

Université Lille Nord de France

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED-446)

Présentée par

Cyril CORBET

**Etude de la signalisation du proNGF dans les cellules de
cancer du sein**

Soutenue le 4 Avril 2012 devant la commission d'examen :

Président du jury :

Dr. Fabrice SONCIN

Rapporteurs :

Dr. Ruth RIMOKH

Dr. Patrice DUBREUIL

Examineurs :

Dr. Nicolas MAGNÉ

Pr. Xuefen LE BOURHIS

Directeur de thèse :

Dr. Robert-Alain TOILLON

Université Lille Nord de France

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED-446)

Présentée par

Cyril CORBET

**Etude de la signalisation du proNGF dans les cellules de
cancer du sein**

Soutenue le 4 Avril 2012 devant la commission d'examen :

Président du jury :

Dr. Fabrice SONCIN

Rapporteurs :

Dr. Ruth RIMOKH

Dr. Patrice DUBREUIL

Examineurs :

Dr. Nicolas MAGNÉ

Pr. Xuefen LE BOURHIS

Directeur de thèse :

Dr. Robert-Alain TOILLON

Les travaux présentés dans ce mémoire de 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 Xuefen Le Bourhis.

Je tiens à remercier, dans un premier temps, le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche pour m'avoir accordé une allocation pour les 3 premières années de thèse, mais également l'Université Lille 1 pour le poste d'ATER qui m'a permis de réaliser une 4ème année de thèse.

Je remercie profondément Monsieur le Professeur Hubert Hondermarck et Madame le Professeur Xuefen Le Bourhis, qui se sont succédés en tant que directeur du laboratoire, pour l'accueil et le soutien qu'ils m'ont apportés lors de la réalisation de ce travail.

Je remercie, bien sûr, mon directeur de thèse, Monsieur le Docteur Robert-Alain Toillon, qui a dirigé, soutenu et encadré mon travail depuis le Master 2. Ta patience, ton investissement permanent et ta disponibilité m'ont permis de mener à bien ce travail. Merci chef ! Grand amateur de café, tu n'auras pas eu la chance que je te le prépare une seule fois lors de ces 4 années de collaboration !!!

Pour l'honneur qu'ils me font en faisant partie de ce jury, je remercie vivement Monsieur le Docteur Fabrice Soncin, qui a accepté de le présider, Madame le Docteur Ruth Rimokh et Monsieur le Docteur Patrice Dubreuil qui ont bien voulu juger ce travail, et enfin Monsieur le Docteur Nicolas Magné qui a accepté d'examiner ce travail.

Un grand Merci à tous les membres du laboratoire qui ont participé, d'une manière ou d'une autre, à cette grande aventure :

Ingrid, ta « zen attitude » est communicative ; tu m'as fait profité de tes connaissances en bio-mol... et en tricot (merci pour le bonnet !!).

Manue, merci pour les discussions philosophiques, tes conseils et ton aide.

Tof, je te serai toujours reconnaissant de m'avoir écouté et convaincu de venir en Master 2 au labo. Garde ta bonne humeur, ton obsession de la propreté et encore bravo pour la rénovation du labo !

Laura, tu débordes d'énergie ! Je te souhaite en tous cas le meilleur pour la suite.

Nathalie, mille mercis pour ton aide précieuse en bio-mol.

Un grand merci à Isabelle et Emilie pour tous les à-côtés qui nous rendent la vie tellement plus simple en biochimie et en culture, à Valérie pour ton rire très expressif et les

commandes toujours passées avec le sourire, ainsi qu'à Véro pour ton efficacité...et tes coups de bâton.

Je remercie également Eric qui m'aura entraîné dans les méandres de la mutagenèse dirigée. Ta bonne humeur et ton sixième sens pour détecter les pots forcent le respect !

Une attention toute particulière à mes collègues (et amis) thésards pour le soutien permanent dont ils ont fait preuve :

Elisa, l'accent chantant du labo. Ton français est impeccable, avec le vocabulaire que tu as appris au labo (béquille, grabuge...). Garde ta persévérance et ta joie de vivre. Je te souhaite le meilleur ma petite Timollino !!

Léo, la relève du labo. Notre cohabitation dans le bureau a été très agréable même si tu as cherché à m'empoisonner... Tu as peu de défauts, sauf que tu dois encore t'entraîner à la course à pied et supporter un vrai club de foot ! Et prends confiance en toi ! Bon courage « mon petit Léo ».

Je remercie également les anciens (nouveaux) docteurs du labo :

JP, comme tu l'as si bien dit, nous avons été compagnons de galère ce qui a abouti à une vraie amitié. Mention spéciale à nos amis communs McChouffe et Moinette pour leur soutien précieux. Bon vent à toi et pense à te remettre au sport !!

Yo, ton amitié et tes conseils me sont précieux. Je n'oublierai pas les bons moments passés en dehors du labo : excursions au bunker, soirées bolshoï et Vanina...

Stef, ton caractère et ta franchise étaient très agréables. Tu es aussi une redoutable adversaire au badminton.

Rod, véritable « maqueux » et amateur de mangas. Courage, tu trouveras ta voie...

Un grand merci à tous ceux que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ces 4 années : Elsa, Sam, Vaïk, Chann, Béné, Thomas et l'armée de stagiaires qui a défilé tout au long de ma thèse...

Je remercie également Adeline et Anne-Sophie, sans qui les analyses de spectrométrie de masse seraient encore en cours... Merci d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions !

Enfin, je n'oublierai pas de remercier profondément ma famille, belle-famille et mes amis pour leur soutien sans faille, en toutes circonstances. Un énorme merci à Marie sans qui tout serait plus compliqué...

RÉSUMÉ

RÉSUMÉ

Le NGF (*Nerve Growth Factor*) induit la croissance des cellules cancéreuses de sein, alors qu'il est sans effet sur les cellules normales. Il participe également au développement tumoral *in vivo* et est une cible thérapeutique potentielle dans le cancer du sein. Le NGF agit *via* les récepteurs TrkA et p75^{NTR}. De même, le précurseur du NGF, le proNGF, peut être sécrété et induire la mort neuronale en se liant à p75^{NTR} et à la sortiline. Néanmoins, aucune donnée n'a été rapportée sur l'expression et les effets potentiels du proNGF dans le cancer du sein.

Au cours de ma thèse, nous avons démontré que le proNGF est produit et sécrété par les cellules cancéreuses de sein. Nous avons observé une surproduction du proNGF dans les biopsies cancéreuses malignes par rapport aux biopsies normales et aux pathologies bénignes. Cette surexpression est associée à l'envahissement des nœuds lymphatiques.

J'ai confirmé, *in vitro*, que le proNGF, comme le NGF, favorise l'invasion des cellules cancéreuses de sein. Néanmoins, ces effets sont induits *via* des voies de signalisation distinctes. Ainsi, j'ai montré le rôle essentiel de la sortiline dans l'effet pro-invasif du proNGF. De même, le proNGF, comme le NGF, est capable d'activer la phosphorylation de TrkA mais ceci conduit à des voies de transduction différentes. Une analyse de l'interactome de TrkA a permis d'identifier des protéines différenciellement recrutées en fonction du ligand.

Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus a permis de mettre en évidence l'intervention du proNGF dans le cancer du sein. La discrimination des voies induites par le proNGF et par le NGF offre la possibilité de nouvelles modulations thérapeutiques dans ce cancer.

RÉSUMÉ

ABSTRACT

Nerve Growth Factor (NGF) induces the growth of breast cancer cells, whereas it has no effect on normal breast epithelial cells. NGF acts also on the tumor development *in vivo* and is considered as a potential therapeutic target in breast cancer. To exert its effects, NGF binds the receptors TrkA and p75^{NTR}. More recently, proNGF, the NGF precursor, has been found to be secreted and to induce neuronal cell death by binding to a sortilin/p75^{NTR} complex. Nevertheless, so far no data has been reported on the expression and the putative effects of proNGF in breast cancer cells.

During my thesis, we have demonstrated that proNGF is produced and secreted by breast cancer cells. Moreover, we revealed an overproduction of proNGF in malignant breast tumors, in comparison to benign tumors and normal biopsies. Interestingly, a statistically significant association was obtained between the presence of proNGF and lymph node invasion by breast cancer cells.

I confirmed that proNGF, but also NGF, induces *in vitro* breast cancer cell invasion. However, both proNGF and NGF induce their effects through distinct signaling pathways. I found that sortilin is essential for the proNGF pro-invasive effect while p75^{NTR} is not necessary. Interestingly, proNGF, like NGF, is able to activate TrkA phosphorylation but this leads to different transduction cascades. TrkA interactome analysis allowed the identification of proteins differentially recruited on the receptor, depending on the ligand. Thus, our results demonstrate the first implication of proNGF in breast cancer. Deciphering of the pathways induced by proNGF and NGF would give the opportunity for new therapeutic modulations in breast cancer.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| SOMMAIRE | 1 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS | 4 |
| ABRÉVIATIONS | 5 |
| INTRODUCTION | 7 |
| I. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCERISATION | 8 |
| A. LA GLANDE MAMMAIRE NORMALE | 8 |
| 1. Anatomie et histologie | 8 |
| 2. Développement et contrôle | 10 |
| B. LE CANCER DU SEIN | 12 |
| 1. Généralités | 12 |
| 2. Les tumeurs mammaires | 13 |
| a. <i>Les types de cancer du sein</i> | 13 |
| b. <i>Classifications des cancers du sein</i> | 15 |
| 3. Mécanismes de la tumorigenèse mammaire | 17 |
| a. <i>Stades de développement d'un cancer</i> | 17 |
| b. <i>Altérations géniques</i> | 19 |
| c. <i>Origine cellulaire</i> | 23 |
| d. <i>Influence du microenvironnement tumoral</i> | 26 |
| 4. Cancer du sein et thérapies | 30 |
| a. <i>Ciblage des voies pro- et anti-apoptotiques</i> | 30 |
| b. <i>Ciblage des voies associées aux facteurs de croissance</i> | 32 |
| c. <i>Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées</i> | 37 |
| II. LE NGF ET SES RECEPTEURS | 40 |
| A. LE NGF ET SON PRECURSEUR | 40 |
| 1. Découverte | 40 |
| 2. Structure : du gène aux protéines | 40 |
| a. <i>Les produits du gène</i> | 40 |

SOMMAIRE

| | | |
|----|--|----|
| b. | <i>Organisation des pro/neurotrophines</i> | 42 |
| 3. | Les proneurotrophines, une réalité physiologique | 44 |
| B. | LE RECEPTEUR TRKA | 46 |
| 1. | Découverte | 46 |
| 2. | Structure : du gène à la protéine..... | 46 |
| 3. | Signalisation du récepteur TrkA | 50 |
| a. | <i>Activation du récepteur</i> | 50 |
| b. | <i>Recrutement des “docking proteins”</i> | 53 |
| c. | <i>Voies de signalisation associées au récepteur TrkA</i> | 55 |
| d. | <i>Mécanismes de régulation de l’activité de TrkA</i> | 57 |
| 4. | Internalisation du récepteur | 60 |
| a. | <i>Voies d’internalisation de TrkA</i> | 61 |
| b. | <i>Notion d’endosome de signalisation (« signaling endosome »)</i> | 63 |
| c. | <i>Endosomes précoces : vers le recyclage ou la dégradation ?</i> | 65 |
| C. | LES AUTRES RECEPTEURS DU NGF ET DE SON PRECURSEUR | 68 |
| 1. | p75 ^{NTR} | 68 |
| a. | <i>Découverte</i> | 68 |
| b. | <i>Structure : du gène à la protéine</i> | 68 |
| c. | <i>Différentes formes de p75^{NTR}</i> | 71 |
| d. | <i>Coopération entre p75^{NTR} et TrkA</i> | 74 |
| 2. | La sortiline | 77 |
| a. | <i>Découverte</i> | 77 |
| b. | <i>Structure : du gène à la protéine</i> | 78 |
| c. | <i>Coopération entre p75^{NTR} et la sortiline</i> | 80 |
| D. | NGF, PRONGF ET TRKA DANS LES CANCERS..... | 82 |
| 1. | NGF, TrkA et cancer | 82 |
| a. | <i>Cancer de la thyroïde</i> | 82 |
| b. | <i>Cancer de la prostate</i> | 83 |
| c. | <i>Cancer du pancréas</i> | 83 |
| d. | <i>Cancer de l’ovaire</i> | 84 |
| e. | <i>Neuroblastome</i> | 84 |

SOMMAIRE

| | |
|--|------------|
| f. <i>Cancer du sein</i> | 85 |
| 2. ProNGF et cancer..... | 86 |
| a. <i>Cancer de la prostate</i> | 87 |
| b. <i>Cancer du pancréas</i> | 87 |
| c. <i>Cancer du foie</i> | 87 |
| d. <i>Mélanome</i> | 88 |
| 3. Axe NGF/TrkA comme cible thérapeutique dans les cancers..... | 88 |
| DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE | 91 |
| RÉSULTATS | 94 |
| ARTICLE 1 | 95 |
| ARTICLE 2 | 108 |
| DISCUSSION | 138 |
| I. LE PRONGF DANS LE CANCER DU SEIN | 139 |
| A. PRODUCTION ET SECRETION DU PRONGF..... | 139 |
| B. EFFET PRO-INVASIF DU PRONGF..... | 140 |
| C. PRONGF ET PROCESSUS METASTATIQUE..... | 141 |
| II. SIGNALISATION DU PRONGF DANS LES CELLULES DE CANCER DU SEIN | 142 |
| A. IMPLICATION DE LA SORTILINE ET TRKA..... | 142 |
| B. RECRUTEMENT SPECIFIQUE D'EPHA2 PAR LE PRONGF..... | 143 |
| C. SIGNALISATION DEPENDANTE DE LA PHOSPHORYLATION DE TRKA..... | 144 |
| D. SIGNALISATION INDEPENDANTE DE LA PHOSPHORYLATION DE TRKA..... | 145 |
| PERSPECTIVES | 148 |
| I. ROLE DU PRONGF <i>IN VIVO</i> DANS LE CANCER DU SEIN | 149 |
| II. SIGNALISATION DU PRONGF | 150 |
| III. PRONGF ET RESISTANCES THERAPEUTIQUES ? | 151 |
| BIBLIOGRAPHIE | 153 |

