans toutes les fractions du premier lavage. Cependant, nous pouvons également voir que dans les conditions d'apoptose et de survie, il est présent dans les fractions d'élution finale. Ceci nous indique qu'il est bien retenu sur les colonnes d'affinité par l'intermédiaire de son association physique avec p75^{NTR}. Nous aurions dû également trouver un signal dans les fractions A1, mais la quantité de protéines déposées pour ces fractions est trop faible (10 µl sur un total de 500 µl) pour permettre une détection par Western blot. Grâce à l'ensemble de ces résultats, nous pouvons affirmer que la purification par TAP-tag du récepteur p75^{NTR} permet de conserver les interactions protéiques et que notre stratégie est opérationnelle.

Afin d'identifier les protéines partenaires de p75^{NTR}, les éluats finaux issus des TAP-tag des différentes conditions de culture sont déposés sur gel gradient pré-coulé 10-20% d'acrylamide. Après migration et coloration du gel au bleu de Coomassie colloïdal, l'analyse des profils de migration des différentes conditions de culture a permis de mettre en évidence 7 bandes présentant une différence d'intensité dans la condition de survie (Figure 32).

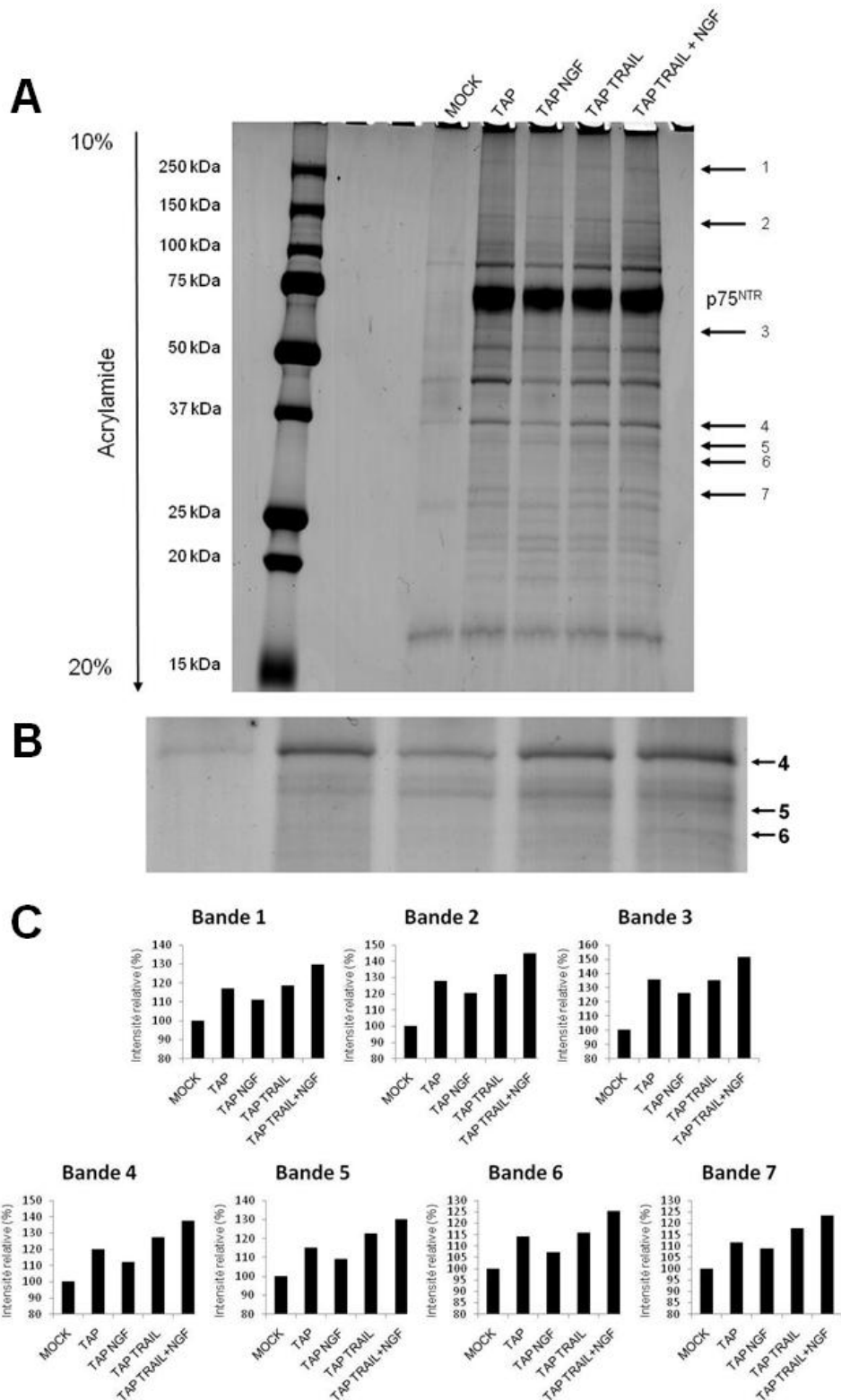


Figure 32 : Visualisation des protéines issues de la purification par TAP-tag. A : Les flèches noires indiquent les bandes présentant un profil différentiel dans la condition de survie. La bande fortement majoritaire représente la protéine cible $p75^{NTR}$. La totalité de l'éluat final est déposée pour chaque condition sur le gel gradient pré-coulé 10-20% d'acrylamide. La coloration du gel est réalisée au bleu de Coomassie colloïdal. B : agrandissement de la zone du gel contenant les bandes 4, 5 et 6. C : quantification des 7 bandes différentielles à l'aide du logiciel Multi Gauge V3.0, exprimée en pourcentage relatif à la condition contrôle MOCK.

RESULTATS

4- Identification des protéines par spectrométrie de masse

Les 7 bandes différentielles plus la bande correspondant à p75^{NTR} (cf. Figure 32) ont été découpées, digérées par la trypsine puis analysées par spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS. De ce fait, l'analyse par spectrométrie de masse de la bande majoritaire nous a confirmé la présence de p75^{NTR}, après interrogation de la banque de données Mascot (base de données Sprot 0508), avec un score de 1505 et une identification basée sur 59 peptides dont 15 peptides uniques représentant une couverture de 40% dont la partie intracellulaire du récepteur quasi couverte complètement (Table 7).

Nom de la protéine	Numéro° d'accèsion	Poids moléculaire	Score Mascot	Nombre de peptides (uniques)	Pourcentage de couverture
p75 ^{NTR}	P08138	75 kDa	1505	59 (15)	40%

Table 7 : Identification de p75^{NTR} après interrogation de la base de données Mascot Sprot 0508. Sont listées pour le récepteur p75^{NTR} les informations suivantes : le nom de la protéine, son numéro d'accèsion UniProt, son poids moléculaire, le score Mascot de l'identification, le nombre global de peptides identifiés ainsi que le nombre de peptides uniques et le pourcentage de couverture de séquence. Ces informations ont été obtenues par interrogation de la banque de données Mascot Sprot 0508 contenant 19294 entrées pour la taxonomie Homo sapiens.

Ces données d'identification de p75^{NTR} nous ont permis d'obtenir un pourcentage de couverture de l'ordre de 40%, et si nous regardons dans le détail, nous pouvons nous rendre compte que la quasi-totalité de la séquence intracellulaire du récepteur est couverte (Figure 33).

10 20 30 40 50 60
 MGAGATGRAM DGPRLLLLL LGVSLGGAKE ACPTGLYTHS GECCKACNLG EGVAQPCGAN
 70 80 90 100 110 120
 QTVCEPCLDS VTFSDVVSAT EPCKPCTECV GLQSMSAPCV EADDAVCRCA YGYQDETTG
 130 140 150 160 170 180
RCEACRVCEA GSGLVFSCQD KQNTVCEECP DGTYSDEANH VDPCLPCTVC EDTERQLREC
 190 200 210 220 230 240
TRWADAECEE IPGRWITRST PPEGSDSTAP STQEPEAPPE QDLIASTVAG VVTTVMGSSQ
 250 260 270 280 290 300
 PVVTRGTTDN LIPVYCSILA AVVVGLVAYI AFKRWNSCKQ NKQGANSRPV NQTPPEGEK
 310 320 330 340 350 360
LHSDSGISVD SQSLHDQQP TQTASGQALK GDGGLYSSLP PAKREEVEKL LNGSAGDTWR
 370 380 390 400 410 420
HLAGELGYQP EHIDSFTH EA CPVRALLASW ATQDSATLDA LLAALRRIQR ADLVESLCSE
 430
 STATSPV

Figure 33 : Séquence en acides aminés de p75^{NTR}. Les séquences soulignées représentent les peptides observés en spectrométrie de masse ayant conduit à l'identification de p75^{NTR}. Le pourcentage de couverture de séquence est de 40%. Les barres verticales vertes délimitent le domaine transmembranaire du récepteur (des acides aminés 251 à 273).

Ces premiers résultats de spectrométrie de masse nous confirment la capacité de la stratégie TAP-tag à isoler une protéine cible. De plus, la qualité des spectres MS2 obtenus lors de cette analyse (Figure 34) confirme la solidité de nos résultats.