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Anatomie et structure de la glande mammaire..... | 9 |
| Figure 2 : Structure du lobe mammaire..... | 10 |
| Figure 3 : Histologie de la glande mammaire normale..... | 10 |
| Figure 4 : Développement de la glande mammaire..... | 11 |
| Figure 5 : Histologie des principaux types de cancer du sein..... | 14 |
| Figure 6 : Etapes de la cancérisation d'un épithélium canalaire mammaire..... | 18 |
| Figure 7 : Implication des protéines oncogéniques et suppresseurs de tumeurs dans les cascades de transduction des facteurs de croissance..... | 20 |
| Figure 8 : Modèles hypothétiques de l'origine cellulaire du cancer du sein..... | 25 |
| Figure 9 : Relations entre les cellules épithéliales cancéreuses mammaires et le microenvironnement tumoral..... | 27 |
| Figure 10 : Thérapies ciblées dans le cancer du sein visant les voies de signalisation des facteurs de croissance..... | 37 |
| Figure 11 : Représentation schématique des pro/neurotrophines..... | 41 |
| Figure 12 : Structure du NGF et de son précurseur..... | 42 |
| Figure 13 : Représentation schématique du récepteur TrkA..... | 47 |
| Figure 14 : Isoformes du récepteur TrkA..... | 50 |
| Figure 15 : Voies de signalisation associées au récepteur TrkA..... | 52 |
| Figure 16 : Mécanismes d'internalisation du récepteur TrkA..... | 61 |
| Figure 17 : Représentation schématique d'un endosome de signalisation..... | 65 |
| Figure 18 : Représentation schématique du récepteur p75 ^{NTR} | 69 |
| Figure 19 : Différentes formes du récepteur p75 ^{NTR} | 72 |
| Figure 20 : Représentation schématique de la sortiline..... | 79 |
| | |
| Tableau 1 : Classification TNM des stades de cancer du sein..... | 16 |
| Tableau 2 : Classification moléculaire des cancers du sein..... | 17 |
| Tableau 3 : Caractéristiques des neurotrophines humaines..... | 41 |
| Tableau 4 : Caractéristiques du récepteur TrkA humain..... | 47 |
| Tableau 5 : Caractéristiques du récepteur p75 ^{NTR} humain..... | 68 |
| Tableau 6 : Caractéristiques de la sortiline humaine..... | 78 |

ABRÉVIATIONS

ABRÉVIATIONS

A

aa: acides aminés

ADAM17/TACE: A Disintegrin And Metalloproteinase 17/TNF- α Converting Enzyme

APPL1: Adapter protein containing PH domain, PTB domain and leucine zipper motif 1

ARMS: Ankyrin repeat-rich membrane spanning protein

B

Bcl-2: B-cell lymphoma protein-2

Bcl-XL: B-cell lymphoma Extra Large

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

BRCA: BReast CAncer

C

Cdc: Cell division cycle

Cdk: Cyclin-dependent kinase

CD24/44: Cluster of Differentiation 24/44

CRD: Cysteine-Rich Domain

CSC: Cellule Souche Cancéreuse

D

DD: Death Domain

Dok: Downstream of tyrosine kinase

E

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: EGF Receptor

EphA2: Ephrin type-A receptor 2

ER: Estrogen Receptor

Erk: Extracellular signal-regulated kinase

F

FGF: Fibroblast Growth Factor

FLT3: FMS-Like Tyrosine kinase 3

Frs2: FGF receptor substrate 2

G

Gab: Grb2-associated-binding protein

GH: Growth Hormone

GIPC1: GAIP-interacting protein, C-terminus 1

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

H

HER-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HGF/SF: Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor

HSP90: Heat Shock Protein 90

I

IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1

IGFBP: IGF Binding Protein

I κ B: Inhibitor of kappa B

IKK: I κ B Kinase

IL-4/6: Interleukine-4/6

IRS: Insulin Receptor Substrate

J

JAK: Janus-associated Kinase

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

M

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MDGF-1: Mammary Derived Growth Factor-1

MEK: MAPK Kinase

MMP: Matrix MetalloProteinase

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

N

NEDD4-2: Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2

NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B

NGF: Nerve Growth Factor

NK: Natural Killer

ABRÉVIATIONS

NOMA-GAP: Neurite outgrowth
multiadaptor Rho-GTPase-activating protein
NRH2: Neurotrophin Receptor Homolog 2
NT: Neurotrophin
NTR3: Neurotensin Receptor 3

P

p75^{NTR}: p75 Neurotrophin Receptor
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
PgR: Progesterone Receptor
PI3-K: Phosphoinositide 3-Kinase
PLC- γ 1: Phospholipase C-gamma 1
PTB: Phosphotyrosine Binding domain
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog

R

RTK: Récepteur Tyrosine Kinase

S

SH2: Src homology 2
Shc: SH2-containing protein
SHP: SH2-containing tyrosine phosphatase
Sos: Son of sevenless
STAT: Signal Transducer and Activator of
Transcription

T

TGF: Transforming Growth Factor
TIMP-1: Tissue Inhibitor of
Metalloproteinase 1
TNF: Tumor Necrosis Factor
TRAF6: TNF receptor-associated factor 6
TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing
Ligand
Trk: Tropomyosin receptor kinase

U

uPA: urokinase-type Plasminogen Activator

V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
Vps10p: Vacuolar protein sorting 10 protein

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCÉRISATION

A. La glande mammaire normale

Le sein est une glande exocrine qui se développe au cours de la vie et qui, chez la femme, assure la sécrétion lactée suite à l'accouchement. Elle présente des aspects morphologiques et fonctionnels différents selon l'âge, mais également selon le sexe, puisqu'elle reste immature et non fonctionnelle chez l'homme.

1. Anatomie et histologie

La glande mammaire, de type tubulo-alvéolaire, est constituée principalement d'un tissu adipeux qui repose sur les muscles pectoraux et le derme à l'aide de bandes de tissu conjonctif (ligaments de Cooper) et de crêtes fibro-glandulaires (crêtes de Duret) (Figure 1). La peau qui entoure le mamelon, l'aréole, est pigmentée et contient des glandes sébacées (glandes de Morgani) qui s'hypertrophient à la grossesse et prennent alors le nom de tubercules de Montgomery. Les sécrétions de ces glandes participent probablement à la protection du mamelon et de l'aréole lors de l'allaitement.

La glande mammaire comprend de 10 à 20 lobes, subdivisés en 20 à 40 lobules, constitués eux-mêmes de 10 à 100 alvéoles ou *acini* (Figure 2). Un canal unique, galactophore (ou canal lactifère), draine chaque lobe par l'intermédiaire d'un orifice propre pour permettre la sécrétion lactée au niveau du mamelon. Juste avant de s'ouvrir à la surface, le canal galactophore forme une dilatation appelée sinus lactifère. A l'intérieur de chaque lobe, le canal principal se ramifie en de nombreuses branches pour former les canaux terminaux. Chaque canal terminal forme avec le lobule associé une unité terminale ducto-lobulaire (UTDL). Ces unités sont très sensibles aux variations hormonales et il est admis que la plupart des lésions mammaires mastosiques et carcinomateuses se développent à partir de l'UTDL. Les lobules sont séparés les uns des autres par du tissu conjonctif moyennement dense, tandis que le tissu conjonctif entourant les canaux à l'intérieur de chaque lobule est moins fibreux et plus vascularisé.

INTRODUCTION

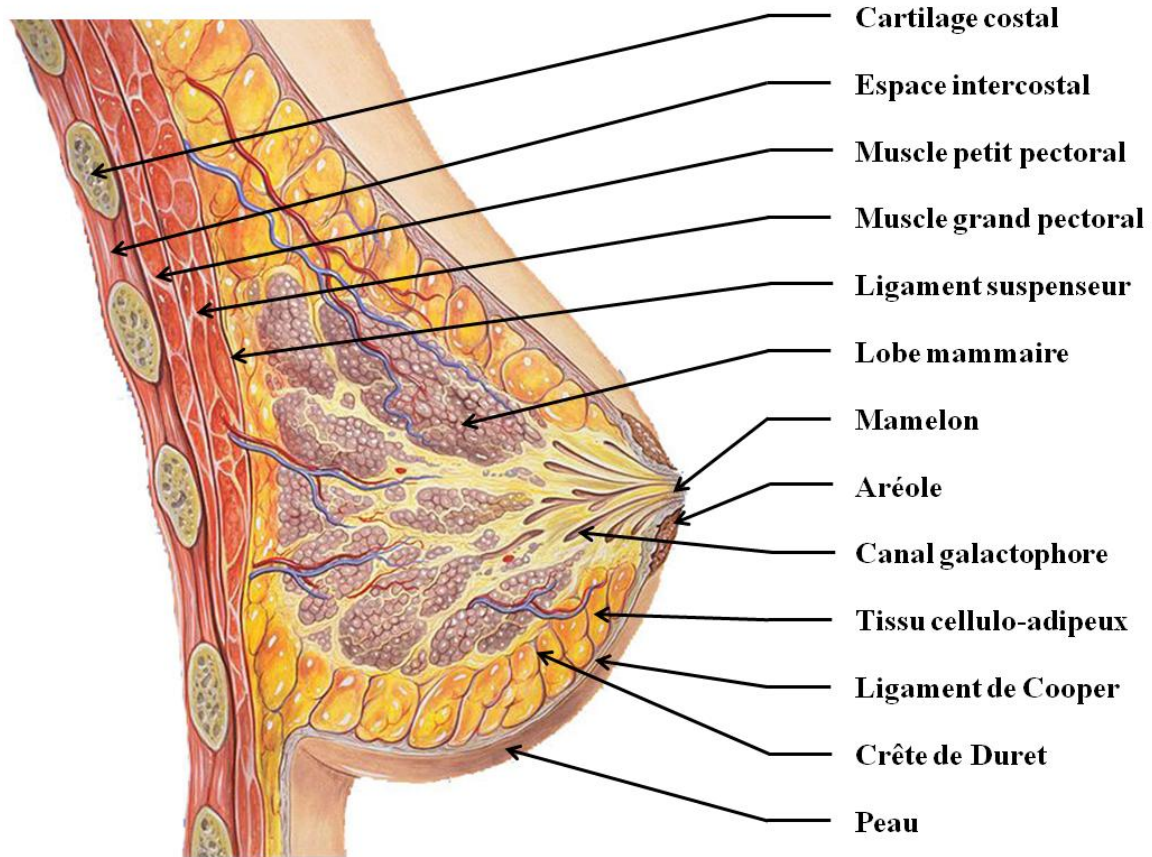


Figure 1 : Anatomie et structure de la glande mammaire

Représentation schématique en coupe de la glande mammaire. La glande mammaire est une masse de tissu glandulaire, de forme circulaire, située à la face antérieure des muscles pectoraux. Elle est constituée d'une dizaine de canaux galactophores aboutissant, par dichotomie, dans 10 à 20 lobes mammaires et permettant la sécrétion lactée au niveau du mamelon. A sa face antérieure, un tissu cellulo-adipeux double la peau sauf au niveau de l'aréole et du mamelon. Ce tissu présente des lamelles conjonctives (ligaments de Cooper) qui attachent, via une série de crêtes fibro-glandulaires (crêtes de Duret), la glande mammaire au derme. A sa face postérieure, un autre tissu cellulo-adipeux constitue le ligament suspenseur du sein. Adapté de Medical Illustrations by Patrick J. Lynch.

La glande mammaire est structurée, en dehors du tissu adipeux, par deux tissus distincts que sont les canaux excréteurs et le tissu conjonctif. Elle est donc composée de plusieurs types cellulaires différents en termes de morphologie et de fonctionnalité. Le système alvéolo-lobulo-canaire est formé d'une assise continue de cellules épithéliales cubiques sécrétrices de lait, doublée d'une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales fusiformes contractiles. Ces deux couches cellulaires sont délimitées par une membrane basale et baignent dans le stroma, ou tissu palléal, formé d'une matrice extracellulaire (notamment des fibres de collagène), d'adipocytes, de fibroblastes, de macrophages et de vaisseaux sanguins nécessaires au développement de l'épithélium mammaire (Figure 3). En réponse au stimulus de succion, les cellules myoépithéliales se contractent et permettent l'éjection du lait dans les canaux alvéolaires, lobulaires et galactophores.

INTRODUCTION

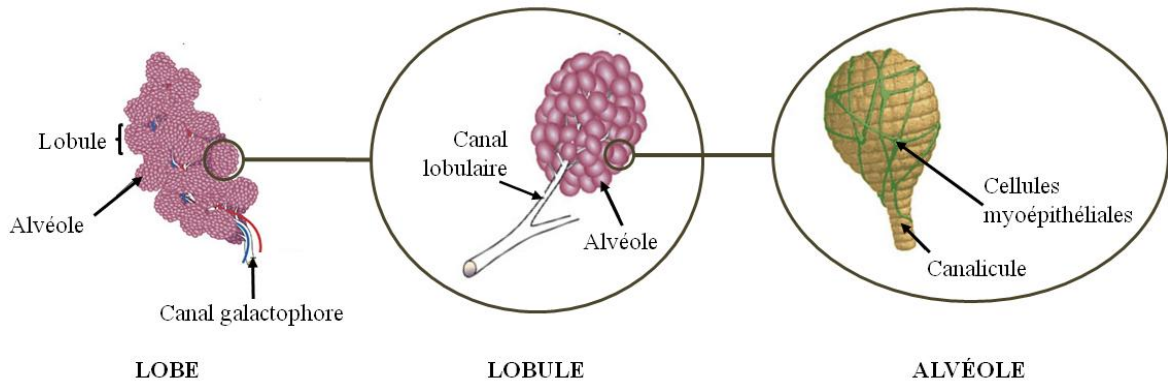


Figure 2 : Structure du lobe mammaire

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

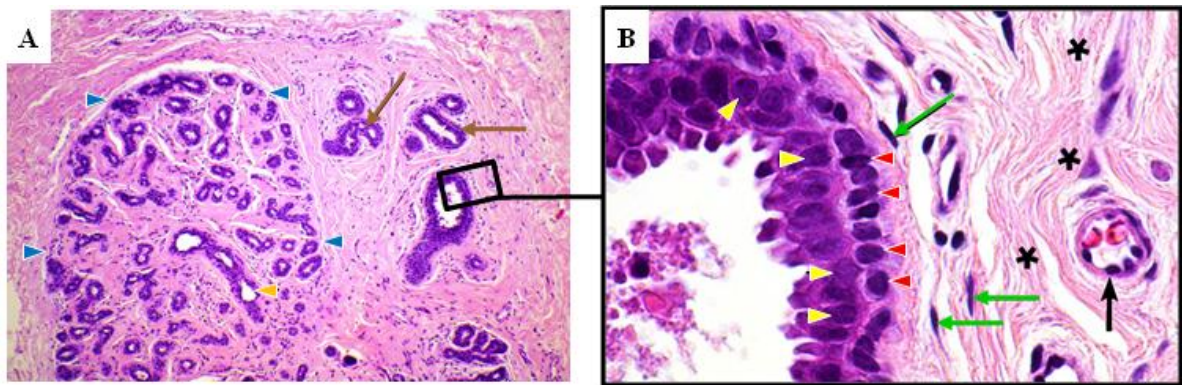


Figure 3 : Histologie de la glande mammaire normale

A) Lobule mammaire post-pubertaire hors lactation. Les flèches bleues délimitent le lobule et la flèche orange indique le canal terminal alvéolaire menant au réseau canalaire (flèches marron). Les fibres roses de la matrice extracellulaire (surtout du collagène) s'enroulent concentriquement autour des lobules et canaux formant un véritable tissu de soutien.

B) Agrandissement de la coupe A (rectangle noir). Les flèches rouges indiquent les cellules myoépithéliales du canal, les flèches jaunes montrent l'assise de cellules épithéliales du canal, les flèches vertes indiquent les fibroblastes péri-canaliaires parallèles à la lame basale, les astérisques représentent les fibres de collagène et la flèche noire une artériole. Adapté de *Biology of the mammary gland*: <http://mammary.nih.gov>.

2. Développement et contrôle

L'architecture et la taille de la glande mammaire varient tout au long de la vie du stade fœtal à la ménopause, en passant par la puberté et la gestation. Ce développement est transitoire et par conséquent hautement contrôlé par différentes hormones qui vont

INTRODUCTION

participer, en synergie avec le microenvironnement palléal, à la régulation de son homéostasie (Figure 4) (Sternlicht, 2006).

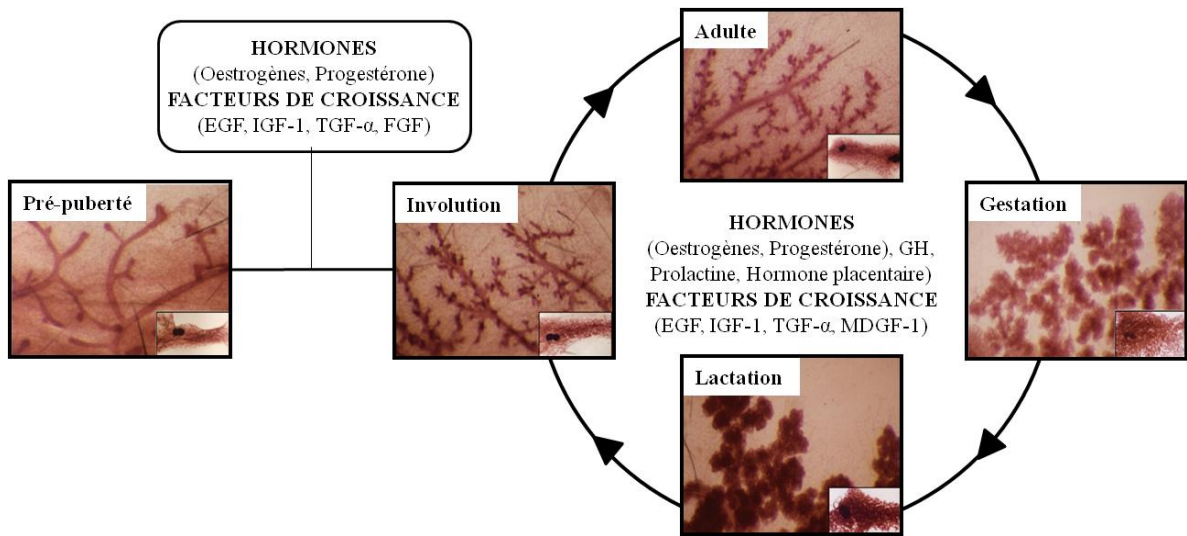


Figure 4 : Développement de la glande mammaire

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 hormones lactogènes induisent la différenciation des cellules épithéliales des acini en cellules productrices de lait. Le sevrage entraîne la disparition de ces cellules et l'involution de la glande. Photos de glandes mammaires murines (Zhou et al., 2005).

Les structures de base de la glande mammaire sont formées durant la vie fœtale, à partir d'un bourgeon de l'ectoderme, mais elles demeurent encore très rudimentaires à la naissance. En effet, le sein reste quiescent pendant l'enfance et la croissance se limite à quelques canaux qui se terminent par des bourgeons constitués de cellules épithéliales. Au moment de la puberté, sous l'influence des stéroïdes sexuels (œstrogènes, progestérone) mais aussi de l'hormone de croissance (*Growth Hormone, GH*) et de corticostéroïdes, survient une phase de croissance des canaux et du stroma. Au cours de la grossesse, les alvéoles se développent rapidement, prenant la place du tissu adipeux qui se trouve réduit. En effet, pendant la gestation, les concentrations plasmatiques de progestérone, d'œstrogènes et d'hormone lactogène placentaire sont élevées, conduisant à une croissance des canaux galactophores et à une différenciation des *acini* glandulaires. La progestérone et les œstrogènes agissent à la fois de manière directe sur les cellules épithéliales et indirecte sur les cellules mésenchymateuses qui sécrètent alors des facteurs de croissance comme l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*), le MDGF-1 (*Mammary-Derived Growth Factor-1*), le

INTRODUCTION

TGF- α et le TGF- β (*Transforming Growth Factor*). Ces facteurs de croissance régulent, de façon paracrine, la prolifération et la différenciation de l'épithélium mammaire. Les œstrogènes entraînent également la synthèse de protéases (uPA, *urokinase-type Plasminogen Activator*; MMP-2, -3, -14, *Matrix MetalloProteinase*, ADAM17/TACE, *A Disintegrin And MetalloProteinase 17/TNF- α Converting Enzyme*) qui, en dégradant localement la matrice extracellulaire, contribuent à la migration et la prolifération des cellules épithéliales nécessaires à la mise en place de l'arborescence galactophorique (Sternlicht *et al.*, 2006). A la fin de la grossesse, les cellules épithéliales alvéolaires se polarisent et deviennent ainsi fonctionnelles. Après l'accouchement, suite à l'élimination du placenta, l'équilibre progestérone/prolactine est renversé en faveur de la production de lait. A la fin de la lactation, la glande mammaire involue : l'activité sécrétoire cesse et la glande retourne à un état moins différencié par apoptose des cellules épithéliales, myoépithéliales et des fibroblastes.

B. Le cancer du sein

1. Généralités

Le cancer du sein est le premier cancer féminin en termes d'incidence et de mortalité. Dans le monde, plus de 1 150 000 nouveaux cas surviennent chaque année, dont plus de la moitié dans les pays développés (Europe de l'Ouest, Amérique du Nord). Il est responsable, par an, de plus de 400 000 décès (World cancer report, OMS, 2008). En France, en 2010, 52 600 nouveaux cas ont été dénombrés soit 1/3 des cancers féminins et 11 500 décès lui ont été attribués représentant 20% des décès féminins par cancer. Statistiquement, une femme sur huit sera concernée par le cancer du sein au cours de sa vie. Il faut noter que le cancer du sein peut survenir aussi chez l'homme mais il est rare et environ 200 fois moins fréquent que chez la femme (données : Institut National du Cancer et Institut National de Veille Sanitaire).

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

INTRODUCTION

Le cancer du sein est une pathologie à évolution lente. Il faut compter environ 6 à 8 ans pour qu'à partir d'une seule cellule apparaisse une tumeur d'un volume de 1 cm³, détectable par mammographie classique. L'amélioration des techniques d'imagerie et la campagne intensive de dépistage pour les femmes de plus de 50 ans en France a permis une prise en charge précoce des patientes atteintes d'un cancer du sein. Cependant, durant la période infra-clinique, où la tumeur est indétectable, celle-ci évolue et peut passer d'un stade *in situ* (non invasif) à un stade invasif qui mènera, *via* les voies lymphatiques ou sanguines, à l'apparition de métastases principalement pulmonaires, hépatiques et osseuses (Weigelt *et al.*, 2005).

2. Les tumeurs mammaires

a. *Les types de cancer du sein*

Les tumeurs du sein peuvent être dites **bénignes**, c'est-à-dire bien limitées et encapsulées. Elles ont alors une croissance lente et locale et ne récidivent pas après exérèse. La plus fréquente des tumeurs bénignes est l'adénofibrome, le plus souvent découvert avant 30 ans. Les tumeurs **malignes** sont, quant à elles, mal délimitées et non-encapsulées. Les cellules ont une croissance rapide et tendent à infiltrer et détruire les tissus adjacents. La grande majorité (plus de 95% des cas) des tumeurs malignes sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire issues de la cancérisation de l'épithélium glandulaire à partir soit des cellules des canaux (cancer canalaire), soit des cellules des lobules (cancer lobulaire). Les adénocarcinomes peuvent eux-mêmes être subdivisés en fonction de leurs caractéristiques d'infiltration des tissus environnants (Figure 5). On distingue alors les carcinomes *in situ* non invasifs des carcinomes infiltrants ou invasifs :

- **Les carcinomes *in situ* (non infiltrants)** : les cellules épithéliales malignes vont proliférer dans la lumière soit du canal galactophore, on parle alors d'un carcinome canalaire *in situ* (CCIS), soit des *acini* situés dans les lobules, il s'agit alors d'un carcinome lobulaire *in situ* (CLIS). Dans tous les cas, la membrane basale reste intacte et le tissu conjonctif n'est pas envahi. Les carcinomes mammaires *in situ* sont rares (2 à 3% des cas) et généralement de bon pronostic mais peuvent toutefois évoluer, dans 20 à 50% des cas, vers une forme infiltrante.
- **Les carcinomes invasifs (ou infiltrants)** : les carcinomes dits infiltrants présentent un envahissement du tissu environnant, après traversée de la membrane basale par

INTRODUCTION

les cellules cancéreuses. Ils représentent la grande majorité des cancers du sein (98%) et sont le plus souvent canaux (75%) ou lobulaires (4 à 11%). Il existe d'autres formes, plus rares et de bon pronostic, que sont les carcinomes tubuleux, mucineux, médullaires ou encore les carcinomes apocrines, adénoïdes kystiques et cribriformes (Yerushalmi *et al.*, 2009).

- **Les cancers métastatiques** : les cellules néoplasiques des carcinomes invasifs envahissent le tissu mammaire environnant et peuvent disséminer à partir d'une tumeur primaire, *via* le réseau lymphatique ou les vaisseaux sanguins. Les premiers relais ganglionnaires (ganglions sentinelles ou axillaires puis les ganglions des chaînes mammaires internes et sub-claviculaires) sont alors colonisés et peuvent être à l'origine d'une dissémination générale du cancer. Cet envahissement des ganglions lymphatiques est le reflet du potentiel métastatique des cellules tumorales et est important dans le pronostic de la tumeur.

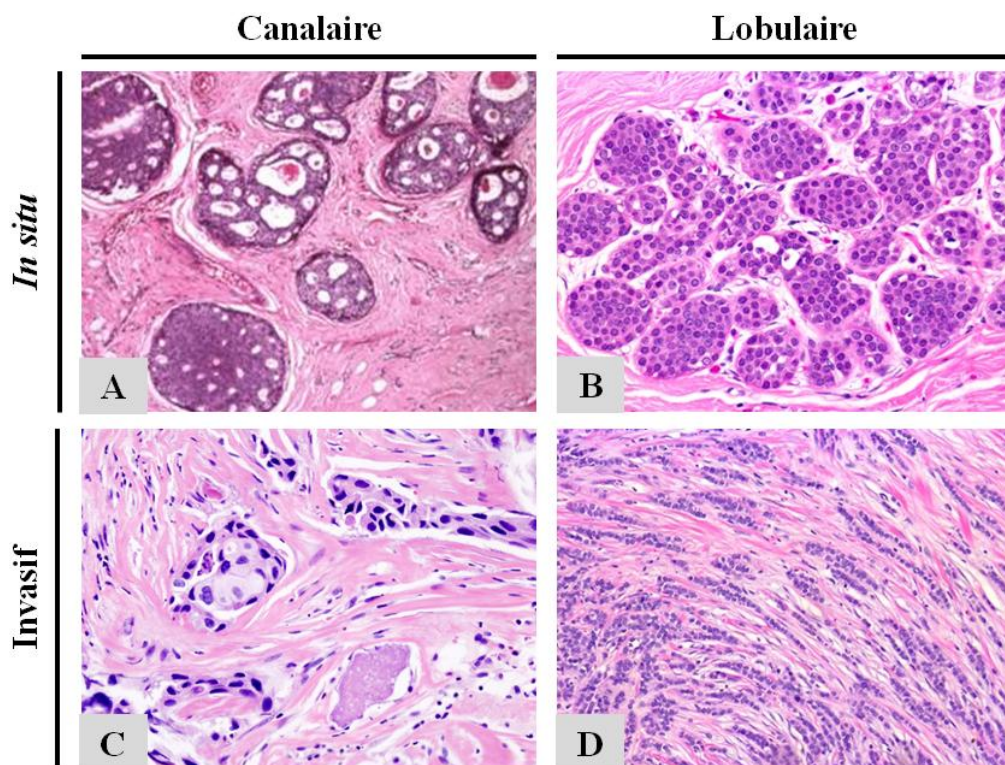


Figure 5 : Histologie des principaux types de cancer du sein

Coupes histologiques de carcinomes in situ canaux (A) et lobulaires (B) et de carcinomes invasifs canaux (C) et lobulaires (D). Les coupes sont marquées à l'hématoxyline et à l'éosine.