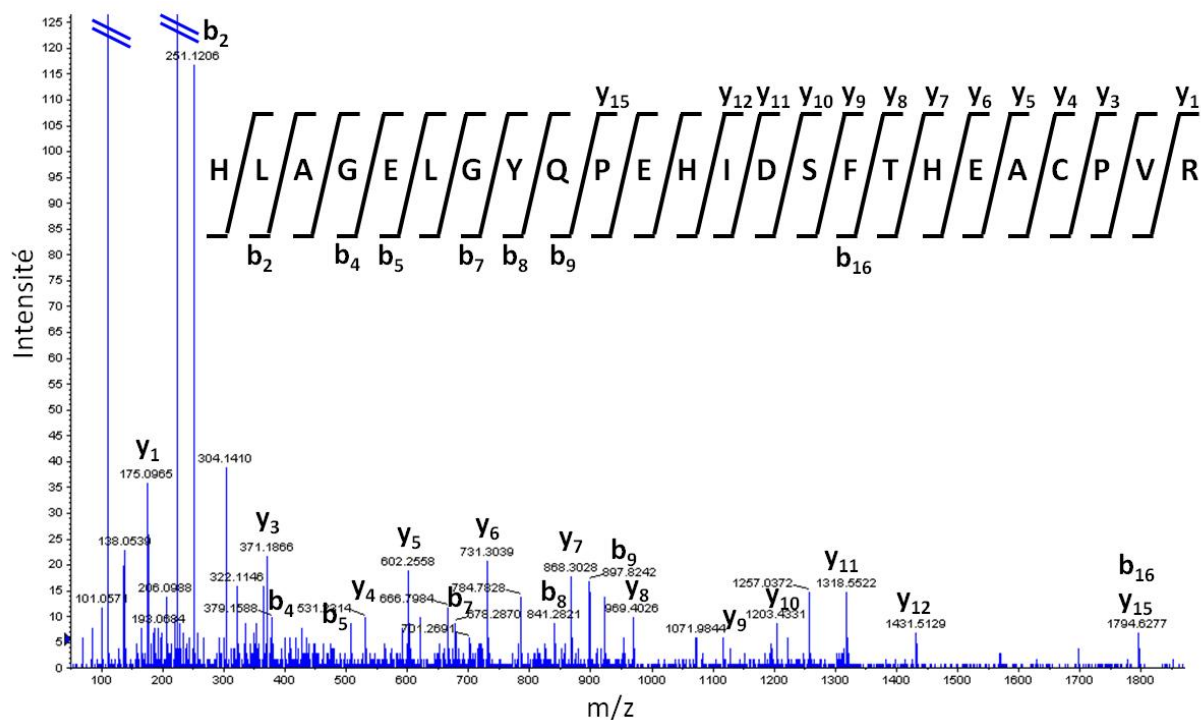


Figure 34 : Spectre MS2 d'un des peptides ayant conduit à l'identification de p75^{NTR}. Les ions b et y sont notés à la fois sur le spectre MS2 et sur la séquence du peptide parent analysé correspondant.

L'analyse des 7 bandes différentielles par la même stratégie de spectrométrie de masse nous a permis d'aboutir à une liste de protéines identifiées comme étant des partenaires potentiels du récepteur p75^{NTR} (Table 8).

RESULTATS

Numéro de la bande	Nom de la protéine	Numéro d'accension	Poids moléculaire (kDa)	Score Mascot (MS2)	Nb de peptides uniques	Pourcentage de couverture	Localisation et fonction biologique
1	Clathrine	Q00610	191	128	12	10%	Membrane plasmique. Constituant des puits de clathrines permettant une endocytose spécifique.
1	Filamine-B	O75369	278	50	7	3%	Membrane nucléaire. Constituant des pores nucléaires régulant les échanges cytoplasme/noyau.
3	HSP70	P08107	70	124	3	7%	Cytoplasme. Protéine de stress impliquée dans la réponse apoptotique des cellules.
3	Aminopeptidase B	Q9H4A4	72	53	6	11%	Sécrétée. Exopeptidase coupant après les résidus lysines et arginine.
3	TRAF4	Q9BUZ4	53	50	3	4%	Cytoplasmique. Partenaire de p75 ^{NTR} dans le processus d'apoptose.
4	PSMD-14	Q99623	34	67	5	21%	Cytoplasmique. Constituant structurel du protéasome.
4	Wnt-7a	O00755	39	38	2	4%	Cytoplasmique. Inhibiteur de prolifération dans les cancers endométriaux.
5	Prohibitine-2	Q99623	33	48	1	4%	Cytoplasmique ou nucléaire. Régulateur transcriptionnel par le recrutement d'histones désacétylases.
6	OTUB1	Q96FW1	31	72	4	14%	Cytoplasmique. Activité enzymatique de désubiquitylation.

Table 8 : Tableau récapitulatif des protéines identifiées par spectrométrie de masse dans les bandes différentielles observées sur le gel coloré au bleu de Coomassie colloïdal.

Après avoir obtenu cette liste de partenaires potentiels de signalisation de p75^{NTR}, nous avons engagé les travaux de validation biochimique de ces résultats, tout d'abord par Western blot. Pour ce faire, des anticorps dirigés contre 6 des 9 protéines identifiées ont été utilisés et les résultats sont présentés dans la Table 9.

Protéine ciblée	Fournisseur	Origine	Optimisation Western blot	Western blot après TAP-tag
Aminopeptidase B	Sigma	Monoclonal de souris	Oui	Non détecté
OTUB1	Sigma	Polyclonal de lapin	Oui	Non détecté
Prohibitine-2	Sigma	Polyclonal de lapin	Oui	Non détecté
PSMD14	Sigma	Polyclonal de lapin	Oui	Non détecté
TRAF4	Sigma	Monoclonal de souris	Oui	Non détecté
Wnt-7a	Sigma	Polyclonal de lapin	Oui	Non détecté

Table 9 : Avancement des validations biochimiques par Western blot. 6 protéines sur 9 identifiées ont été testées par Western blot. La mise au point de tous les Western blots a été effectuée, puis les 6 protéines ont été recherchées dans la fraction d'éluat finale à l'issue d'un TAP-tag sur 5 conditions différentes (MOCK, TAP, TAP traitées par 200 ng/ml de NGF, TAP traitées par 5 ng/ml de TRAIL et TAP co-traitées par le NGF et le TRAIL).

Passée l'étape de mise au point des conditions de Western blot pour chaque anticorps, nous avons réalisé une purification par TAP-tag du récepteur p75^{NTR} dans les mêmes 5 conditions de cultures que précédemment. Puis nous avons réalisé des Western blots dirigés contre les 6 protéines d'intérêt sur les éluats finaux. Cependant à ce jour, aucune de ces 6 protéines n'a pu être validée biochimiquement.

D- Discussion

L'application du TAP-Tag à p75^{NTR} a nécessité tout d'abord le clonage de l'ADN complémentaire entier de p75^{NTR} dans le vecteur d'expression pCTAP. Ce clonage, permettant d'obtenir un p75^{NTR} recombinant doublement « taggé », a été réalisé avec succès. En effet, le séquençage de l'ADNc de p75^{NTR} inséré dans le vecteur pCTAP a montré la bonne insertion et l'absence de mutation dans l'insert p75^{NTR}. La transfection stable des cellules MCF-7 avec le vecteur d'expression codant p75^{NTR} doublement « taggé » a abouti à l'augmentation de la quantité de ce récepteur. Nous avons également vérifié l'adressage membranaire de p75^{NTR} par immunocytochimie. Un test de survie sur cellules MCF-7 en présence d'apoptogène (TRAIL) et de NGF a permis de montrer que ce récepteur est

RESULTATS

fonctionnel. Suite à ces résultats, nous avons procédé à la double purification proprement dite en chromatographie d'affinité (TAP-Tag). Nous avons tout d'abord réalisé cette double chromatographie de p75^{NTR} dans la seule condition de cellules en sevrage (non traitées) afin de vérifier la présence de p75^{NTR} dans l'éluat et donc le bon déroulement du TAP-Tag. Ceci nous a montré l'efficacité de la double purification par TAP-tag car nous avons été en mesure de détecter notre protéine cible p75^{NTR} à la fois en Western blot mais également en spectrométrie de masse. Puis, nous avons réalisé un TAP-tag différentiel sur 5 conditions de cultures différentes afin de pouvoir être en mesure d'identifier les partenaires spécifiques de la survie du récepteur p75^{NTR}. Lors de cette expérimentation, l'obtention du signal de la protéine TRADD (adaptateur de survie connu pour p75^{NTR}) a permis de confirmer la robustesse de notre stratégie, et donc sa capacité à purifier les partenaires protéiques de signalisation du récepteur p75^{NTR}. Nous avons finalement pu aboutir à l'obtention d'une liste partenaires protéiques potentiels de signalisation de survie du récepteur.

Nous avons identifié comme partenaires potentiels différents types de protéines : des protéines dites structurelles comme les clathrines dans la membrane plasmique ou les filamines dans la membrane nucléaire, des protéines à rôle enzymatique de dégradation comme l'aminopeptidase ou le PSDM14 qui est une sous-unité structurale du complexe du protéasome, et enfin des protéines dites de signalisation (que ce soit en terme d'interaction ou de régulation) comme OTUB1, la prohibitine, Wnt-7, une protéine de la famille des TRAF ou encore la bien décrite protéine chaperonne HSP70. Cependant, les premières tentatives de validations biochimiques de ces interactions furent un échec.

Les étapes suivantes de ce projet seront tout d'abord la continuité des validations biochimiques des identifications que nous avons débutées par Western blot, puis par la suite la validation des interactions par co-localisation en immunocytochimie et par immunoprécipitation inverse. Ensuite seulement nous pourrons mener une étude fonctionnelle de ces partenaires protéiques, soit par des stratégies d'inactivation de type siRNA, soit en augmentant la concentration de la protéine étudiée dans les cellules afin d'observer son impact sur la survie cellulaire. Enfin, il nous faudra analyser l'effet biologique observé sur d'autres lignées cellulaires du cancer du sein comme les cellules MDA-MB-231, les T47D ou bien encore les BT20, avant de pouvoir envisager un passage au modèle *in vivo* de souris immunodéficientes.

En conclusion, notons que ces résultats restent préliminaires et nécessitent des investigations complémentaires, en terme d'amélioration de l'efficacité de la purification mais également sur les validations biochimiques des résultats obtenus. Certains problèmes comme l'aspect dynamique de la signalisation ou encore ses composantes temporelle et de

sub-localisation cellulaire doivent aussi être pris en compte pour adapter la stratégie TAP-tag et l'inclure comme un outil d'une étude plus générale de la description de la voie de signalisation de survie du récepteur dans les cellules cancéreuses mammaires. Ces aspects seront discutés plus en détail dans le chapitre « Discussion ».