Images issues du site : <http://www.hopkinsbreastcenter.org/pathology/malignant/>.

INTRODUCTION

Les carcinomes *in situ* et invasifs sont parfois associés (0,7 à 4% des cas) à un adénocarcinome intra-épidermique de la région de l'aréole, connu sous le nom de la maladie de Paget.

b. Classifications des cancers du sein

La classification des cancers du sein est en constante évolution et à l'heure actuelle, il n'est plus possible de parler de stades précoces et de stades tardifs. En effet, cette terminologie repose sur la notion obsolète d'une progression tumorale régulière. En revanche, il est toujours important de classer les tumeurs dans le but de créer des groupes homogènes, d'un point de vue pronostique mais également thérapeutique. Ainsi, la classification TNM, datant de 1987, est basée sur l'extension tumorale à la fois locale (Tumeur), régionale (Node ou ganglion) et générale (Métastase). Plus récemment, une classification moléculaire a également été adoptée, tenant compte de l'expression de différents gènes.

- **Classification TNM** : elle est fondée sur l'extension anatomique de la tumeur, déterminée par la clinique et l'histopathologie, au niveau loco-régional (T0 à T4), ganglionnaire (N0 à N3) et métastatique (M0 ou M1). Ainsi, les chiffres associés à chaque critère augmentent en fonction de la gravité du cancer. 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 atteint, plus ou moins proche de la tumeur, des dimensions des adénopathies, de leur nombre et de leur éventuelle fixation aux tissus voisins. Enfin, la lettre M est notée M0 en absence de métastases ou M1 en leur présence, quelque soit leur siège, unique ou multiple. Cette classification permet donc de définir différents stades (Tableau 1).

INTRODUCTION

| 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 | N1 | M0 | Tumeur de 2 à 5 cm et/ou atteinte ganglionnaire satellite mineure |
| | T2 | N0/1 | | |
| | T3 | N0 | | |
| III | T0/1/2 | N2 | M0 | Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure |
| | T4 | N0/1/2 | | |
| | Tout T | N3 | | |
| IV | Tout T | Tout N | M1 | Tumeur avancée localement et métastases à distance |

Tableau 1 : Classification TNM des stades de cancer du sein

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

- Classification moléculaire** : à l'heure actuelle, le choix de la thérapeutique et l'établissement du pronostic, chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, sont basés principalement sur la détermination du statut des récepteurs hormonaux (ER α et PgR ; *Estrogen Receptor, Progesterone Receptor*) et de l'oncoprotéine HER-2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*). Ainsi, ces marqueurs sont détectés par immunohistochimie, mais également par hybridation *in situ* pour HER-2, associée à l'évaluation de l'indice de prolifération par un marquage anti-Ki67. Cette analyse histopathologique des tumeurs a pu être affinée grâce aux techniques d'analyse génomique à large échelle dont les puces à ADN. Ainsi, 5 sous-types de carcinomes mammaires ont été décrits, pour la première fois en 2000, par l'équipe de Perou 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 (Tableau 2) (Perou *et al.*, 2000 ; Sorlie *et al.*, 2001 ; Sotiriou *et al.*, 2003 ; Brenton *et al.*, 2005).

INTRODUCTION

| Sous-type | Description |
|--------------------|---|
| Luminal A | Cancers de bas grade, présentant une réceptivité hormonale importante (ER α ++) et une faible prolifération. Expression des cytokératines 8, 18 et du gène <i>GATA3</i> impliqué dans le contrôle de la croissance et le maintien de la différenciation des tumeurs ER α +. Généralement traités par hormonothérapie et de bon pronostic. p53 muté dans moins de 15% des cas. |
| Luminal B/C | Expression de l'ER α moins importante 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. |
| HER-2 | Surexpression de HER-2 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 (Herceptine®). p53 muté dans environ 70% des cas. |
| Basal-like | Tumeurs dites « triple négatives », c'est-à-dire n'exprimant pas les récepteurs hormonaux (ER et PgR) et ne surexprimant pas le récepteur HER-2. Expression des cytokératines basales 5/6, 14 et 17, des cavéolines 1 et 2, de l'EGFR (<i>EGF Receptor</i>) et de c-kit. p53 muté dans 80% des cas et tumeurs souvent associées à une mutation de BRCA1 (<i>BReast CAncer1</i>). 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-angiogènes. |
| 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. |

Tableau 2 : Classification moléculaire des cancers du sein

Description des 5 sous-types de cancer du sein basés sur l'expression spécifique de certains gènes (Sorlie et al., 2001). Les cancers de sous-types « luminal » représentent environ 70% des cancers du sein, les « basal-like » 10 à 20%, les « HER-2 » 7 à 15% et les « normal-like » 5 à 10%.

3. Mécanismes de la tumorigenèse mammaire

a. Stades de développement d'un cancer

La tumorigenèse mammaire est un processus évolutif, de la transformation cancéreuse d'une cellule puis son expansion clonale et sa croissance en une masse tumorale (cancer primaire) jusqu'à la formation de foyers métastatiques à distance. La figure 6 décrit les différentes étapes de la cancérisation de l'épithélium canalaire mammaire.

INTRODUCTION

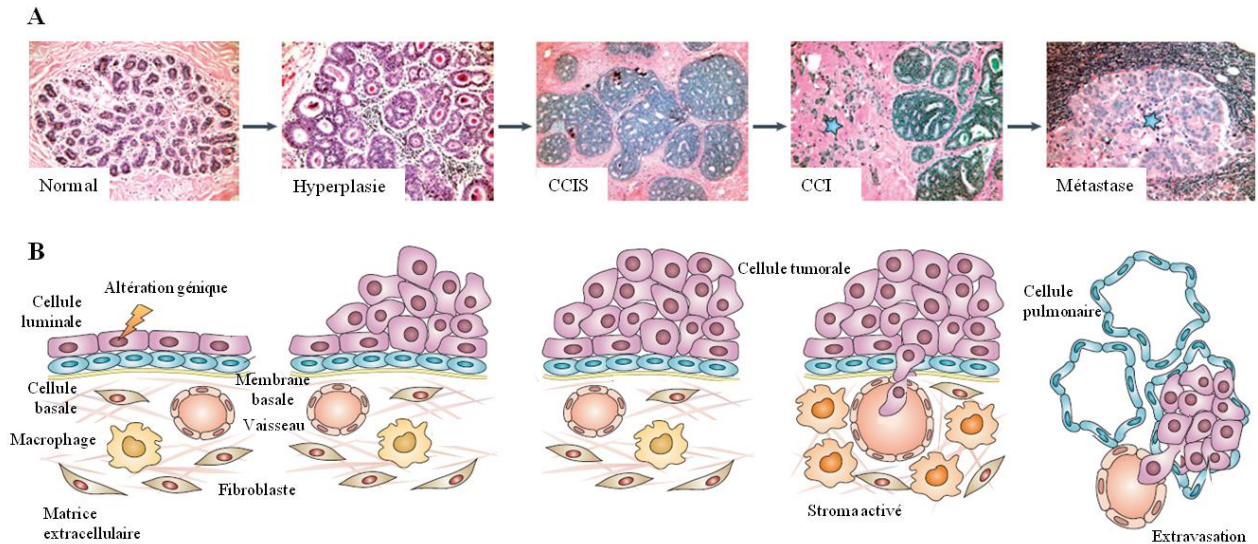


Figure 6 : Etapes de la cancérisation d'un épithélium canalaire mammaire

Suite à une altération de leur génome, les cellules de l'épithélium mammaire normal vont proliférer de façon anarchique jusqu'au stade de l'hyperplasie atypique. Les cellules se dédifférencient, acquièrent des modifications structurales et prolifèrent au niveau local pour donner un carcinome in situ. Les cellules vont ensuite, grâce aux modifications phénotypiques, pouvoir passer la membrane basale pour se disséminer dans le tissu conjonctif adjacent et former un cancer invasif. La tumeur devenue invasive continue de se développer et colonise différents organes pour former des métastases distantes. Les différentes étapes sont illustrées : A) par des coupes histologiques d'un tissu mammaire normal, d'une hyperplasie de la glande, d'un carcinome canalaire in situ (CCIS), d'un carcinome canalaire invasif (CCI) et d'une métastase dans un nœud lymphatique. B) par des représentations schématiques de l'épithélium mammaire et du tissu palléal environnant (Vargo-Gogola & Rosen, 2007).

L'évolution du tissu normal en cancer passe par les stades suivants :

-l'**hyperplasie** : lors de l'initiation, une cellule est génétiquement modifiée, conduisant à une prolifération accrue. Dans le cas du cancer du sein, il s'agit d'une prolifération intracanaulaire de cellules épithéliales de sous-types luminal et basal.

-la **dysplasie** : en plus d'une multiplication anarchique, une dédifférenciation des cellules est observée, accompagnée d'anomalies cyto-nucléaires et d'une désorganisation architecturale. Ce stade n'existe qu'au niveau épithélial (dysplasie et hyperplasie sont notées comme des lésions pré-cancéreuses).

-le **carcinome in situ** : les cellules épithéliales prolifèrent uniquement au niveau local, sans franchir la membrane basale.

-le **carcinome invasif** : les cellules tumorales envahissent le tissu conjonctif. Le franchissement de la membrane basale est une étape décisive de la cancérogenèse car il apporte la preuve que les cellules cancéreuses ont acquis des propriétés nécessaires à

INTRODUCTION

l'invasion du stroma (perte de l'adhérence et de l'inhibition de contact, sécrétion de protéases, augmentation de l'angiogenèse).

-les métastases : les cellules néoplasiques essaient à partir de la tumeur primaire par les voies lymphatiques et sanguines et colonisent un nouvel organe à distance pour former une tumeur secondaire.

La transformation progressive des cellules normales en cellules tumorales est due à une succession d'altérations géniques conduisant à l'acquisition d'un phénotype pro-tumoral. Six modifications essentielles dans la physiologie cellulaire permettent aux cellules transformées de prendre l'ascendant sur les cellules saines (Hanahan & Weinberg, 2000 ; Hahn & Weinberg, 2002) :

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

Récemment, Hanahan et Weinberg ont proposé deux caractéristiques émergentes pouvant intervenir dans le développement tumoral : la reprogrammation du métabolisme énergétique pour supporter la croissance accrue des cellules cancéreuses et l'échappement à la destruction par le système immunitaire (Hanahan & Weinberg, 2011).

b. Altérations géniques

Les altérations géniques peuvent provoquer une inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs par mutations ou délétions et/ou l'activation d'oncogènes notamment par amplification génique (Walsh & King, 2007 ; Mavaddat *et al.*, 2010).

Le nombre d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs recensés ne cesse de s'accroître ; ils codent des protéines impliquées dans de nombreuses cascades de transduction telles que des récepteurs aux facteurs de croissance, des facteurs de transcription ou des protéines du cycle cellulaire (Figure 7) (Lee & Muller, 2010).

INTRODUCTION

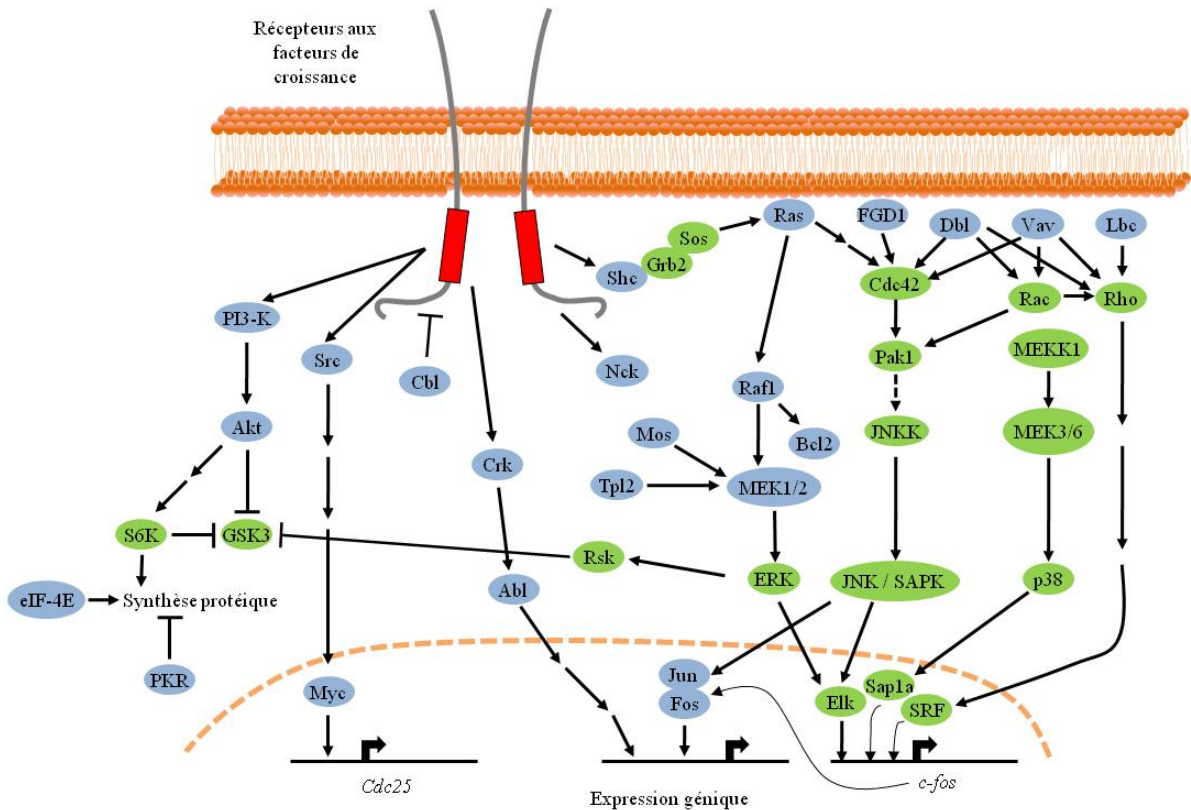


Figure 7 : Implication des protéines oncogéniques et suppresseurs de tumeurs dans les cascades de transduction des facteurs de croissance

Suite à l'activation des récepteurs aux facteurs de croissance, différentes voies de signalisation intracellulaires sont engagées pour conduire à l'expression de gènes spécifiques. Dans ces voies, vont être impliquées des protéines oncogéniques (fond bleu) et des anti-oncogènes (suppresseurs de tumeurs ; fond vert) (Hunter, 1997).

✓ Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs

Un gène suppresseur de tumeurs est défini comme tout gène dont la perte de fonction participe à l'oncogenèse. Certains jouent un rôle fondamental dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, on les appelle « gatekeepers » comme ceux de la protéine Rb (*Retinoblastoma*), inhibiteur du cycle cellulaire ou de PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), inhibiteur de la PI3-K (*Phosphoinositide 3-Kinase*). D'autres sont impliqués dans la réparation de l'ADN, ce sont les garants de la stabilité génomique ou « caretakers » tels que TP53 ou BRCA. Enfin, certains gènes peuvent moduler le microenvironnement cellulaire et l'implantation tumorale, ce sont les « landscapers » (codant l'E-cadhérine ou CD44 ; *Cluster of Differentiation 44*). La participation des gènes suppresseurs de tumeurs à l'oncogenèse nécessite le plus souvent une altération concomitante des deux allèles du même gène, nécessaire pour aboutir à une perte de fonction. Selon le modèle de Knudson expliquant les syndromes de prédisposition héréditaire aux cancers, cette situation peut

INTRODUCTION

également arriver lorsqu'un allèle est altéré dans la lignée germinale (donc dans toutes les cellules de l'organisme), la seconde altération survenant de façon sporadique sur le deuxième allèle (Knudson, 2001). Voici quelques exemples de gènes suppresseurs de tumeurs mutés dans le cancer du sein :

- **RBI**, premier gène suppresseur de tumeurs découvert, joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S. Selon son état de phosphorylation (régulé par les complexes cycline/cdk ; *cyclin-dependent kinase*), la protéine Rb va libérer ou non le facteur de transcription E2F, indispensable à cette transition. La perte du contrôle du point de restriction par Rb conduit donc à une prolifération anarchique des cellules. Dans le cancer du sein, on observe une perte d'expression de la protéine Rb ou une perte d'hétérozygotie dans 25 à 30% des cas (Bosco & Knudsen, 2007).
- **p53**, également appelé « gardien du génome », est responsable de l'arrêt temporaire du cycle cellulaire permettant la réparation des éventuels dommages à l'ADN. Lorsque les lésions sont trop importantes, p53 peut alors orienter la cellule vers l'apoptose, débarrassant ainsi l'organisme des cellules potentiellement malignes. En règle générale, sa perte de fonction est liée à une délétion d'un des allèles et à une mutation du second. Des mutations du gène *TP53* sont retrouvées dans 25% des cancers du sein (*IARC TP53 database, Novembre 2010*) et sont associées à un mauvais pronostic (Lacroix *et al.*, 2006).
- **BRCA1** et **BRCA2** sont des gènes suppresseurs de tumeurs dont les mutations prédisposent aux cancers du sein mais également aux cancers de l'ovaire, du pancréas et de la prostate. On estime aujourd'hui qu'une femme porteuse de l'un de ces gènes mutés a un risque de développer un cancer du sein avant 50 ans évalué entre 30 et 50% contre un risque de 2% pour la population générale. Ces gènes codent des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN mais aussi dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la régulation de la transcription *via* leur interaction avec Rad51, p53 ou encore l'ARN polymérase II (Venkitaraman, 2002).

INTRODUCTION

✓ *Activation d'oncogènes*

Tout gène dont l'activation contribue au développement cancéreux est considéré comme oncogène. Leur activation peut se faire par amplification génique (surproduction de la protéine), par mutation (activation constitutive de l'oncoprotéine) ou par translocation chromosomique (oncoprotéine chimérique avec une activité accrue). Ces oncogènes codent des protéines impliquées dans la transduction des signaux de prolifération (FGF, PDGF, *Platelet-Derived Growth Factor*, EGFR, HER-2, Ras, MEK, *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*, Myc, Jun...), dans le contrôle du cycle cellulaire (cycline D1, Cdk4, Cdc25, *Cell division cycle*), dans la régulation négative de l'apoptose (Bcl-2, *B-cell lymphoma-2*, Bcl-XL, *B-cell lymphoma-extra large*, survivine), dans la dissémination métastatique (métalloprotéases, protéines d'adhésion cellulaire) ou encore dans l'angiogenèse. Dans le cancer du sein, les oncogènes sont principalement activés par amplification génique alors que les mutations ponctuelles, insertions, délétions ou réarrangements ne sont que très rarement observés (Osborne *et al.*, 2004). Les amplifications les plus fréquentes dans le cancer du sein concernent les oncogènes *MYC*, *ERBB2* et *CCND1*.

- ***MYC*** est localisé sur le chromosome 8q24 et code une phospho-protéine nucléaire (c-myc) qui régule la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Il est amplifié dans environ 15 à 25% des cancers du sein et plusieurs études montrent une corrélation avec des tumeurs de haut grade et un mauvais pronostic (Xu *et al.*, 2010).
- ***ERBB2***, localisé en 17q21-22, code le récepteur tyrosine kinase orphelin Erb-B2 (HER-2) de la famille des récepteurs de l'EGFR (Erb-B1). Il est impliqué dans de nombreux processus tels que la prolifération, l'angiogenèse, les interactions cellules/cellules, la formation de métastases ou encore la résistance à l'apoptose *via* l'activation des voies de signalisation des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) ou PI3-K/Akt (Moasser, 2007). L'amplification du gène *ERBB2* est parfaitement corrélée à la surexpression de sa protéine et est retrouvée dans environ 15 à 20% des cancers du sein. Les tumeurs HER-2+ sont le plus souvent de haut grade histologique, associées à un phénotype invasif et à un mauvais pronostic. Elles sont, pour la plupart, négatives pour les récepteurs hormonaux et par conséquent résistantes à l'hormonothérapie mais également à certaines

INTRODUCTION

chimiothérapies. Ces tumeurs font aujourd'hui l'objet de traitements ciblés, basés soit sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-HER-2, le trastuzumab (Herceptine[®]), soit sur un inhibiteur de tyrosine kinase spécifique de HER-2 et de l'EGFR, le lapatinib (Tyverb[®]). Actuellement, une nouvelle génération d'agents thérapeutiques plus spécifiques ou ciblant, par exemple, la dimérisation du récepteur, sont entrés en phase clinique (Dean-Colomb & Esteva, 2008).

- **CCND1**, localisé sur le chromosome 11q13, code la cycline D1, régulateur majeur des transitions G1/S et G2/M mais également facteur de transcription. La surexpression de cette cycline est retrouvée dans environ 50% des carcinomes mammaires alors que l'amplification de son gène n'est présente que dans 15% des cas (Arnold & Papanikolaou, 2005). Cette différence s'explique par le fait que d'autres facteurs tels que les œstrogènes ou p53 (*via* p21^{WAF1}) interviennent dans la surexpression de la cycline D1. De plus, il a été montré que cette surexpression était corrélée à une résistance aux traitements par le tamoxifène dans les cancers hormono-dépendants (Stendahl *et al.*, 2004).
- Bien que rare (moins de 0,15% des carcinomes mammaires), le réarrangement **ETV6-NTRK3** est retrouvé dans plus de 90% des cancers sécrétoires (Tognon *et al.*, 2002). Cette translocation t(12;15) (p13q25) crée une protéine chimérique avec la partie N-terminale du variant 6 de la famille des facteurs de transcription Ets (*E-twenty six*) et le domaine kinase du récepteur TrkC (*Tropomyosin receptor kinase*). L'oncogène ainsi formé est capable de transformer des cellules mammaires normales et est associé à la formation de tumeurs de type basal. Ces tumeurs sont néanmoins associées à un bon pronostic (Lae *et al.*, 2009). Par ailleurs, une étude récente a montré que la transformation cellulaire induite par cette translocation pouvait être inhibée en ciblant le récepteur à l'IGF-1 (Tognon *et al.*, 2011).

c. Origine cellulaire

L'origine cellulaire des cancers a longtemps été appréhendée par le modèle dit **stochastique** dans lequel chaque cellule d'un tissu, même différenciée, peut, à la suite de l'accumulation de mutations acquises de façon aléatoire, proliférer de façon indéfinie et former un clone tumoral indépendant. C'est le concept d'origine clonale des tumeurs (Kleinsmith & Pierce, 1964). Cependant, certaines observations sont difficilement conciliables avec ce modèle. En particulier, les cellules différenciées prolifèrent peu et sont

INTRODUCTION

souvent renouvelées, ce qui rend la probabilité d'accumuler des mutations très faible. De plus, la plupart des tumeurs, y compris les tumeurs mammaires, sont très hétérogènes et présentent divers degrés de différenciation et de transformation ; il est alors difficile de comprendre comment une cellule bien différenciée peut aboutir à un panel de cellules moins différenciées. Enfin, si on considère que chaque cellule cancéreuse arbore un nombre de mutations suffisant pour former une tumeur, il est difficile d'expliquer que l'on ait besoin d'injecter un très grand nombre de ces cellules pour former une nouvelle tumeur dans les modèles expérimentaux de xéno greffes (Shipitsin & Polyak, 2008 ; Shackleton *et al.*, 2009).

Ces différentes questions trouvent réponse dans un concept plus récent : le modèle **hiérarchique**. En effet, de nombreuses données montrent, comme pour le système hématopoïétique, que les tissus épithéliaux sont sujets à un remodelage constant hautement régulé. Ce renouvellement tissulaire implique une hiérarchie cellulaire qui comprend des cellules souches donnant naissance à des cellules progénitrices précoces puis tardives. Cette notion présente plusieurs avantages conceptuels ; tout d'abord, les cellules souches ou progénitrices sont capables de donner naissance à tous les types cellulaires du tissu dans lequel elles se trouvent. De plus, elles sont caractérisées par un potentiel de renouvellement illimité ce qui font d'elles de parfaits candidats susceptibles d'acquérir les modifications génétiques nécessaires à l'initiation de la transformation tumorale. C'est en 1997 que le terme de cellules souches cancéreuses (CSC) apparaît pour la première fois, grâce aux travaux de l'équipe de John Dick sur la leucémie où il a démontré que seule une petite partie des cellules tumorales était capable d'initier un cancer dans un modèle animal et que ces cellules partageaient des propriétés propres aux cellules souches (Bonnet & Dick, 1997). Depuis, des CSC ont été isolées dans de nombreux cancers, y compris le cancer du sein (Charafe-Jauffret *et al.*, 2008).

Dans les tumeurs mammaires, les CSC proviendraient directement des cellules souches normales adultes de l'épithélium et seraient le seul lieu des altérations génétiques primaires (Figure 8). Ainsi, les caractéristiques de ces CSC vont être celles des cellules souches normales à savoir l'auto-renouvellement, la longue durée de vie, la capacité à reproduire l'hétérogénéité cellulaire, auxquelles s'ajoutent d'autres propriétés acquises à la suite des altérations génétiques, comme la prolifération continue et l'autonomie vis-à-vis de la « niche » environnementale dans laquelle se développent les cellules souches (Polyak & Hahn, 2006 ; Clevers, 2011). Dans la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7, il a été estimé que les CSC ne représentaient que 2% de la population totale mais que seuls ces 2%

INTRODUCTION

étaient capables de former une tumeur et de reconstituer l'hétérogénéité initiale de la lignée MCF-7 après injection dans des souris NOD/SCID (*Non-obese diabetic/Several Combined ImmunoDeficiency*) (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 ($CD44^+/CD24^{-/faible}$) (Al-Hajj *et al.*, 2003 ; Ponti *et al.*, 2005). Toutefois, il existe des divergences sur la pertinence de ces marqueurs moléculaires et il se pourrait que les caractéristiques des cellules dites « CSC » ne soient qu'un phénotype associé aux avantages sélectifs que confère l'accumulation des altérations du génome pendant l'évolution tumorale (Shipitsin & Polyak, 2008).