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

p75^{NTR}, PROGRESSION TumorALE ET THERAPIES

Il est maintenant clairement établi que les neurotrophines jouent un rôle pro-tumoral dans le cancer du sein, et notamment *via* un effet anti-apoptotique dû à leur récepteur commun p75^{NTR}. C'est pourquoi à travers mes travaux de thèse, je me suis appliqué à accroître les connaissances sur ce récepteur, tant du point de vue de son impact sur l'ensemble du protéome des cellules cancéreuses mammaires, qu'au point de vue de sa signalisation propre de l'effet de survie. Pour cela, nous avons opté pour l'utilisation d'une lignée bien caractérisée et fortement employée dans la recherche sur le cancer du sein : la lignée MCF-7. Cependant, la quantité de récepteur p75^{NTR} exprimé dans ces cellules est relativement faible comparée aux biopsies tumorales (environ 50 fois moins) (Descamps *et al.*, 2001a). C'est pourquoi nous avons décidé d'établir une lignée de cellules cancéreuses mammaires stable permettant la surexpression du récepteur. Ainsi, en accord avec les précédents résultats publiés par notre laboratoire, la surexpression de p75^{NTR} permet d'accroître considérablement la survie des cellules cancéreuses mammaires face à un apoptogène comme le TRAIL. Dans l'optique de la mise en place d'une stratégie protéomique, cette surexpression nous a permis à la fois d'enrichir nos extraits protéiques en récepteur p75^{NTR} mais également une purification facilitée du récepteur grâce à l'insertion de petits tags peptidiques permettant sa double purification. Grâce à ce modèle de surexpression, nous avons pu mener une étude dite « globale » par l'intermédiaire de la stratégie protéomique des gels 2D, afin d'évaluer l'impact d'une telle surexpression sur le protéome des cellules cancéreuses mammaires, mais également une étude « ciblée », par la stratégie TAP-tag, dans le but, malheureusement non atteint, d'identifier les protéines partenaires de p75^{NTR} dans la survie cellulaire.

Dans le cadre du cancer du sein, les thérapies actuelles, bien qu'efficaces, sont malheureusement soit agressives (chirurgie, chimiothérapie), soit restreintes à une faible proportion de malades exprimant certaines cibles moléculaires (récepteurs hormonaux, HER2). Ajouté à cela les phénomènes de résistances intrinsèque ou acquise des cellules cancéreuses, la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques reste un enjeu majeur de la recherche anticancéreuse. Dans ce contexte, le récepteur p75^{NTR} peut représenter une cible potentielle de par son implication dans la transduction du signal anti-apoptotique de toutes les neurotrophines. Dans ce sens, il a été montré que l'utilisation d'anticorps bloquants anti-NGF, anti-BDNF et anti-NT4/5, dans des modèles de xénogreffes chez la souris, permet d'inhiber la croissance tumorale en favorisant l'apoptose au sein des tumeurs (Vanhecke *et al.*, 2011). Nous pourrions donc imaginer un anticorps bloquant spécifique des sites de

liaison p75^{NTR}/neurotrophines. De ce fait, une seule molécule serait alors capable d'inhiber l'action de tous les facteurs de croissance neurotrophiques, limitant ainsi les risques de cytotoxicité pour le patient. De plus, notre laboratoire a également montré, à la fois *in vitro* et *in vivo*, que l'inhibition de p75^{NTR} par une stratégie de siRNA permettait de sensibiliser les cellules cancéreuses mammaires (MDA-MB-231 et MCF-7) à l'apoptogène TRAIL (Vanhecke *et al.*, 2011). Concernant le TRAIL, de nombreux essais cliniques visant à cibler directement la molécule ou ses récepteurs sont actuellement en cours avec des premiers résultats prometteurs (Rosevear *et al.*, 2010, Soria *et al.*, 2010, Trarbach *et al.*, 2010). Cependant, les nouvelles stratégies thérapeutiques visent à combiner plusieurs agents afin d'augmenter leurs activités tout en gardant une cytotoxicité acceptable. Dans ce cadre, la combinaison d'un inhibiteur de p75^{NTR} avec les molécules ciblant le TRAIL pourrait constituer une approche intéressante. En effet, un essai clinique de phase I a été réalisé en combinant le dulanermin (TRAIL humain recombinant), le paclitaxel (anti-mitotique), le carboplatin (intercalant de l'ADN) et le bevacizumab (ou Avastin, anti-angiogénique) dans le cancer du poumon (Soria *et al.*, 2010). Il existe actuellement un inhibiteur de p75^{NTR} nommé Pep5 qui a déjà montré ses effets pro-apoptotique et antiprolifératif sur les cellules cancéreuses mammaires, et qui agit en synergie avec d'autres drogues anticancéreuses comme le Taxol et le Tamoxifen (Naderi and Hughes-Davies, 2009). Il s'agit d'un peptide de 15 acides aminés, isolé à partir d'une librairie de peptides synthétiques, capable de fixer le domaine intracellulaire de p75^{NTR}. De plus, ce peptide permet, dans les neurones, d'inhiber la fixation de la protéine Rho-GDI sur p75^{NTR}, inhibant ainsi l'activation de RhoA, ce qui favorise la croissance des neurites (Yamashita and Tohyama, 2003). Enfin, comme le Pep5 cible la partie intracytoplasmique du récepteur, cela signifie qu'il pourrait interférer avec toutes les formes de protéolyse du récepteur, c'est-à-dire aussi bien le p75^{NTR} pleine longueur, que le fragment CTF ou encore le fragment ICD. Cependant, des études plus approfondies sur un plus large échantillon de cellules cancéreuses ainsi qu'un plus large spectre de drogues anticancéreuses seront nécessaires avant de pouvoir observer d'éventuels effets *in vivo*. Néanmoins, l'ensemble de ces données ainsi que nos résultats présentés ici font de p75^{NTR} une cible intéressante pour le développement de nouvelles stratégies anticancéreuses pour le cancer du sein.

Les nouvelles recherches en terme de découvertes thérapeutiques s'orientent également sur le ciblage des cellules souches cancéreuses. Dans le cancer de l'œsophage, il a récemment été montré que les cellules exprimant p75^{NTR} montrent des capacités d'auto-renouvellement, de formation de sphères en croissance sans ancrage et de résistance aux drogues (Huang *et al.*, 2009). Ces 3 caractéristiques concordent avec les standards de définition des cellules souches cancéreuses. Comme la présence de telles cellules est maintenant clairement

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

établie dans le cancer du sein (Al-Hajj *et al.*, 2003, Charafe-Jauffret *et al.*, 2009), il serait très intéressant de rechercher une éventuelle implication de p75^{NTR} dans cette population cellulaire afin d'ouvrir de nouveaux axes de recherche dans la lutte contre le développement de ce cancer (Federici *et al.*, 2011).

L'effet du microenvironnement sur les cellules cancéreuses mammaires est également un facteur important à prendre en compte. En effet, notre laboratoire a démontré que le NGF produit par les cellules cancéreuses mammaires a une action paracrine sur les cellules endothéliales, favorisant leur migration et ainsi l'angiogenèse tumorale (Romon *et al.*, 2010). De plus, notons que le récepteur p75^{NTR} est également exprimé dans les cellules myoépithéliales (Popnikolov *et al.*, 2005). De ce constat, nous pouvons suggérer que p75^{NTR} a non seulement un effet sur les cellules épithéliales cancéreuses mammaires, mais pourrait également avoir un impact conséquent sur le microenvironnement tumoral.

p75^{NTR} : VERS UNE SIGNALISATION DYNAMIQUE

p75^{NTR} est un récepteur membranaire dépourvu d'activité catalytique intrinsèque, qui signale par le recrutement de divers partenaires protéiques spécifiques, menant à son activité biologique. Lors de mes travaux, nous avons été en mesure de purifier efficacement le récepteur p75^{NTR} et de l'identifier par spectrométrie de masse. De plus, la stratégie TAP-tag nous a également permis de conserver les interactions protéiques avec le récepteur puisque nous avons détecté la protéine TRADD comme associée à p75^{NTR}, en accord avec les travaux précédents du laboratoire (El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003).

Comme pour toute signalisation membranaire, les deux composantes fondamentales sont la localisation subcellulaire et l'aspect temporel. Concernant la localisation subcellulaire, le récepteur peut se localiser dans différents compartiments cellulaires simultanément ; positions dépendant à la fois de son état de maturation/dégradation, mais aussi de sa signalisation. De ce fait, il est difficile de discerner les protéines impliquées dans sa maturation et/ou sa dégradation, des protéines impliquées dans sa signalisation. C'est pourquoi l'utilisation en l'état de la stratégie TAP-tag ne permet pas cette distinction entre les protéines dites du « trafficking » et les partenaires de signalisation. L'ajout d'une étape de séparation des différents compartiments cellulaires, comme une stratégie d'ultracentrifugation, pourrait permettre de répondre à cette question. Cependant, ces méthodes de subfractionnement cellulaire présentent un mauvais rendement, de l'ordre de 30 à 50%. Il faudrait donc, en début d'expérimentation, augmenter de manière significative la

quantité de matériel biologique afin de conserver une quantité suffisante de protéines pour permettre leur analyse par spectrométrie de masse, le facteur limitant étant la limite de détection des protéines sur un gel par la coloration utilisée (comme le bleu de Coomassie colloïdal).

Pour l'aspect temporel, l'enjeu d'une étude de signalisation est de déterminer le temps de traitement précis permettant une activation maximale de la voie étudiée. Et c'est là que réside le principal problème de l'étude de la signalisation de p75^{NTR}. En effet, lors de l'étude d'un récepteur à activité tyrosine kinase comme par exemple le récepteur TrkA, l'application d'une cinétique de traitement, en observant la phosphorylation du récepteur, permet de déterminer avec précision le temps de traitement nécessaire à une activation maximale du récepteur. Or pour p75^{NTR}, qui est dépourvu d'activité catalytique, nous ne pouvons pas appliquer ce type de stratégie. Lors de mes travaux, nous avons déterminé le temps de traitement de référence comme étant le temps correspondant à l'effet biologique maximum. Mais de ce fait, il n'est pas à exclure que cette observation soit réalisée trop tard en terme de signalisation, et que la cellule ait mis en place d'autres voies de signalisation à la suite de l'activation initiale de p75^{NTR}. Afin de résoudre ce problème, une des possibilités serait d'exploiter la capacité de purification de la stratégie TAP-tag afin de se focaliser sur un adaptateur protéique connu : TRADD. En effet, notre laboratoire a décrit l'interaction fonctionnelle entre ces deux protéines dans les cellules cancéreuses mammaires en condition de survie (El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003). De ce fait, il serait possible d'effectuer une cinétique de traitement au NGF en présence d'un apoptogène comme le TRAIL (condition de survie), et de rechercher à quel temps de traitement nous sommes en mesure d'obtenir le recrutement de la protéine TRADD. Comme celle-ci est un partenaire direct de p75^{NTR}, nous pouvons supposer qu'elle fera partie des premières protéines recrutées pour la signalisation, et donc nous permettra de déterminer le temps optimal de traitement pour l'étude de la signalisation de ce récepteur. Ceci nous permettrait également de limiter la purification des protéines prenant en charge le récepteur après la transduction du signal, et donc de simplifier l'analyse des résultats obtenus. Cependant, une telle cinétique présente l'inconvénient de demander un investissement financier important tant cette stratégie par TAP-tag est onéreuse.