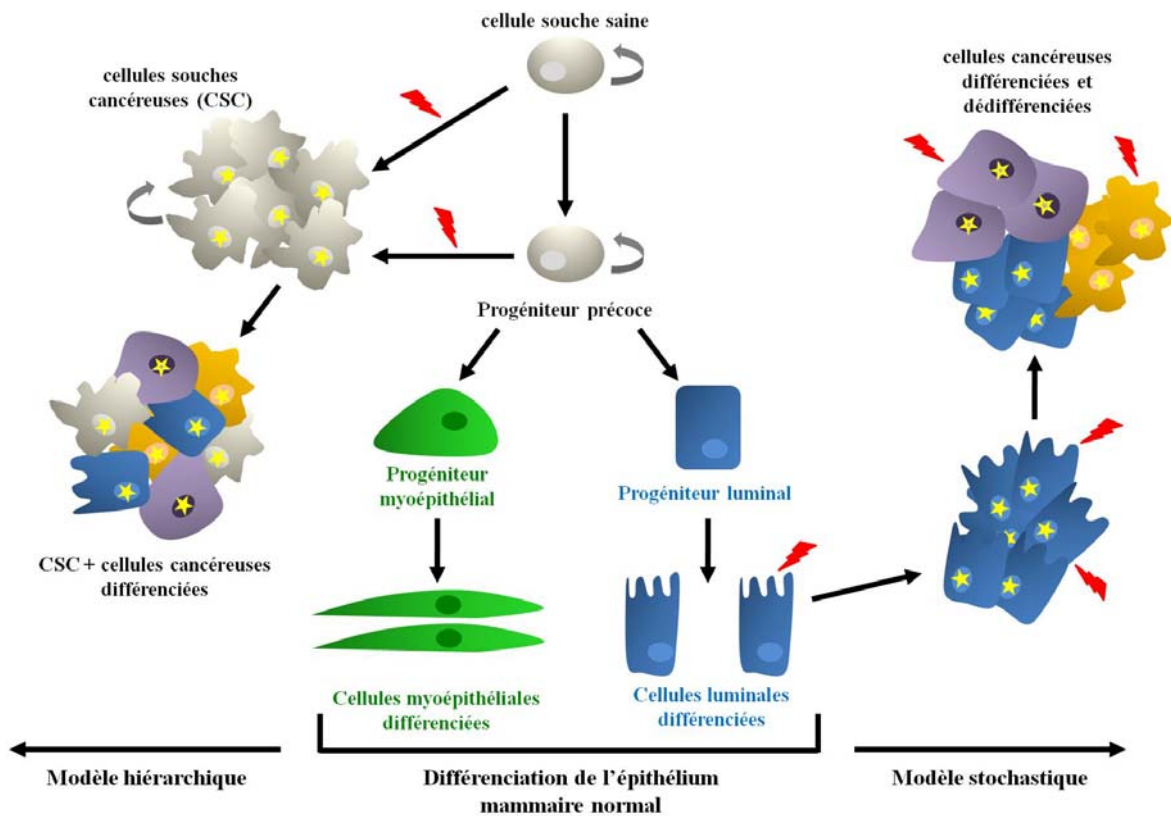


Figure 8 : Modèles hypothétiques de l'origine cellulaire du cancer du sein

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

INTRODUCTION

d. Influence du microenvironnement tumoral

Les cellules épithéliales mammaires font partie d'un microenvironnement complexe qui comprend la matrice extracellulaire et une grande variété de cellules non épithéliales comme les cellules endothéliales, les lymphocytes, les macrophages, les fibroblastes et les adipocytes. Dans la physiologie normale de la glande mammaire, ces différents types cellulaires s'organisent pour autoréguler l'homéostasie tissulaire. Lors de la tumorigenèse, les cellules épithéliales cancéreuses vont modifier cet équilibre de manière à favoriser la progression tumorale. Ainsi, par l'intermédiaire de facteurs diffusibles tels que les cytokines et les facteurs de croissance, ces cellules peuvent altérer la matrice extracellulaire, induire l'angiogenèse, 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'établissement de la tumeur au niveau du sein nécessite donc une étroite relation entre les différents types cellulaires (Figure 9) (Polyak & Kalluri, 2010).

INTRODUCTION

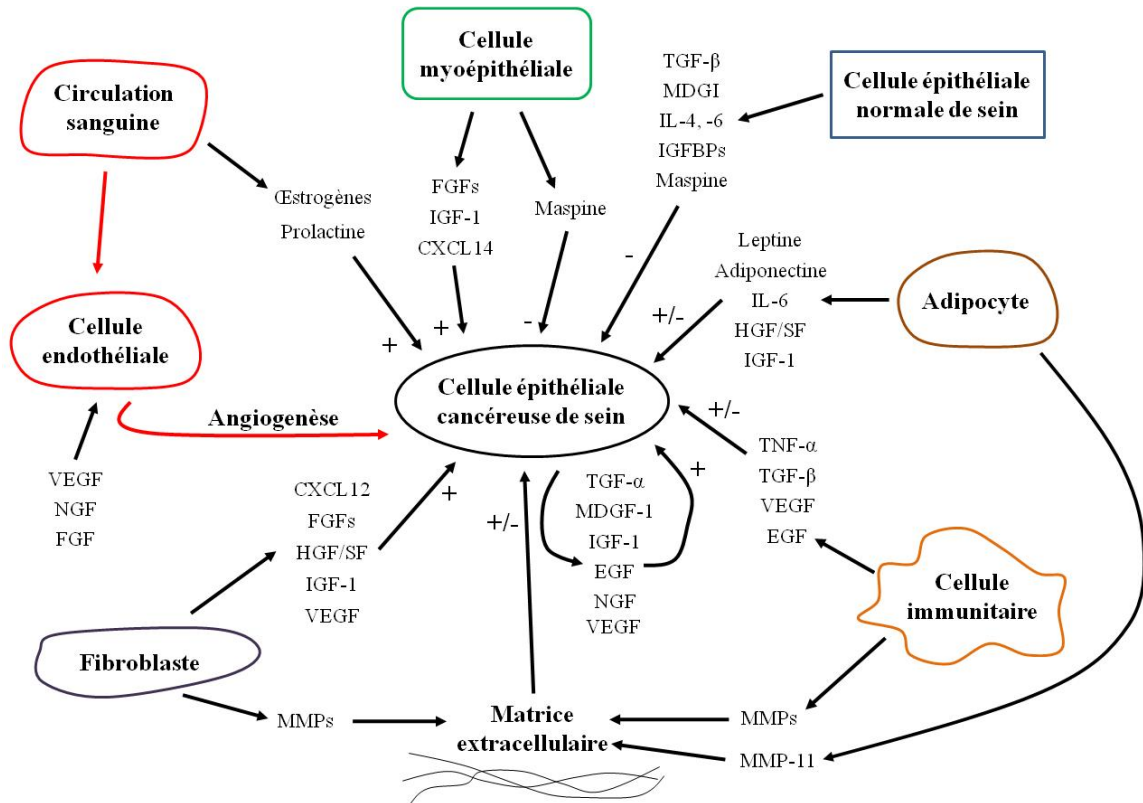


Figure 9 : Relations entre les cellules épithéliales cancéreuses mammaires et le microenvironnement tumoral

Lors du développement tumoral, les cellules épithéliales mammaires coopèrent avec les autres types cellulaires de la glande mammaire par l'intermédiaire de facteurs diffusibles autocrines et paracrines, tels que les cytokines et les facteurs de croissance. Les effets stimulateurs sont représentés par un « + », les effets inhibiteurs par un « - ».

La régulation de la croissance tumorale est dépendante de la progression cancéreuse puisqu'un même facteur présente parfois une dualité dans ses fonctions. Ainsi, le TGF-β, un facteur inhibiteur de la prolifération des cellules tumorales de stades cancéreux précoces, augmente l'agressivité des cellules cancéreuses de stade plus tardif en stimulant l'invasion et la formation de métastases (Chang *et al.*, 2007). En effet, il active les fibroblastes en myofibroblastes qui deviennent alors très prolifératifs, contractiles et vont sécréter de nombreux facteurs tels que des protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagènes de type I, III et V, protéoglycanes héparanes sulfatés), des protéases (stromélysines-1, -3 ; MMP-11, -14, cathepsines D et K, uPA), des facteurs de croissance (FGFs, IGF-1, HGF/SF, *Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor*) et des cytokines comme le SDF-1/CXCL12 (*Stromal cell-Derived Factor-1/Chemokine CXC motif Ligand 12*) ou la CXCL14 qui favorisent le développement cancéreux (Elenbaas & Weinberg, 2001). Ces molécules vont participer à la progression tumorale en diminuant l'apoptose, en augmentant la prolifération et en promouvant l'essaimage des cellules

INTRODUCTION

tumorales *via* l'activation de leur capacité migratoire et le remodelage de la matrice extracellulaire (Bhowmick *et al.*, 2004). Le FGF-2, par exemple, active la survie des cellules cancéreuses mammaires *via* l'activation d'Akt et de NF- κ B (*Nuclear factor-kappa B*) (Vandermoere *et al.*, 2005). La chimiokine SDF-1/CXCL12 favorise, quant à elle, 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). Enfin, à l'exemple de la cathepsine K dont l'expression est associée à l'agressivité tumorale, les différentes protéases exprimées par les fibroblastes péri-tumoraux vont favoriser l'invasion tumorale en remaniant la matrice extracellulaire (Kleer *et al.*, 2008). La surexpression de la cathepsine D est, quant à elle, considérée comme un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein sans métastases ganglionnaires (Ferrandina *et al.*, 1997).

Comme pour les fibroblastes, les cellules cancéreuses mammaires vont mobiliser les cellules immunitaires et les activer pour tirer partie de certaines de leurs propriétés (Joyce & Pollard, 2009). Ainsi, les cellules tumorales peuvent sécréter le CSF-1 (*Colony-Stimulating Factor-1*) qui permet le recrutement des macrophages. En réponse, ces derniers sécrètent de l'EGF qui va induire la migration/invasion des cellules tumorales *via* une boucle paracrine (Wyckoff *et al.*, 2004 ; Goswami *et al.*, 2005). De même, il a été démontré que les tumeurs mammaires qui expriment les protéines pro-inflammatoires S100A8 et S100A9 sont associées à un mauvais pronostic (Arai *et al.*, 2008). Ces protéines empêchent la maturation des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes (Cheng *et al.*, 2008) et induisent l'accumulation des MDSC (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*) dans la tumeur (Sinha *et al.*, 2008). Les MDSC sont connues pour supprimer les réponses immunitaires adaptatives et innées anti-tumorales (Marigo *et al.*, 2008).

Les cellules tumorales sécrètent également du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) qui agit de manière autocrine en augmentant leur survie et leur capacité à métastaser (Mercurio *et al.*, 2005). De plus, ce VEGF permet la néo-angiogenèse nécessaire au développement de la tumeur, par le recrutement des cellules endothéliales et des précurseurs circulants (Carmeliet, 2003).

Enfin, les adipocytes, présents en très grand nombre dans le microenvironnement de la tumeur mammaire, peuvent également intervenir dans le développement des cellules cancéreuses. En effet, ils sont capables de sécréter des hormones, facteurs de croissance ou cytokines (adipokines) comme la leptine, l'adiponectine, l'HGF/SF ou le collagène de

INTRODUCTION

type VI pouvant réguler la croissance des cellules cancéreuses de sein (Iyengar *et al.*, 2005 ; Vona-Davis & Rose, 2007). La sécrétion de l'IL-6 (*Interleukine-6*) par ces adipocytes a également été corrélée avec une invasion accrue des cellules cancéreuses (Dirat *et al.*, 2011). L'ensemble de ces résultats laisse supposer un rôle prépondérant des adipocytes dans la progression tumorale, notamment chez les patientes obèses.

Outre les coopérations intercellulaires conduisant au développement du cancer, différents mécanismes sont également mis en jeu pour contrecarrer la progression tumorale. Ainsi, le système immunitaire joue un rôle essentiel, *via* l'activation de la réponse innée et la destruction des cellules tumorales par les NK (*Natural Killers*) (Waldhauer & Steinle, 2008) et de la réponse adaptative par les lymphocytes T cytotoxiques (de Visser *et al.*, 2006). Les cellules myoépithéliales vont, quant à elles, produire de nombreux inhibiteurs de protéases (TIMP-1 ; *Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1* ; maspine, activine...), les cytokératines 5 et 6 qui vont diminuer la croissance et la migration des cellules cancéreuses de sein mais aussi l'angiogenèse (Pandey *et al.*, 2010). Notre laboratoire a montré que les cellules épithéliales normales participent elles aussi à cette destruction, puisqu'elles sécrètent l'IGFBP-3 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3*) et la maspine qui induisent l'apoptose des cellules cancéreuses (Toillon *et al.*, 2007). Ces cellules épithéliales mammaires synthétisent également d'autres facteurs inhibiteurs de croissance tels que le TGF- β 1, le MDGI (*Mammary-Derived Growth Inhibitor*), le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), des interleukines (IL-4, IL-6) ou des protéoglycanes de type héparane sulfaté (Le Bourhis *et al.*, 2000).

Comme nous avons pu le voir jusqu'à présent, la croissance tumorale est sous l'influence de nombreux facteurs systémiques et locaux, notamment les facteurs de croissance. Notre laboratoire a permis d'identifier une nouvelle famille de facteurs de croissance également impliqués dans le cancer du sein, les neurotrophines. En effet, les cellules cancéreuses mammaires sécrètent le NGF (*Nerve Growth Factor*), le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) ainsi que la NT-4/5 (*Neurotrophin-4/5*) et ces facteurs induisent la prolifération et/ou la survie de ces mêmes cellules (Descamps *et al.*, 2001b ; Dolle *et al.*, 2003 ; Vanhecke *et al.*, 2011). De plus, ils constituent des cibles thérapeutiques potentielles dans la mesure où l'utilisation d'anticorps bloquants anti-NGF, anti-BDNF ou anti-NT-4/5 réduit la formation de tumeurs mammaires dans un modèle de xénogreffes (Adriaenssens *et al.*, 2008 ; Vanhecke *et al.*, 2011). Le NGF produit par les cellules

INTRODUCTION

cancéreuses mammaires agit également de manière paracrine en augmentant la migration et l'invasion des cellules endothéliales (Dolle *et al.*, 2005 ; Romon *et al.*, 2010).

Ainsi, étant données les nombreuses observations concernant l'action paracrine du microenvironnement dans la tumorigenèse mammaire, cibler les différentes molécules dérégulées pourrait faire émerger de nouvelles opportunités thérapeutiques (Joyce, 2005 ; Joyce & Pollard, 2009). Dans ce contexte, les facteurs de croissance, leurs récepteurs et les voies de signalisation associées sont des cibles thérapeutiques privilégiées dans le cancer du sein (Alvarez *et al.*, 2010).

4. Cancer du sein et thérapies

Les thérapies actuelles du cancer du sein telles que la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont souvent complétées, en fonction des patientes, par l'hormonothérapie (tamoxifène, anti-aromatases) et/ou d'autres thérapies ciblées telles que l'Herceptine® (ou trastuzumab, anticorps monoclonal humanisé anti-HER-2) ou plus récemment l'Avastin™ (ou bevacizumab, anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF). Cependant, ces traitements ciblés ne sont indiqués que dans certains cas, le plus souvent dans les cancers du sein métastatiques et/ou surexprimant le récepteur HER-2. De plus, la résistance intrinsèque ou acquise à ces traitements est toujours une limite puisque l'on évalue encore à 30% le nombre d'échecs thérapeutiques liés à une surexpression et/ou une suractivation de récepteurs aux facteurs de croissance (Gonzalez-Angulo *et al.*, 2007). L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques reste donc primordiale pour améliorer l'efficacité des traitements du cancer du sein. Certaines études visent à cibler les voies pro- et anti-apoptotiques pour favoriser la mort des cellules tumorales (Schlotter *et al.*, 2008). Néanmoins, les nouvelles approches faisant l'objet d'essais cliniques utilisent principalement des petites molécules inhibitrices de kinases ou des anticorps bloquants ciblant les récepteurs des facteurs de croissance (récepteurs tyrosine kinase, RTK) et leur signalisation (Normanno *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2009).

a. Ciblage des voies pro- et anti-apoptotiques

La résistance à l'apoptose est une des grandes caractéristiques du cancer et est une cause majeure d'échec des traitements. Elle peut être due à des mutations ou modifications

INTRODUCTION

épigénétiques qui conduisent à une faible expression des protéines pro-apoptotiques ou à une surexpression de protéines anti-apoptotiques. Par conséquent, le « design » de nouvelles drogues capables de réactiver les processus de mort cellulaire représente une option thérapeutique prometteuse. La cytokine TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), de par sa capacité à induire l'apoptose dans de nombreuses cellules cancéreuses sans affecter la viabilité des cellules normales, en fait partie. Deux approches sont actuellement utilisées : la synthèse de différentes formes solubles de TRAIL recombinant et des anticorps monoclonaux agonistes dirigés contre les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Rahman *et al.*, 2009b). Dans le premier cas, différentes versions chimériques de la protéine ont été testées mais c'est la version non modifiée du TRAIL recombinant humain, appelé Apo2L/TRAIL ou **dulanermin**, qui semble avoir la meilleure activité anti-tumorale *in vivo*, avec notamment une diminution des métastases osseuses associées au cancer du sein (Kendrick *et al.*, 2007 ; Holland *et al.*, 2010). Le TRAIL induit également la mort cellulaire dans un panel de lignées cancéreuses de sein « triple-négatives » (ER-/PgR-/HER-2-), avec un phénotype mésenchymateux (Rahman *et al.*, 2009a). Cependant, en monothérapie, une résistance au TRAIL est observée dans les cellules MDA-MB-231 après un traitement prolongé. Les cellules restent néanmoins sensibles lorsque le TRAIL est administré en même temps qu'une chimiothérapie (Yoshida *et al.*, 2009). Ainsi, en combinaison avec le cisplatine, le TRAIL est également capable de réduire la croissance tumorale et la formation de métastases *in vivo* dans des cancers triple-négatifs (Xu *et al.*, 2011a), mais aussi d'induire la mort des cellules souches cancéreuses de ces mêmes cancers, *in vitro* (Yin *et al.*, 2011). Cette molécule a néanmoins une demi-vie courte dans le plasma et peut être toxique à des doses élevées. Pour résoudre ces problèmes, des anticorps monoclonaux agonistes ont été développés, plus spécifiques et ayant une durée de vie plus longue. Le **conatumumab**, un anticorps monoclonal anti-TRAIL-R2, est actuellement en essais cliniques dans de nombreux cancers, en monothérapie ou en association avec d'autres agents cytotoxiques (Wiezorek *et al.*, 2010). Un autre anticorps agoniste anti-TRAIL-R2 (**lexatumumab**) est capable de réduire le développement tumoral mammaire *in vivo* avec une bonne efficacité, en comparaison à un anticorps anti-TRAIL-R1 (**mapatumumab**) qui présente un effet limité (Malin *et al.*, 2011).

Une autre stratégie consiste à cibler les protéines anti-apoptotiques, comme la protéine Bcl-2. En effet, de par sa surexpression dans de nombreux cancers, elle est associée à la

INTRODUCTION

résistance aux drogues cytotoxiques dans les cellules cancéreuses. Plusieurs composés visent à inhiber cette protéine, parmi eux l'**oblimersen** (Genasense[®] 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. Malgré une bonne tolérance au traitement, cet essai fut plutôt décevant dans la mesure où aucune amélioration significative n'a pu être montrée. Ces résultats sont en partie dus à la faible diminution de la protéine Bcl-2 dans les conditions d'administration de l'oblimersen utilisées pour cet essai (Moulder *et al.*, 2008).

b. Ciblage des voies associées aux facteurs de croissance

✓ Inhibition des récepteurs à activité tyrosine kinase

Comme nous avons pu le voir dans la partie I.B.3.d, les facteurs de croissance jouent un rôle majeur dans le développement tumoral en activant des voies de signalisation oncogéniques, par l'intermédiaire de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase. Ces RTK sont fréquemment surexprimés et/ou suractivés dans les cancers. Ainsi, de nombreuses thérapies ont été développées dans le but d'inhiber leur activité (Normanno *et al.*, 2009 ; Alvarez *et al.*, 2010). Celles-ci se divisent en deux grandes familles :

- les anticorps monoclonaux se liant au domaine extracellulaire des RTK, empêchant ainsi soit la fixation de leur ligand, soit leur homo/hétérodimérisation et donc l'activation des voies de signalisation sous-jacentes (Adams & Weiner, 2005),
- les petites molécules inhibitrices d'activité kinase qui vont entrer en compétition avec l'ATP (*Adénosine TriPhosphate*) au niveau du domaine de liaison intracellulaire du récepteur (Zhang *et al.*, 2009).

Le récepteur HER-2, surexprimé dans environ 15% des cancers du sein, est la cible de l'Herceptine[®] (**trastuzumab**), un anticorps monoclonal humanisé. Celui-ci se lie à son domaine extracellulaire et inhibe la prolifération des cellules cancéreuses de sein surexprimant HER-2 (Baselga *et al.*, 1998). L'Herceptine[®] fut la première thérapie ciblée anti-HER-2 validée par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1998 et plusieurs essais cliniques ont par la suite confirmé que la combinaison avec des chimiothérapies

INTRODUCTION

adjuvantes augmentait le taux de survie des patientes présentant un cancer « HER-2 positif » (Romond *et al.*, 2005). Une molécule chimérique, le **trastuzumab-DM1** (trastuzumab couplé à un anti-microtubules, l'emtansine ou DM1) a été développée par la suite et présente une activité anti-proliférative sur des tumeurs résistantes à l'Herceptine[®] (Lewis Phillips *et al.*, 2008 ; Barok *et al.*, 2011). Ce composé est actuellement en phase III d'essais cliniques, seul ou en combinaison avec d'autres thérapies ciblées ou chimiothérapies, dans le cancer du sein (Burriss *et al.*, 2011). Enfin, un autre anticorps monoclonal dirigé contre HER-2, le **pertuzumab** (Omnitarg[™]) bloque l'hétérodimérisation du récepteur avec l'EGFR et ErbB-3 et est en phase III d'essai clinique en combinaison avec le trastuzumab (étude CLEOPATRA) (Baselga & Swain, 2010).

L'EGFR, membre de la même famille que HER-2, est également surexprimé dans certains cancers du sein et est associé à un phénotype agressif et un mauvais pronostic (Normanno *et al.*, 2003). Cette surexpression est retrouvée plus fréquemment dans les cancers du sein triple-négatifs que dans les autres sous-types (Reis-Filho & Tutt, 2008). Ce récepteur peut être inhibé de façon spécifique par le **gefitinib** (Iressa[®]) ou l'**erlotinib** (Tarceva[®]; ZD1839); ces deux molécules sont capables de réduire la prolifération des cellules cancéreuses de sein, notamment celles surexprimant HER-2 (Anido *et al.*, 2003) et sont en cours de phase II (ou III pour l'Iressa[®] seul) d'essais cliniques. Néanmoins, les stratégies émergentes utilisent des inhibiteurs ciblant à la fois l'EGFR et HER-2. C'est notamment le cas du **lapatinib** (Tyverb[®]) qui démontre une inhibition réversible et spécifique des deux récepteurs (Wood *et al.*, 2004) et qui est testé en phases II et III, seul ou en combinaison avec des chimio- ou hormonothérapies.

Enfin, le VEGF joue également un rôle important dans la tumorigenèse mammaire puisqu'il favorise la néo-angiogenèse. Ainsi, après le développement de l'Avastin[™] (ou **bevacizumab**, anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF), de nouveaux agents anti-angiogéniques ont vu le jour. La majorité de ces agents ciblent à la fois les récepteurs du VEGF mais aussi d'autres tyrosines kinases. Le **sorafenib** (ou Nexavar[®]) en est un exemple ; à l'origine développé pour cibler la protéine Raf, il inhibe également les trois récepteurs du VEGF, le récepteur du PDGF- β et le récepteur du SCF (*Stem Cell Factor*), c-kit (Wilhelm *et al.*, 2008). Le sorafenib est donc un agent anti-angiogénique mais également anti-prolifératif et il a été montré *in vitro* dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 qu'il pouvait induire l'apoptose *via* l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia-1*) (Yu *et al.*, 2005). Cette molécule est

INTRODUCTION

d'ores et déjà approuvée aux Etats-Unis et en Europe pour les traitements des cancers du rein et du foie. Concernant le cancer du sein, un premier essai clinique avec le sorafenib en monothérapie a montré des résultats décevants chez des patientes atteintes de cancers du sein métastatiques (Moreno-Aspitia *et al.*, 2009). Toutefois, plusieurs essais cliniques sont en cours pour étudier son effet en combinaison avec des thérapies plus classiques telles que des anti-aromatases (letrozole, anastrozole) ou des anti-mitotiques (paclitaxel, doxorubicine, cyclophosphamide).

Un autre inhibiteur « multi-kinases », le **sunitinib** (Sutent[®]), déjà approuvé pour les cancers du rein et les tumeurs stromales digestives, a montré des résultats prometteurs contre le cancer du sein. Il cible les trois récepteurs du VEGF, les PDGFR α et β , c-kit, le récepteur RET (*REarranged during Transfection*), FLT3 (*FMS-Like Tyrosine kinase 3*) et le récepteur du CSF-1. Un essai clinique de phase II chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique résistant aux taxanes et anthracyclines a montré un taux de réponse de 11% au sunitinib en monothérapie. De manière intéressante, le taux de réponse passe à 15% si l'on considère les patientes atteintes d'un cancer dit « triple-négatif » et à 25% chez les patientes « HER-2 positives » prétraitées à l'Herceptine[®] (Burstein *et al.*, 2008 ; Puente *et al.*, 2010). D'autres études ont été menées plus récemment avec des traitements combinés comme par exemple, avec le paclitaxel où le taux de réponse est de 38,9% (Kozloff *et al.*, 2010). Nous pouvons noter qu'un autre essai clinique avec une combinaison sunitinib + paclitaxel + Avastin[™] s'est montré trop toxique pour les patientes et a dû être stoppé, suggérant que la combinaison de deux traitements anti-angiogéniques n'est pas réalisable avec le protocole utilisé lors de cet essai (Mayer *et al.*, 2010).

D'autres stratégies thérapeutiques ont également été développées en ciblant directement des protéines impliquées dans les voies de signalisation sous-jacentes aux RTK. Ces protéines sont principalement mises en jeu dans les voies des MAPK, PI3-K/Akt ou Src qui sont les voies oncogéniques majeures activées lors du développement tumoral (Figure 7).

✓ *Inhibition des voies de signalisation*

La protéine mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), sous-jacente à la voie de signalisation PI3-K/Akt, joue un rôle central dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la survie, la migration, l'angiogenèse ou la synthèse protéique

INTRODUCTION

(Dancey, 2010). Bien qu'aucune mutation ni de surexpression de mTOR ne soit reportée, les voies de signalisation en amont de cette protéine telles que celles de l'IGF-1, de l'EGF ou encore du VEGF sont souvent dérégulées dans les cancers (Bjornsti & Houghton, 2004 ; Guertin & Sabatini, 2007). De plus, la rapamycine, un inhibiteur naturel de mTOR, présente une activité anti-tumorale dans plusieurs modèles de tumeurs solides. Pour le cancer du sein, la rapamycine inhibe la croissance dans 20 lignées de cellules cancéreuses mammaires et augmente de manière significative l'efficacité de l'Herceptine[®] dans les cellules surexprimant HER-2 (Wang *et al.*, 2007). Par conséquent, des dérivés de la rapamycine comme le **temsirolimus** (Torisel[®]) ou l'**everolimus** (Afinitor[®]), ayant une meilleure solubilité et stabilité, ont été développés et sont actuellement en essais cliniques dans le cancer du sein. Pour exemple, une étude sur 270 patientes a montré que l'everolimus augmentait l'efficacité du letrozole, un anti-aromatase, chez les patientes atteintes d'un cancer du sein hormono-dépendant (Baselga *et al.*, 2009).