L'ensemble de nos résultats va également dans le sens d'une signalisation dynamique. En effet, des protéines de différents compartiments cellulaires ont pu être identifiées par la stratégie ciblée TAP-tag (Clathrine et Lamine), mais également par l'analyse globale 2D avec l'implication de cytokératines. Rappelons que ces cytokératines ont été montrées comme participant à la formation de vacuoles intracytoplasmiques, qui permettent la séquestration de certaines caspases dont la caspase 3, participant ainsi à l'inhibition de

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

l'apoptose (MacFarlane *et al.*, 2000). Nous pourrions donc imaginer un système dynamique qui, à la suite de l'activation de p75^{NTR} par son ligand NGF, participerait directement ou indirectement à la formation de ce type d'inclusions, inhibant ainsi l'apoptose. De plus, nous avons pu identifier les lamines comme partenaires potentiels de p75^{NTR}, suggérant une implication du récepteur au niveau nucléaire. Ceci pourrait s'expliquer par la protéolyse du récepteur dont le fragment ICD a été montré comme ayant un rôle de facteur de transcription pour la cycline E1 (Parkhurst *et al.*, 2010). Dans ce système, les lamines de la membrane nucléaire pourraient faciliter le passage de l'ICD du cytoplasme au noyau afin de permettre son action transcriptionnelle. Toutefois, mes résultats tendent à mettre en exergue l'implication du cytosquelette qui devrait avoir un rôle bien plus que structural. En effet, si les cytokératines jouent un rôle principalement structural, leurs formes clivées vont pouvoir s'associer et participer activement à l'inhibition de l'apoptose en séquestrant les caspases comme la caspase 3 dans des vacuoles intracellulaires (MacFarlane *et al.*, 2000). De plus, concernant l'actine, il a été montré dans de nombreux modèles biologiques que sa réorganisation cellulaire était une étape primordiale dans l'induction de l'apoptose (Franklin-Tong and Gourlay, 2008, Grzanka *et al.*, 2010, Rebillard *et al.*, 2010).

PROTEOMIQUE : PLACE DANS L'ANALYSE DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE

Les principaux enjeux d'une analyse protéomique sont l'identification de protéines ainsi que leurs quantifications à partir d'un échantillon biologique. Pour l'objectif d'identification, la stratégie TAP-tag, que nous avons appliquée, se révèle être un outil efficace, permettant de décrypter la composition de complexes protéiques. Cependant, l'objectif de quantification est plus compliqué à atteindre. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il existe une multitude d'approches permettant de quantifier les protéines et ainsi pouvoir les comparer d'un état biologique à un autre. L'idéal serait de pouvoir combiner les avantages de différentes stratégies afin de pallier les problèmes majeurs de l'étude de la signalisation d'un récepteur transmembranaire. Tout d'abord, le premier problème est celui de la solubilisation des protéines membranaires. En effet, le tampon de lyse efficace à 100% sur de telles molécules n'existe pas, et il faut donc mettre au point un tampon de lyse pour chaque type de matériel biologique. De plus, dans notre cas, nous devons non seulement extraire les protéines membranaires, mais également conserver l'intégrité des complexes. C'est pourquoi une des options permettant ceci est le BN-PAGE (blue native-PAGE). En effet, cette stratégie permet à la fois de solubiliser les complexes membranaires en gardant leurs intégrités, mais également de les faire migrer dans un gel d'acrylamide (Reisinger and

Eichacker, 2008). De plus, l'application d'une telle stratégie couplée à notre modèle de surexpression pourrait faciliter l'analyse de ces gels qui se révèle parfois très compliquée. En effet, nous pouvons supposer que grâce à la surexpression, le complexe majoritaire que nous pourrions visualiser correspondra au complexe protéique de p75^{NTR}. Cependant, le BN-PAGE est une technique difficile à maîtriser, tant au niveau de la mise au point du tampon de lyse qu'au niveau de la séparation protéique en elle-même. De plus, l'inconvénient de ces gels est leur faible reproductibilité.

Concernant la quantification des protéines identifiées, la stratégie du bleu de Coomassie que nous avons utilisée est certes robuste et informative, mais manque cependant de précision à cause de la sensibilité de détection (minimum de 100 ng de protéines par spot). Les stratégies de type marquage chimique, bien que très précises, sont souvent sources de biais, dues à l'efficacité différentielle du marquage, et peuvent engendrer des difficultés lors de l'analyse par spectrométrie de masse, dues à la présence de sels. Une des alternatives que nous pourrions envisager est le marquage métabolique avec la stratégie SILAC. Celle-ci se fait au tout début de l'expérience, permettant ainsi de limiter au maximum les biais entre les conditions et donne une quantification précise. De plus, notre laboratoire possède l'expérience de cette technique pour l'avoir déjà employée sur les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (Strande *et al.*, 2009). Grâce au développement de nouveaux logiciels d'analyse, nous pourrions également nous intéresser à la technique du Label-free. En effet, cette stratégie ne nécessite aucune modification des protéines ou des peptides, et permet une meilleure quantification. De plus, il a récemment été montré que cette stratégie pouvait être applicable pour l'identification et la quantification de complexes protéiques endogènes (Geetha *et al.*, 2011). Cependant, pour appliquer une telle technique, l'utilisation d'un puissant spectromètre de masse comme un LTQ-Orbitrap ou un FT-ICR est requise (Nittis *et al.*, 2010, Titulaer *et al.*, 2011). Pour résumer, une stratégie protéomique couplant BN-PAGE et quantification par Label-free permettrait d'approfondir nos connaissances sur la signalisation de survie du récepteur p75^{NTR} dans les cellules cancéreuses mammaires.

En conclusion, bien que mes travaux aient contribué à l'ouverture de nouveaux axes de recherche comme l'implication active du cytosquelette dans la signalisation du récepteur p75^{NTR} ou l'aspect dynamique de sa signalisation, de nombreuses questions restent toujours en suspens : étant le récepteur universel des neurotrophines, les voies de transduction du signal seront-elles les mêmes quelle que soit la neurotrophine employée ? les voies de signalisation seront-elles les mêmes pour toutes les drogues anticancéreuses ? p75^{NTR} signale-t-il uniquement en homodimère ou recrute-t-il d'autres récepteurs membranaires

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

comme TrkA ou la sortiline afin de former un super-complexe de signalisation ? Les réponses aux questions posées contribueront à évaluer l'importance de p75^{NTR} comme cible thérapeutique contre le cancer du sein.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, Mougel A, Page A, Romon R et al. (2008). Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* **68**: 346-351.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3983-3988.

Allen J, Khwaja F and Djakiew D (2004). Gene therapy of prostate xenograft tumors with a p75NTR lipoplex. *Anticancer Res* **24**: 2997-3003.

Allen J, Khwaja F, Byers S and Djakiew D (2005). The p75NTR mediates a bifurcated signal transduction cascade through the NF kappa B and JNK pathways to inhibit cell survival. *Exp Cell Res* **304**: 69-80.

Amann T, Bataille F, Spruss T, Muhlbauer M, Gabele E, Scholmerich J et al. (2009). Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* **100**: 646-653.

Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA and Mann M (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **426**: 570-574.

Arakawa T, Haniu M, Narhi LO, Miller JA, Talvenheimo J, Philo JS et al. (1994). Formation of heterodimers from three neurotrophins, nerve growth factor, neurotrophin-3, and brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* **269**: 27833-27839.

Arevalo JC, Conde B, Hempstead BL, Chao MV, Martin-Zanca D and Perez P (2000). TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* **20**: 5908-5916.

Arnold A and Papanikolaou A (2005). Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* **23**: 4215-4224.

Aurikko JP, Ruotolo BT, Grossmann JG, Moncrieffe MC, Stephens E, Leppanen VM et al. (2005). Characterization of symmetric complexes of nerve growth factor and the ectodomain of the pan-neurotrophin receptor, p75NTR. *J Biol Chem* **280**: 33453-33460.

Bandtlow C and Dechant G (2004). From cell death to neuronal regeneration, effects of the p75 neurotrophin receptor depend on interactions with partner subunits. *Sci STKE* **2004**: pe24.

Barde YA, Edgar D and Thoenen H (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* **1**: 549-553.

Barker PA, Lomen-Hoerth C, Gensch EM, Meakin SO, Glass DJ and Shooter EM (1993). Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J Biol Chem* **268**: 15150-15157.

Barker PA, Barbee G, Misko TP and Shooter EM (1994). The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *J Biol Chem* **269**: 30645-30650.

Barker PA and Shooter EM (1994). Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* **13**: 203-215.

Barker PA (2007). High affinity not in the vicinity? *Neuron* **53**: 1-4.

Barker PA (2009). A p75(NTR) pivoting paradigm propels perspicacity. *Neuron* **62**: 3-5.

Baselga J, Semiglazov V, van Dam P, Manikhas A, Bellet M, Mayordomo J et al. (2009). Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* **27**: 2630-2637.

Becker EB, Howell J, Kodama Y, Barker PA and Bonni A (2004). Characterization of the c-Jun N-terminal kinase-BimEL signaling pathway in neuronal apoptosis. *J Neurosci* **24**: 8762-8770.

Beresini MH, Lempert MJ and Epstein LB (1988). Overlapping polypeptide induction in human fibroblasts in response to treatment with interferon-alpha, interferon-gamma, interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor. *J Immunol* **140**: 485-493.

Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV and Rosenthal A (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* **7**: 857-866.

Bertrand MJ, Kenchappa RS, Andrieu D, Leclercq-Smekens M, Nguyen HN, Carter BD et al. (2008). NRAGE, a p75NTR adaptor protein, is required for developmental apoptosis in vivo. *Cell Death Differ* **15**: 1921-1929.

Bhakar AL, Howell JL, Paul CE, Salehi AH, Becker EB, Said F et al. (2003). Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J Neurosci* **23**: 11373-11381.

Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S et al. (2004). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* **303**: 848-851.

BIBLIOGRAPHIE

Bibel M, Hoppe E and Barde YA (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J* **18**: 616-622.

Bilderback TR, Grigsby RJ and Dobrowsky RT (1997). Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae. *J Biol Chem* **272**: 10922-10927.

Bilderback TR, Gazula VR, Lisanti MP and Dobrowsky RT (1999). Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem* **274**: 257-263.

Bilderback TR, Gazula VR and Dobrowsky RT (2001). Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways. *J Neurochem* **76**: 1540-1551.

Bjornsti MA and Houghton PJ (2004). The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**: 335-348.

Blancato J, Singh B, Liu A, Liao DJ and Dickson RB (2004). Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer* **90**: 1612-1619.

Bloch A, Blumenstein L and Ahmadian MR (2004). Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci* **20**: 2321-2335.

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

Bonnet D and Dick JE (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**: 730-737.

Bosco EE and Knudsen ES (2007). RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis and treatment. *Cell Cycle* **6**: 667-671.

Bradshaw RA, Murray-Rust J, Ibanez CF, McDonald NQ, Lapatto R and Blundell TL (1994). Nerve growth factor: structure/function relationships. *Protein Sci* **3**: 1901-1913.

Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA and Caldas C (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* **23**: 7350-7360.

Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, Thorner J, Gibson HL, Brake AJ et al. (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol* **111**: 2851-2859.

Breuzá L, García M, Delgrossi MH and Le Bivic A (2002). Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp Cell Res* **273**: 178-186.

Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR et al. (2009). Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res* **15**: 3244-3250.

Bronfman FC and Fainzilber M (2004). Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep* **5**: 867-871.

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

Butowt R and von Bartheld CS (2009). Fates of neurotrophins after retrograde axonal transport: phosphorylation of p75NTR is a sorting signal for delayed degradation. *J Neurosci* **29**: 10715-10729.

Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA et al. (1996). Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* **272**: 542-545.

Casaccia-Bonofil P, Carter BD, Dobrowsky RT and Chao MV (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* **383**: 716-719.

Casademunt E, Carter BD, Benzel I, Frade JM, Dechant G and Barde YA (1999). The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J* **18**: 6050-6061.

Ceni C, Kommaddi RP, Thomas R, Vereker E, Liu X, McPherson PS et al. (2010). The p75NTR intracellular domain generated by neurotrophin-induced receptor cleavage potentiates Trk signaling. *J Cell Sci* **123**: 2299-2307.

Chan MM and Tahan SR (2010). Low-affinity nerve growth factor receptor (P75 NGFR) as a marker of perineural invasion in malignant melanomas. *J Cutan Pathol* **37**: 336-343.

Chang CF, Westbrook R, Ma J and Cao D (2007). Transforming growth factor-beta signaling in breast cancer. *Front Biosci* **12**: 4393-4401.

Chao MV, Bothwell MA, Ross AH, Koprowski H, Lanahan AA, Buck CR et al. (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* **232**: 518-521.

Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D and Wicha MS (2008). Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology* **75**: 75-84.

BIBLIOGRAPHIE

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P et al. (2009). Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* **69**: 1302-1313.

Chen ZY, Ieraci A, Teng H, Dall H, Meng CX, Herrera DG et al. (2005). Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci* **25**: 6156-6166.

Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A and Moses HL (2007). Enhanced hepatocyte growth factor signaling by type II transforming growth factor-beta receptor knockout fibroblasts promotes mammary tumorigenesis. *Cancer Res* **67**: 4869-4877.

Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A and Moses HL (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res* **6**: 1521-1533.

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.

Chittka A and Chao MV (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**: 10705-10710.

Chittka A, Arevalo JC, Rodriguez-Guzman M, Perez P, Chao MV and Sendtner M (2004). The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J Cell Biol* **164**: 985-996.

Clary DO and Reichardt LF (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11133-11137.

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**: 1014-1018.

Com E, Lagadec C, Page A, El Yazidi-Belkoura I, Slomianny C, Spencer A et al. (2007). Nerve growth factor receptor TrkA signaling in breast cancer cells involves Ku70 to prevent apoptosis. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1842-1854.

Coulson EJ, Reid K, Baca M, Shipham KA, Hulett SM, Kilpatrick TJ et al. (2000). Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem* **275**: 30537-30545.

Coulson EJ, Reid K, Shipham KM, Morley S, Kilpatrick TJ and Bartlett PF (2004). The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog Brain Res* **146**: 41-62.

Coulson EJ, May LM, Osborne SL, Reid K, Underwood CK, Meunier FA et al. (2008). p75 neurotrophin receptor mediates neuronal cell death by activating GIRK channels through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* **28**: 315-324.

Cox J and Mann M (2010). Quantitative, High-Resolution Proteomics for Data-Driven Systems Biology. *Annu Rev Biochem*.

Cuomo A, Moretti S, Minucci S and Bonaldi T (2010). SILAC-based proteomic analysis to dissect the "histone modification signature" of human breast cancer cells. *Amino Acids*.

Dancey J (2010). mTOR signaling and drug development in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **7**: 209-219.

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.

Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Ann Florenes V, Nielsen S and 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.

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.

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.

Di Cosimo S and Baselga J (2008). Targeted therapies in breast cancer: where are we now? *Eur J Cancer* **44**: 2781-2790.

Diel IJ, Jaschke A, Solomayer EF, Gollan C, Bastert G, Sohn C et al. (2008). Adjuvant oral clodronate improves the overall survival of primary breast cancer patients with micrometastases to the bone marrow: a long-term follow-up. *Ann Oncol* **19**: 2007-2011.

Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao MV and Hannun YA (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* **265**: 1596-1599.

BIBLIOGRAPHIE

- Dolle JP, Rezvan A, Allen FD, Lazarovici P and Lelkes PI** (2005a). Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **315**: 1220-1227.
- 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.
- Dolle L, Adriaenssens E, El Yazidi-Belkoura I, Le Bourhis X, Nurcombe V and Hondermarck H** (2004). Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* **4**: 463-470.
- Dolle L, Oliveira MJ, Bruyneel E, Hondermarck H and Bracke M** (2005b). Nerve growth factor mediates its pro-invasive effect in parallel with the release of a soluble E-cadherin fragment from breast cancer MCF-7/AZ cells. *J Dairy Res* **72 Spec No**: 20-26.
- Drakas R, Prisco M and Baserga R** (2005). A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells. *Proteomics* **5**: 132-137.
- Dziembowski A, Ventura AP, Rutz B, Caspary F, Faux C, Halgand F et al.** (2004). Proteomic analysis identifies a new complex required for nuclear pre-mRNA retention and splicing. *EMBO J* **23**: 4847-4856.
- 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.
- Epa WR, Markovska K and Barrett GL** (2004). The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation. *J Neurochem* **89**: 344-353.
- Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR et al.** (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**: 32687-32695.
- Federici G, Espina V, Liotta L and Edmiston KH** (2011). Breast cancer stem cells: a new target for therapy. *Oncology (Williston Park)* **25**: 25-28, 30.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF and Whitehouse CM** (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**: 64-71.
- Festuccia C, Muzi P, Gravina GL, Millimaggi D, Specca S, Dolo V et al.** (2007). Tyrosine kinase inhibitor CEP-701 blocks the NTRK1/NGF receptor and limits the invasive capability of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol* **30**: 193-200.

Foehr ED, Lin X, O'Mahony A, Geleziunas R, Bradshaw RA and Greene WC (2000). NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J Neurosci* **20**: 7556-7563.

Franklin-Tong VE and Gourlay CW (2008). A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochem J* **413**: 389-404.

Fulda S, Galluzzi L and Kroemer G (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 447-464.

Gallardo R, Ivarsson Y, Schymkowitz J, Rousseau F and Zimmermann P (2010). Structural diversity of PDZ-lipid interactions. *ChemBiochem* **11**: 456-467.

Gao H, Petzold CJ, Leavell MD and Leary JA (2003). Investigation of ion/molecule reactions as a quantification method for phosphorylated positional isomers. an FT-ICR approach. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**: 916-924.

Gargano N, Levi A and Alema S (1997). Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA receptors. *J Neurosci Res* **50**: 1-12.

Geetha T, Kenchappa RS, Wooten MW and Carter BD (2005). TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *EMBO J* **24**: 3859-3868.

Geetha T, Langlais P, Luo M, Mapes R, Lefort N, Chen SC et al. (2011). Label-free proteomic identification of endogenous, insulin-stimulated interaction partners of insulin receptor substrate-1. *J Am Soc Mass Spectrom* **22**: 457-466.

Gentry JJ, Casaccia-Bonofil P and Carter BD (2000). Nerve growth factor activation of nuclear factor kappaB through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J Biol Chem* **275**: 7558-7565.

Gentry JJ, Rutkoski NJ, Burke TL and Carter BD (2004). A functional interaction between the p75 neurotrophin receptor interacting factors, TRAF6 and NRIF. *J Biol Chem* **279**: 16646-16656.

Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW and Gygi SP (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6940-6945.

Geyer FC, Marchio C and Reis-Filho JS (2009). The role of molecular analysis in breast cancer. *Pathology* **41**: 77-88.

BIBLIOGRAPHIE

- Gong Y, Cao P, Yu HJ and Jiang T** (2008). Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex. *Nature* **454**: 789-793.
- Gorg A, Drews O, Luck C, Weiland F and Weiss W** (2009). 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* **30 Suppl 1**: S122-132.
- Grobmyer SR, Morse DL, Fletcher B, Gutwein LG, Sharma P, Krishna V et al.** (2011). The promise of nanotechnology for solving clinical problems in breast cancer. *J Surg Oncol* **103**: 317-325.
- Grothey A and Galanis E** (2009). Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules. *Nat Rev Clin Oncol* **6**: 507-518.
- Grzanka D, Grzanka A, Izdebska M, Gackowska L, Stepien A and Marszalek A** (2010). Actin reorganization in CHO AA8 cells undergoing mitotic catastrophe and apoptosis induced by doxorubicin. *Oncol Rep* **23**: 655-663.
- Guertin DA and Sabatini DM** (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* **12**: 9-22.
- Guiton M, Gunn-Moore FJ, Glass DJ, Geis DR, Yancopoulos GD and Tavare JM** (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**: 20384-20390.
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH and Aebersold R** (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**: 994-999.
- Haapasalo A, Sipola I, Larsson K, Akerman KE, Stoilov P, Stamm S et al.** (2002). Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. *J Biol Chem* **277**: 43160-43167.
- Hallbook F, Ibanez CF and Persson H** (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* **6**: 845-858.
- Hamanoue M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT and Davies AM** (1999). p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* **14**: 28-40.
- Hanahan D and Weinberg RA** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Harrington AW, Kim JY and Yoon SO** (2002). Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci* **22**: 156-166.

Haura EB, Muller A, Breitwieser FP, Li J, Grebien F, Colinge J et al. (2011). Using iTRAQ combined with tandem affinity purification to enhance low-abundance proteins associated with somatically mutated EGFR core complexes in lung cancer. *J Proteome Res* **10**: 182-190.

He XL, Bazan JF, McDermott G, Park JB, Wang K, Tessier-Lavigne M et al. (2003). Structure of the Nogo receptor ectodomain: a recognition module implicated in myelin inhibition. *Neuron* **38**: 177-185.

He XL and Garcia KC (2004). Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* **304**: 870-875.

Heinemeyer J, Scheibe B, Schmitz UK and Braun HP (2009). Blue native DIGE as a tool for comparative analyses of protein complexes. *J Proteomics* **72**: 539-544.

Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF and Chao MV (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* **350**: 678-683.

Hermey G (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cell Mol Life Sci* **66**: 2677-2689.

Herrup K and Shooter EM (1973). Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 3884-3888.

Heymach JV, Jr. and Shooter EM (1995). The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected mammalian cells. *J Biol Chem* **270**: 12297-12304.

Higuchi H, Yamashita T, Yoshikawa H and Tohyama M (2003). PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts. *EMBO J* **22**: 1790-1800.

Hillenkamp F and Karas M (1990). Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol* **193**: 280-295.

Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC and Chait BT (1991). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* **63**: 1193A-1203A.

Hohn A, Leibrock J, Bailey K and Barde YA (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* **344**: 339-341.

Hondermarck H, Tastet C, El Yazidi-Belkoura I, Toillon RA and Le Bourhis X (2008). Proteomics of breast cancer: the quest for markers and therapeutic targets. *J Proteome Res* **7**: 1403-1411.

BIBLIOGRAPHIE

Huang SD, Yuan Y, Liu XH, Gong DJ, Bai CG, Wang F et al. (2009). Self-renewal and chemotherapy resistance of p75^{NTR} positive cells in esophageal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer* **9**: 9.

Hung AY and Sheng M (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* **277**: 5699-5702.

Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR et al. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3060-3064.

Irie S, Hachiya T, Rabizadeh S, Maruyama W, Mukai J, Li Y et al. (1999). Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75^(NTR) and their effect on NF- κ B activation. *FEBS Lett* **460**: 191-198.

James P (1997). Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q Rev Biophys* **30**: 279-331.

Jin H, Pan Y, He L, Zhai H, Li X, Zhao L et al. (2007a). p75 neurotrophin receptor inhibits invasion and metastasis of gastric cancer. *Mol Cancer Res* **5**: 423-433.

Jin H, Pan Y, Zhao L, Zhai H, Li X, Sun L et al. (2007b). p75 neurotrophin receptor suppresses the proliferation of human gastric cancer cells. *Neoplasia* **9**: 471-478.

Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E et al. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* **47**: 545-554.

Jones KR and Reichardt LF (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8060-8064.

Joshi S, Tiwari AK, Mondal B and Sharma A (2011). Oncoproteomics. *Clin Chim Acta* **412**: 217-226.

Joubel A, Chalkley RJ, Medzihradzky KF, Hondermarck H and Burlingame AL (2009). Identification of new p53 acetylation sites in COS-1 cells. *Mol Cell Proteomics* **8**: 1167-1173.

Joyce JA (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **7**: 513-520.

Joyce JA and Pollard JW (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* **9**: 239-252.

Kanning KC, Hudson M, Amieux PS, Wiley JC, Bothwell M and Schecterson LC (2003). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* **23**: 5425-5436.

Kenchappa RS, Zampieri N, Chao MV, Barker PA, Teng HK, Hempstead BL et al. (2006). Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* **50**: 219-232.

Kenchappa RS, Tep C, Korade Z, Urta S, Bronfman FC, Yoon SO et al. (2010). p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme/ADAM17. *J Biol Chem* **285**: 20358-20368.

Kendall SE, Ryczko MC, Mehan M and Verdi JM (2003). Characterization of NADE, NRIF and SC-1 gene expression during mouse neurogenesis. *Brain Res Dev Brain Res* **144**: 151-158.

Khursigara G, Orlinick JR and Chao MV (1999). Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* **274**: 2597-2600.

Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS and Chao MV (2001). A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* **21**: 5854-5863.

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

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

Kim HG, Hwang SY, Aaronson SA, Mandinova A and Lee SW (2011). DDR1 receptor tyrosine kinase promotes prosurvival pathway through Notch1 activation. *J Biol Chem*.

Kimura MT, Irie S, Shoji-Hoshino S, Mukai J, Nadano D, Oshimura M et al. (2001). 14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* **276**: 17291-17300.

Klein R, Parada LF, Coulier F and Barbacid M (1989). trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J* **8**: 3701-3709.

Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E and Barbacid M (1991a). The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* **65**: 189-197.

Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S et al. (1991b). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* **66**: 395-403.

BIBLIOGRAPHIE

Knudson AG (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* **1**: 157-162.

Kondo T, Setoguchi T and Taga T (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 781-786.

Kozloff M, Chuang E, Starr A, Gowland PA, Cataruozolo PE, Collier M et al. (2010). An exploratory study of sunitinib plus paclitaxel as first-line treatment for patients with advanced breast cancer. *Ann Oncol* **21**: 1436-1441.

Kuwako K, Taniura H and Yoshikawa K (2004). Necdin-related MAGE proteins differentially interact with the E2F1 transcription factor and the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* **279**: 1703-1712.

Lachance C, Belliveau DJ and Barker PA (1997). Blocking nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor on sympathetic neurons transiently reduces trkA activation but does not affect neuronal survival. *Neuroscience* **81**: 861-871.

Lad SP, Peterson DA, Bradshaw RA and Neet KE (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**: 24808-24817.

Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, Foveau B, Vanhecke E, Romon R et al. (2009). TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* **28**: 1960-1970.

Lagadec C, Romon R, Tastet C, Meignan S, Com E, Page A et al. (2010). Ku86 is important for TrkA overexpression-induced breast cancer cell invasion. *Proteomics Clin Appl* **4**: 580-590.

Lai TC, Chou HC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, Shen HH et al. (2010). Secretomic and proteomic analysis of potential breast cancer markers by two-dimensional differential gel electrophoresis. *J Proteome Res* **9**: 1302-1322.

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**: 967-979.

Laneve P, Di Marcotullio L, Gioia U, Fiori ME, Ferretti E, Gulino A et al. (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**: 7957-7962.

Large TH, Weskamp G, Helder JC, Radeke MJ, Misko TP, Shooter EM et al. (1989). Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system. *Neuron* **2**: 1123-1134.

Lee R, Kermani P, Teng KK and Hempstead BL (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**: 1945-1948.

Li Q, Dai XQ, Shen PY, Cantiello HF, Karpinski E and Chen XZ (2004). A modified mammalian tandem affinity purification procedure to prepare functional polycystin-2 channel. *FEBS Lett* **576**: 231-236.

Li Y, Zhang T, Schwartz SJ and Sun D (2009). New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential. *Drug Resist Updat* **12**: 17-27.

Liao DJ and Dickson RB (2000). c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **7**: 143-164.

Liepinsh E, Ilag LL, Otting G and Ibanez CF (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* **16**: 4999-5005.

Lim P, Robson M, Spaliviero J, McTavish KJ, Jimenez M, Zajac JD et al. (2009). Sertoli cell androgen receptor DNA binding domain is essential for the completion of spermatogenesis. *Endocrinology* **150**: 4755-4765.

Lim YS, McLaughlin T, Sung TC, Santiago A, Lee KF and O'Leary DD (2008). p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* **59**: 746-758.

Linggi MS, Burke TL, Williams BB, Harrington A, Kraemer R, Hempstead BL et al. (2005). Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) is an essential mediator of apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* **280**: 13801-13808.

Liu H, Sadygov RG and Yates JR, 3rd (2004). A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* **76**: 4193-4201.

Luberg K, Wong J, Weickert CS and Timmusk T (2010). Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J Neurochem* **113**: 952-964.

MacFarlane M, Merrison W, Dinsdale D and Cohen GM (2000). Active caspases and cleaved cytokeratins are sequestered into cytoplasmic inclusions in TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biol* **148**: 1239-1254.

Maddika S, Kavela S, Rani N, Palicharla VR, Pokorny JL, Sarkaria JN et al. (2011). WWP2 is an E3 ubiquitin ligase for PTEN. *Nat Cell Biol*.

Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV and Hempstead BL (1994). High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem* **269**: 6884-6891.

BIBLIOGRAPHIE

- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM et al.** (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* **247**: 1446-1451.
- Mann M and Wilm M** (1995). Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem Sci* **20**: 219-224.
- 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.
- Martin-Zanca D, Hughes SH and Barbacid M** (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* **319**: 743-748.
- Mayer EL, Dhakil S, Patel T, Sundaram S, Fabian C, Kozloff M et al.** (2010). SABRE-B: an evaluation of paclitaxel and bevacizumab with or without sunitinib as first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol* **21**: 2370-2376.
- Mazella J** (2001). Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* **13**: 1-6.
- McDonald NQ and Hendrickson WA** (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* **73**: 421-424.
- McGregor LM, Baylin SB, Griffin CA, Hawkins AL and Nelkin BD** (1994). Molecular cloning of the cDNA for human TrkC (NTRK3), chromosomal assignment, and evidence for a splice variant. *Genomics* **22**: 267-272.
- 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**: 247-254.
- Metsis M** (2001). Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* **58**: 1014-1020.
- Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J et al.** (2004). LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* **7**: 221-228.
- Miknyoczki SJ, Wan W, Chang H, Dobrzanski P, Ruggeri BA, Dionne CA et al.** (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**: 1924-1931.
- Moasser MM** (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* **26**: 6469-6487.

Modi S, Stopeck AT, Gordon MS, Mendelson D, Solit DB, Bagatell R et al. (2007). Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2 overexpressing breast cancer: a phase I dose-escalation study. *J Clin Oncol* **25**: 5410-5417.

Mohammed RA, Green A, El-Shikh S, Paish EC, Ellis IO and Martin SG (2007). Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer* **96**: 1092-1100.

Moreno-Aspitia A, Morton RF, Hillman DW, Lingle WL, Rowland KM, Jr., Wiesenfeld M et al. (2009). Phase II trial of sorafenib in patients with metastatic breast cancer previously exposed to anthracyclines or taxanes: North Central Cancer Treatment Group and Mayo Clinic Trial N0336. *J Clin Oncol* **27**: 11-15.

Mosyak L, Wood A, Dwyer B, Buddha M, Johnson M, Aulabaugh A et al. (2006). The structure of the Lingo-1 ectodomain, a module implicated in central nervous system repair inhibition. *J Biol Chem* **281**: 36378-36390.

Moulder SL, Symmans WF, Booser DJ, Madden TL, Lipsanen C, Yuan L et al. (2008). Phase I/II study of G3139 (Bcl-2 antisense oligonucleotide) in combination with doxorubicin and docetaxel in breast cancer. *Clin Cancer Res* **14**: 7909-7916.

Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, Suvanto P et al. (2000). NADE, a p75^{NTR}-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75^{NTR}. *J Biol Chem* **275**: 17566-17570.

Munck Petersen C, Nielsen MS, Jacobsen C, Tauris J, Jacobsen L, Gliemann J et al. (1999). Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J* **18**: 595-604.

Naderi A, Teschendorff AE, Beigel J, Cariati M, Ellis IO, Brenton JD et al. (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.

Naderi A and Hughes-Davies L (2009). Nerve growth factor/nuclear factor-kappaB pathway as a therapeutic target in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**: 211-216.

Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N, White PS, Yamashiro DJ, Nycum LM et al. (1995). Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics* **25**: 538-546.

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**: 107-116.

BIBLIOGRAPHIE

- Nassa G, Tarallo R, Ambrosino C, Bamundo A, Ferraro L, Paris O et al.** (2011a). A large set of estrogen receptor beta-interacting proteins identified by tandem affinity purification in hormone-responsive human breast cancer cell nuclei. *Proteomics* **11**: 159-165.
- Nassa G, Tarallo R, Guzzi PH, Ferraro L, Cirillo F, Ravo M et al.** (2011b). Comparative analysis of nuclear estrogen receptor alpha and beta interactomes in breast cancer cells. *Mol Biosyst* **7**: 667-676.
- Naveilhan P, Neveu I, Baudet C, Funakoshi H, Wion D, Brachet P et al.** (1996). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of the low-affinity neurotrophin receptor. *Brain Res Mol Brain Res* **41**: 259-268.
- Newsom-Davis T, Prieske S and Walczak H** (2009). Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis* **14**: 607-623.
- Niederost B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA and Bandtlow CE** (2002). Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* **22**: 10368-10376.
- Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D et al.** (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J* **20**: 2180-2190.
- Nittis T, Guittat L, LeDuc RD, Dao B, Duxin JP, Rohrs H et al.** (2010). Revealing novel telomere proteins using in vivo cross-linking, tandem affinity purification, and label-free quantitative LC-FTICR-MS. *Mol Cell Proteomics* **9**: 1144-1156.
- Normanno N, Morabito A, De Luca A, Piccirillo MC, Gallo M, Maiello MR et al.** (2009). Target-based therapies in breast cancer: current status and future perspectives. *Endocr Relat Cancer* **16**: 675-702.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS et al.** (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**: 843-848.
- Nykjaer A, Willnow TE and Petersen CM** (2005). p75^{NTR}--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* **15**: 49-57.
- Oda Y, Huang K, Cross FR, Cowburn D and Chait BT** (1999). Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6591-6596.
- Ohira K, Kumanogoh H, Sahara Y, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S et al.** (2005). A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J Neurosci* **25**: 1343-1353.

Okumura T, Tsunoda S, Mori Y, Ito T, Kikuchi K, Wang TC et al. (2006). The biological role of the low-affinity p75 neurotrophin receptor in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**: 5096-5103.

Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce KG, Mendoza A, Sevinsky JR et al. (2005). Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics* **4**: 1487-1502.

Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A et al. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**: 376-386.

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R et al. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**: 335-348.

Osborne C, Wilson P and Tripathy D (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* **9**: 361-377.

Oyama M, Nagashima T, Suzuki T, Kozuka-Hata H, Yumoto N, Shiraishi Y et al. (2011). Integrated quantitative analysis of the phosphoproteome and transcriptome in tamoxifen-resistant breast cancer. *J Biol Chem* **286**: 818-829.

Paiardini A and Caputo V (2008). Insights into the interaction of sortilin with proneurotrophins: a computational approach. *Neuropeptides* **42**: 205-214.

Palko ME, Coppola V and Tessarollo L (1999). Evidence for a role of truncated trkC receptor isoforms in mouse development. *J Neurosci* **19**: 775-782.

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S et al. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* **306**: 487-491.

Papatsoris AG, Liolitsa D and Deliveliotis C (2007). Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **16**: 303-309.

Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, Chang J, He XL et al. (2005). A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* **45**: 345-351.

Parkhurst CN, Zampieri N and Chao MV (2010). Nuclear localization of the p75 neurotrophin receptor intracellular domain. *J Biol Chem* **285**: 5361-5368.

BIBLIOGRAPHIE

Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K and Tang DG (2005). Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* **65**: 6207-6219.

Perez P, Coll PM, Hempstead BL, Martin-Zanca D and Chao MV (1995). NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol Cell Neurosci* **6**: 97-105.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**: 747-752.

Persson H, Ayer-Le Lievre C, Soder O, Villar MJ, Metsis M, Olson L et al. (1990). Expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in Sertoli cells downregulated by testosterone. *Science* **247**: 704-707.

Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH et al. (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem* **272**: 3599-3605.

Pincheira R, Baerwald M, Dunbar JD and Donner DB (2009). Sall2 is a novel p75NTR-interacting protein that links NGF signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth. *EMBO J* **28**: 261-273.

Polyak K and Hahn WC (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 et al. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* **65**: 5506-5511.

Popnikolov NK, Cavone SM, Schultz PM and Garcia FU (2005). Diagnostic utility of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) as a marker of breast myoepithelial cells. *Mod Pathol* **18**: 1535-1541.

Powell JC, Twomey C, Jain R and McCarthy JV (2009). Association between Presenilin-1 and TRAF6 modulates regulated intramembrane proteolysis of the p75NTR neurotrophin receptor. *J Neurochem* **108**: 216-230.

Puente J, Manzano A, Martin M, Lopez-Tarruella S and Diaz-Rubio E (2010). Breast cancer: complete response with the combination of sunitinib and trastuzumab in a patient with grade III ductal carcinoma. *Anticancer Drugs* **21 Suppl 1**: S19-22.

Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E et al. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**: 218-229.

Quistgaard EM, Madsen P, Groftehaug MK, Nissen P, Petersen CM and Thirup SS (2009). Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 96-98.

Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA and Shooter EM (1987). Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* **325**: 593-597.

Radziejewski C and Robinson RC (1993). Heterodimers of the neurotrophic factors: formation, isolation, and differential stability. *Biochemistry* **32**: 13350-13356.

Rebillard A, Jouan-Lanhouet S, Jouan E, Legembre P, Pizon M, Sergent O et al. (2010). Cisplatin-induced apoptosis involves a Fas-ROCK-ezrin-dependent actin remodelling in human colon cancer cells. *Eur J Cancer* **46**: 1445-1455.

Reis-Filho JS, Steele D, Di Palma S, Jones RL, Savage K, James M et al. (2006). Distribution and significance of nerve growth factor receptor (NGFR/p75NTR) in normal, benign and malignant breast tissue. *Mod Pathol* **19**: 307-319.

Reisinger V and Eichacker LA (2008). Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. *J Proteomics* **71**: 277-283.

Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M and Seraphin B (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**: 1030-1032.

Rodriguez-Tebar A, Dechant G and Barde YA (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* **4**: 487-492.

Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Gotz R and Barde YA (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* **11**: 917-922.

Romon R, Adriaenssens E, Lagadec C, Germain E, Hondermarck H and Le Bourhis X (2010). Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. *Mol Cancer* **9**: 157.

Rose CR, Blum R, Pichler B, Lepier A, Kafitz KW and Konnerth A (2003). Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* **426**: 74-78.

Rosen LS, Ashurst HL and Chap L (2010). Targeting signal transduction pathways in metastatic breast cancer: a comprehensive review. *Oncologist* **15**: 216-235.

BIBLIOGRAPHIE

Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Lewis M, Shih A, Laramée GR et al. (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* **4**: 767-773.

Rosevear HM, Lightfoot AJ and Griffith TS (2010). Conatumumab, a fully human mAb against death receptor 5 for the treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* **11**: 688-698.

Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Puzsai L, Ravdin PM and Hortobagyi GN (2009). The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* **14**: 320-368.

Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S et al. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* **3**: 1154-1169.

Roux PP, Bhakar AL, Kennedy TE and Barker PA (2001). The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* **276**: 23097-23104.

Roy PG and Thompson AM (2006). Cyclin D1 and breast cancer. *Breast* **15**: 718-727.

Ryden M, Hempstead B and Ibanez CF (1997). Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* **272**: 16322-16328.

Sachs BD, Baillie GS, McCall JR, Passino MA, Schachtrup C, Wallace DA et al. (2007). p75 neurotrophin receptor regulates tissue fibrosis through inhibition of plasminogen activation via a PDE4/cAMP/PKA pathway. *J Cell Biol* **177**: 1119-1132.

Salehi AH, Roux PP, Kubu CJ, Zeindler C, Bhakar A, Tannis LL et al. (2000). NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* **27**: 279-288.

Salehi AH, Xanthoudakis S and Barker PA (2002). NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem* **277**: 48043-48050.

Sato T, Irie S, Kitada S and Reed JC (1995). FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* **268**: 411-415.

Schecterson LC and Bothwell M (2008). An all-purpose tool for axon guidance. *Sci Signal* **1**: pe50.

Schlotter CM, Vogt U, Allgayer H and Brandt B (2008). Molecular targeted therapies for breast cancer treatment. *Breast Cancer Res* **10**: 211.

Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Chretien M and Murphy RA (1996). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett* **379**: 247-250.

Sharma G, Anabousi S, Ehrhardt C and Ravi Kumar MN (2006). Liposomes as targeted drug delivery systems in the treatment of breast cancer. *J Drug Target* **14**: 301-310.

Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, Camerato T, Armanini MP, Phillips HS et al. (1995). Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci* **15**: 477-491.

Shipitsin M and Polyak K (2008). The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Invest* **88**: 459-463.

Soland TM, Brusevold IJ, Koppang HS, Schenck K and Bryne M (2008). Nerve growth factor receptor (p75 NTR) and pattern of invasion predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* **53**: 62-72.

Sole C, Dolcet X, Segura MF, Gutierrez H, Diaz-Meco MT, Gozzelino R 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**: 479-492.

Soria JC, Smit E, Khayat D, Besse B, Yang X, Hsu CP et al. (2010). Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **28**: 1527-1533.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10869-10874.

Sortino MA, Condorelli F, Vancheri C, Chiarenza A, Bernardini R, Consoli U et al. (2000). Mitogenic effect of nerve growth factor (NGF) in LNCaP prostate adenocarcinoma cells: role of the high- and low-affinity NGF receptors. *Mol Endocrinol* **14**: 124-136.

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A et al. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10393-10398.

Stendahl M, Kronblad A, Ryden L, Emdin S, Bengtsson NO and Landberg G (2004). Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *Br J Cancer* **90**: 1942-1948.

BIBLIOGRAPHIE

- 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**: 1054-1065.
- Strande V, Canelle L, Tastet C, Burlet-Schiltz O, Monsarrat B and Hondermarck H** (2009). The proteome of the human breast cancer cell line MDA-MB-231: Analysis by LTQ-Orbitrap mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl* **3**: 41-50.
- Tabassum A, Khwaja F and Djakiew D** (2003). The p75(NTR) tumor suppressor induces caspase-mediated apoptosis in bladder tumor cells. *Int J Cancer* **105**: 47-52.
- Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Desantis G, Tessitore A, Vetuschi A et al.** (2004). TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* **6**: 347-360.
- Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Cea G, Panella S, Chioda A et al.** (2007). TrkAIII expression in the thymus. *J Neuroimmunol* **183**: 151-161.
- Tagliabue E, Castiglioni F, Ghirelli C, Modugno M, Asnagli L, Somenzi G et al.** (2000). Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* **275**: 5388-5394.
- Tarallo R, Bamundo A, Nassa G, Nola E, Paris O, Ambrosino C et al.** (2011). Identification of proteins associated with ligand-activated estrogen receptor alpha in human breast cancer cell nuclei by tandem affinity purification and nano LC-MS/MS. *Proteomics* **11**: 172-179.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD et al.** (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* **25**: 5455-5463.
- Titulaer MK, de Costa D, Stingl C, Dekker LJ, Sillevs Smitt PA and Luider TM** (2011). Label-free peptide profiling of Orbitrap full mass spectra. *BMC Res Notes* **4**: 21.
- Tokusashi Y, Asai K, Tamakawa S, Yamamoto M, Yoshie M, Yaginuma Y et al.** (2005). Expression of NGF in hepatocellular carcinoma cells with its receptors in non-tumor cell components. *Int J Cancer* **114**: 39-45.
- Trarbach T, Moehler M, Heinemann V, Kohne CH, Przyborek M, Schulz C et al.** (2010). Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* **102**: 506-512.
- Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S et al.** (2000). Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* **156**: 1235-1243.

Truzzi F, Marconi A, Lotti R, Dallaglio K, French LE, Hempstead BL et al. (2008). Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* **128**: 2031-2040.

Tulp A, Verwoerd D and Neefjes J (1999). Electromigration for separations of protein complexes. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **722**: 141-151.

Underwood CK, Reid K, May LM, Bartlett PF and Coulson EJ (2008). Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase. *Mol Cell Neurosci* **37**: 346-358.

Unlu M, Morgan ME and Minden JS (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**: 2071-2077.

Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Shelton DL, Parada LF and Presta LG (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J* **14**: 2795-2805.

Vandermoere F, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Lemoine J and Hondermarck H (2005). The antiapoptotic effect of fibroblast growth factor-2 is mediated through nuclear factor-kappaB activation induced via interaction between Akt and I kappaB kinase-beta in breast cancer cells. *Oncogene* **24**: 5482-5491.

Vandermoere F, El Yazidi-Belkoura I, Demont Y, Slomianny C, Antol J, Lemoine J et al. (2007). Proteomics exploration reveals that actin is a signaling target of the kinase Akt. *Mol Cell Proteomics* **6**: 114-124.

Vanhecke E, Adriaenssens E, Verbeke S, Meignan S, Germain E, Berteaux N et al. (2011). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-4/5 are Expressed in Breast Cancer and Can Be Targeted to Inhibit Tumor Cell Survival. *Clin Cancer Res*.

Venkitaraman AR (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**: 171-182.

Verbeke S, Meignan S, Lagadec C, Germain E, Hondermarck H, Adriaenssens E et al. (2010). Overexpression of p75(NTR) increases survival of breast cancer cells through p21(waf1). *Cell Signal* **22**: 1864-1873.

Vercoutter-Edouart A, Lemoine J, Smart CE, Nurcombe V, Boilly B, Peyrat J et al. (2000). The mitogenic signaling pathway for fibroblast growth factor-2 involves the tyrosine phosphorylation of cyclin D2 in MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Lett* **478**: 209-215.

Vercoutter-Edouart AS, Czeszak X, Crepin M, Lemoine J, Boilly B, Le Bourhis X et al. (2001). Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by fibroblast growth factor-2 in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp Cell Res* **262**: 59-68.

BIBLIOGRAPHIE

- Vilar M, Murillo-Carretero M, Mira H, Magnusson K, Besset V and Ibanez CF** (2006). Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle. *EMBO J* **25**: 1219-1230.
- Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Simi A, Karaca E, Reversi A et al.** (2009). Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* **62**: 72-83.
- Volkel P, Le Faou P and Angrand PO** (2010). Interaction proteomics: characterization of protein complexes using tandem affinity purification-mass spectrometry. *Biochem Soc Trans* **38**: 883-887.
- von Schack D, Casademunt E, Schweigreiter R, Meyer M, Bibel M and Dechant G** (2001). Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nat Neurosci* **4**: 977-978.
- Wang KC, Kim JA, 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**: 74-78.
- Wang LH, Chan JL and Li W** (2007). Rapamycin together with herceptin significantly increased anti-tumor efficacy compared to either alone in ErbB2 over expressing breast cancer cells. *Int J Cancer* **121**: 157-164.
- Wang X, Bauer JH, Li Y, Shao Z, Zetoune FS, Cattaneo E et al.** (2001). Characterization of a p75(NTR) apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *J Biol Chem* **276**: 33812-33820.
- Wang YM, Seibenhener ML, Vandenplas ML and Wooten MW** (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 FL, Porcionatto MA, Bhattacharyya A, Stiles CD and Segal RA** (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J Neurobiol* **39**: 323-336.
- Weeraratna AT, Dalrymple SL, Lamb JC, Denmeade SR, Miknyoczki S, Dionne CA et al.** (2001). Pan-trk inhibition decreases metastasis and enhances host survival in experimental models as a result of its selective induction of apoptosis of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* **7**: 2237-2245.
- Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H and Garcia KC** (2007). Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* **53**: 25-38.
- Weigelt B, Peterse JL and van 't Veer LJ** (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* **5**: 591-602.

Wen D, Wildes CP, Silvian L, Walus L, Mi S, Lee DH et al. (2005). Disulfide structure of the leucine-rich repeat C-terminal cap and C-terminal stalk region of Nogo-66 receptor. *Biochemistry* **44**: 16491-16501.

Weskamp G, Schlondorff J, Lum L, Becherer JD, Kim TW, Saftig P et al. (2004). Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J Biol Chem* **279**: 4241-4249.

Westergaard UB, Sorensen ES, Hermey G, Nielsen MS, Nykjaer A, Kirkegaard K et al. (2004). Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *J Biol Chem* **279**: 50221-50229.

Wienkoop S, Larrainzar E, Niemann M, Gonzalez EM, Lehmann U and Weckwerth W (2006). Stable isotope-free quantitative shotgun proteomics combined with sample pattern recognition for rapid diagnostics. *J Sep Sci* **29**: 2793-2801.

Wiezorek J, Holland P and Graves J (2010). Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. *Clin Cancer Res* **16**: 1701-1708.

Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM and Lynch M (2008). Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* **7**: 3129-3140.

Wong JW, Sullivan MJ and Cagney G (2008). Computational methods for the comparative quantification of proteins in label-free LCn-MS experiments. *Brief Bioinform* **9**: 156-165.

Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, Diaz-Meco MT, Barker PA 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**: 7709-7712.

Wooten MW, Geetha T, Seibenhener ML, Babu JR, Diaz-Meco MT and Moscat J (2005). The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-kappaB activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *J Biol Chem* **280**: 35625-35629.

Xie X, Feng S, Vuong H, Liu Y, Goodison S and Lubman DM (2010). A comparative phosphoproteomic analysis of a human tumor metastasis model using a label-free quantitative approach. *Electrophoresis* **31**: 1842-1852.

Yamashita T, Tucker KL and Barde YA (1999). Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* **24**: 585-593.

Yamashita T, Higuchi H and Tohyama M (2002). The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol* **157**: 565-570.

BIBLIOGRAPHIE

- Yamashita T and Tohyama M** (2003). The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* **6**: 461-467.
- Yano H, Torkin R, Martin LA, Chao MV and Teng KK** (2009). Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: evidence for retrograde-directed cell killing. *J Neurosci* **29**: 14790-14802.
- Yates JR, Cociorva D, Liao L and Zabrouskov V** (2006). Performance of a linear ion trap-Orbitrap hybrid for peptide analysis. *Anal Chem* **78**: 493-500.
- Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, Shin H et al.** (1999). TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* **274**: 30202-30208.
- 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**: 866-871.
- Yu C, Bruzek LM, Meng XW, Gores GJ, Carter CA, Kaufmann SH et al.** (2005). The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene* **24**: 6861-6869.
- Yuanlong H, Haifeng J, Xiaoyin Z, Jialin S, Jie L, Li Y et al.** (2008). The inhibitory effect of p75 neurotrophin receptor on growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* **268**: 110-119.
- Zampieri N, Xu CF, Neubert TA and Chao MV** (2005). Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains. *J Biol Chem* **280**: 14563-14571.
- Zapata JM, Pawlowski K, Haas E, Ware CF, Godzik A and Reed JC** (2001). A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J Biol Chem* **276**: 24242-24252.
- Zhang W, Zeng YS, Wang JM, Ding Y, Li Y and Wu W** (2009). Neurotrophin-3 improves retinoic acid-induced neural differentiation of skin-derived precursors through a p75NTR-dependent signaling pathway. *Neurosci Res* **64**: 170-176.
- Zhu ZW, Friess H, Wang L, Bogardus T, Korc M, Kleeff J et al.** (2001). Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* **7**: 105-112.