Une autre cible intéressante est la protéine chaperonne HSP90 (*Heat Shock Protein 90*). En effet, cette protéine intervient dans la maturation et la stabilisation de nombreuses oncoprotéines, ce qui rend les cellules cancéreuses particulièrement dépendantes de sa bonne fonctionnalité. Parmi ses protéines cibles, on retrouve des RTK (HER-2, EGFR, PDGFR), des protéines de signalisation (p53, Src, Akt, Raf-1, IKK, *IκB Kinase*), des régulateurs du cycle cellulaire (cdk4, cdk6) ou encore des récepteurs aux stéroïdes (récepteurs aux androgènes, œstrogènes et progestérone), la plupart de ces protéines étant mutées et/ou surexprimées dans de nombreux cancers. En tant que tel, un seul composé inhibant HSP90 permettrait donc de court-circuiter de multiples voies de signalisation cruciales pour les cellules cancéreuses (Li *et al.*, 2009b). Dans ce sens, des composés comme la **tanespimycine** ciblant le site de fixation de l'ATP de la protéine chaperonne HSP90 ont été développés. Cet inhibiteur a fait l'objet d'un essai clinique chez des patientes atteintes d'un cancer du sein HER-2+ métastatique, réfractaires à l'Herceptine[®]. Les résultats ont été encourageants puisqu'un co-traitement tanespimycine/Herceptine[®] a montré une bonne activité anti-tumorale suggérant une potentialisation de l'Herceptine[®] par l'inhibiteur de HSP90 ou un effet propre de l'inhibiteur (Modi *et al.*, 2007). Il serait donc intéressant de tester l'activité anti-tumorale des inhibiteurs de HSP90 en monothérapie.

La protéine Src, non-récepteur tyrosine kinase, est également une cible de choix pour le traitement du cancer du sein. En effet, celle-ci est impliquée dans de nombreuses voies de

INTRODUCTION

transduction conduisant à la croissance, la survie et la migration/invasion cellulaires (Mayer & Krop, 2010). Son potentiel oncogénique est étroitement lié à un état phosphorylé constitutivement actif. Par conséquent, plusieurs inhibiteurs ont été développés dont le **dasatinib** (Sprycel[®]) et le **bosutinib** ciblant l'activité kinasique de Src, mais également des autres membres de sa famille (Lyn et Fyn par exemple) et de la tyrosine kinase Bcr-Abl. Le PDGFR et c-kit sont également inhibés avec le dasatinib (Lombardo *et al.*, 2004 ; Schittenhelm *et al.*, 2006). Actuellement utilisés comme traitements des leucémies, ces deux composés sont en essais cliniques dans plusieurs autres cancers dont celui du sein. De façon intéressante, les cancers de sous-type basal (triple-négatifs) ont été identifiés comme les plus sensibles au dasatinib (Finn *et al.*, 2007). Le dasatinib et le bosutinib sont actuellement en phase I et II d'essais cliniques, en monothérapie ou en combinaison avec différentes chimiothérapies ou hormonothérapies (anti-aromatases) (Campone *et al.*, 2011 ; Finn *et al.*, 2011 ; Fournier *et al.*, 2011 ; Mayer *et al.*, 2011).

Enfin, la voie des MAPK est la cible de nombreuses drogues dans le cancer du sein, visant à inhiber soit l'ancrage membranaire de la protéine Ras (inhibiteurs de farnésyl transférase ; **tipifarnib** (Zarnestra[®]) et **lonafarnib** (Sarasar[™])), soit l'activité kinase de Raf (par le **sorafenib** ; Nexavar[®]) et de MEK (par le **selumetinib** ; AZD6244) (Head & Johnston, 2004 ; Wilhelm *et al.*, 2008 ; Maurer *et al.*, 2011). Un effet synergique anti-tumoral a été observé pour le tipifarnib, en présence de 4-hydroxy-tamoxifène, sur des cellules cancéreuses de sein ER+ (Martin *et al.*, 2007). Des phases II d'essai clinique sont actuellement en cours pour ces différents composés, en combinaison avec d'autres thérapies ciblées, des chimio- ou hormonothérapies (Li *et al.*, 2009a ; Sparano *et al.*, 2009).

Comme nous venons de le voir, le développement de thérapies ciblées dans le cancer du sein ne cesse de s'accroître. La liste, non exhaustive, des molécules citées précédemment permet d'avoir un aperçu des stratégies actuelles les plus prometteuses (Figure 10). Cependant, à l'image de l'Herceptine[®] pour les cancers du sein HER-2+, la plupart de ces composés ne sont actifs que dans certains cas. De plus, les cancers du sein HER-2+ ne représentent que 15% des cancers du sein et parmi ces 15%, on évalue à environ 30% les patientes répondant à l'Herceptine[®] en premier traitement et à 15% pour celles préalablement traitées par d'autres drogues. En effet, au cours des traitements, les cellules cancéreuses vont mettre en place des voies d'échappement et devenir résistantes aux drogues utilisées.

INTRODUCTION

A travers l'exemple de l'Herceptine[®], nous allons ainsi voir les mécanismes de résistance mis en jeu par les cellules cancéreuses de sein et les stratégies thérapeutiques pour y remédier.

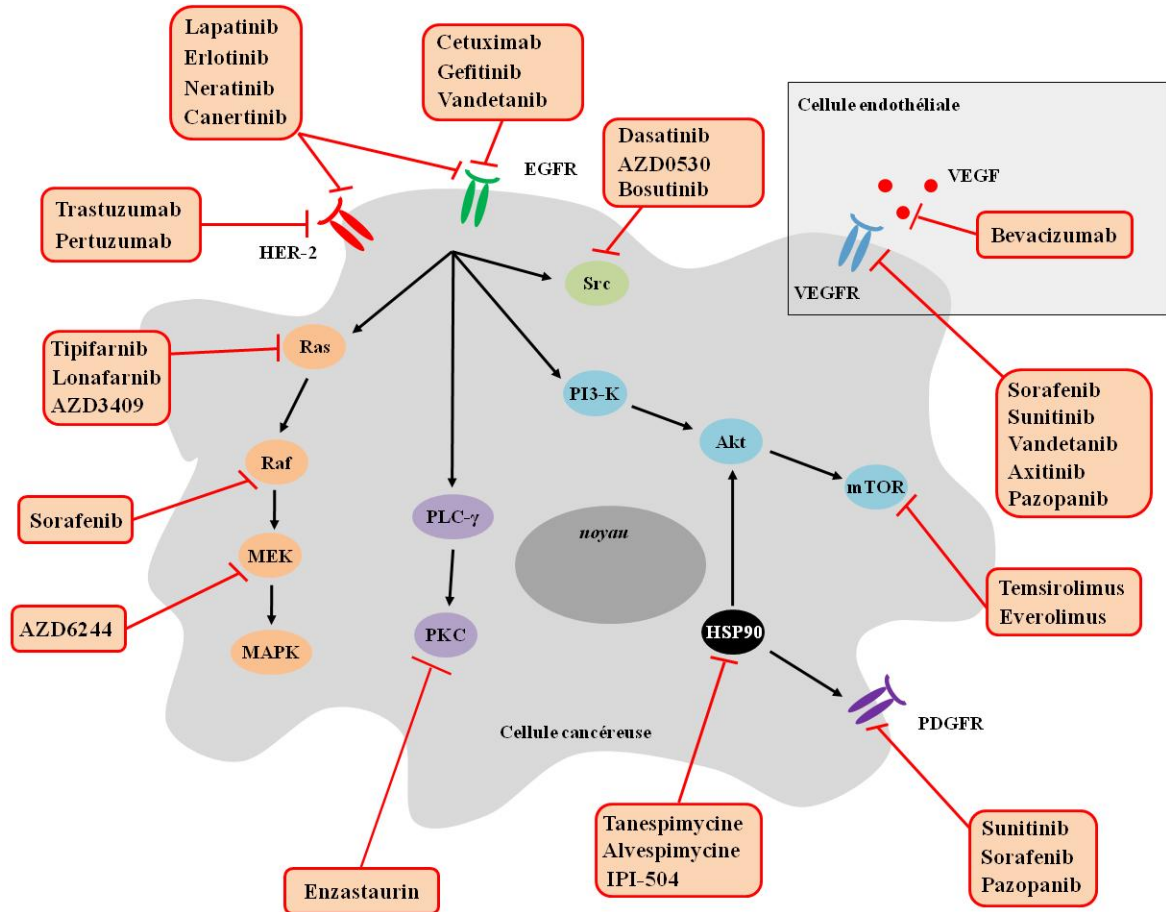


Figure 10 : Thérapies ciblées dans le cancer du sein visant les voies de signalisation des facteurs de croissance

Sur le schéma, sont résumés les différents agents thérapeutiques actuellement en développement clinique ou préclinique dans le cancer du sein ainsi que leurs cibles protéiques. Aujourd'hui, seuls le trastuzumab (Herceptine[®]), le lapatinib (Tyverb[®]) et le bevacizumab (Avastin[™]) sont utilisés en clinique pour le traitement de cancers du sein métastatiques (HER-2+ pour l'Herceptine[®] et le Tyverb[®]) (Schlotter et al., 2008 ; Normanno et al., 2009 ; Alvarez et al., 2010). PKC : Protein Kinase C ; PLC-γ1 : Phospholipase C-gamma1.

c. Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées

Comme nous l'avons vu précédemment, le trastuzumab cible HER-2 au niveau de son domaine extracellulaire pour inhiber sa dimérisation et sa signalisation sous-jacente. Ainsi, le trastuzumab inhibe la phosphorylation de Src, laquelle régule négativement PTEN,

INTRODUCTION

inhibiteur de la voie PI3-K/Akt. Le PTEN activé est alors relocalisé à la membrane et va affecter l'activité de la PI3-K (Nagata *et al.*, 2004).

Cependant, plusieurs facteurs concourent à une résistance des cellules cancéreuses de sein vis-à-vis d'un traitement au trastuzumab. En premier lieu, il a été décrit, dans le cancer du sein, des polymorphismes dans la séquence du gène *ERBB2* conduisant à une perte de stabilité du dimère du récepteur et à une signalisation intracellulaire altérée (Fleishman *et al.*, 2002). Il a également été montré que la glycoprotéine membranaire mucineuse MUC-4, surexprimée à la surface des cellules de lignées tumorales présentant une résistance *de novo* au trastuzumab, bloquait l'accès de la drogue à son récepteur (Nagy *et al.*, 2005). Par ailleurs, la protéine Src a été identifiée comme « nœud » principal de signalisation dans les résistances au trastuzumab et fait l'objet de nombreuses études pour déterminer si son inhibition pourrait rétablir la sensibilité au traitement dans les cellules cancéreuses de sein (Muthuswamy, 2011 ; Zhang *et al.*, 2011).

Néanmoins, la résistance observée dans les tumeurs mammaires proviendrait principalement de la coexistence d'autres récepteurs membranaires surexprimés dans les cellules qui pourraient également activer les voies oncogéniques des MAPK, Src et PI3-K/Akt. On peut ainsi citer les récepteurs EGFR, IGF1-R, CXCR4, c-Met et l'intégrine $\beta 1/\beta 4$ (Lu *et al.*, 2001 ; Moulder *et al.*, 2001). Cette observation est reprise dans le concept de « co-activation des RTK », dans lequel les cellules cancéreuses activeraient simultanément deux ou plusieurs récepteurs afin d'établir un réseau de signalisation robuste conduisant à un maintien de leur phénotype, même si une des voies ou un des effecteurs est touché (Stommel *et al.*, 2007 ; Xu & Huang, 2010). En effet, les RTK partagent des voies de signalisation communes et il a été décrit, dans les glioblastomes par exemple, qu'en conditions normales, le complexe Gab1 (*Grb2-associated-binding protein 1*) / PI3-K se fixait préférentiellement sur l'EGFR mais qu'en cas d'inhibition de l'EGFR, ce complexe était déplacé sur c-Met pour maintenir une signalisation soutenue de la voie PI3-K/Akt. Ainsi, les cellules cancéreuses qui co-activent l'EGFR et c-Met sont résistantes aux monothérapies anti-EGFR (Huang *et al.*, 2007). Dans le cas des résistances au trastuzumab dans le cancer du sein, cette notion illustre bien la complexité du problème. Une étude récente a démontré l'existence d'un complexe hétérotrimérique entre les formes activées des récepteurs HER-2, ErbB-3 et IGF1-R, responsable de la résistance au trastuzumab dans différentes lignées cellulaires cancéreuses de sein (Huang *et al.*, 2010). L'inhibition de l'expression de ErbB-3 ou de l'IGF1-R n'altère pas l'interaction entre les

INTRODUCTION

deux RTK restants mais rend les cellules sensibles à nouveau au traitement. Cependant, cette « re-sensibilisation » n'est pas acquise de la même manière : l'inhibition de ErbB-3 diminue l'activation d'Akt mais n'altère pas la signalisation des MAPK ou de Src, alors que le ciblage de l'IGF1-R réduit la phosphorylation des MAPK et de Src, tout en ayant un effet mineur sur l'activité d'Akt. Un autre exemple est décrit avec le récepteur EphA2 (*Ephrin type-A receptor 2*), surexprimé dans les tumeurs mammaires et jouant un rôle dans l'initiation tumorale et la progression métastatique (Zelinski *et al.*, 2001 ; Brantley-Sieders *et al.*, 2008 ; Vaught *et al.*, 2008). Dans les tumeurs résistantes au trastuzumab, EphA2 est surexprimé et activé par Src, conduisant à l'activation des voies PI3-K/Akt et MAPK. L'inhibition d'EphA2 rétablit la sensibilité des tumeurs au traitement (Zhuang *et al.*, 2010). Enfin, un dernier exemple concerne la coopération entre HER-2 et TrkA, le récepteur du NGF. En effet, de nombreuses études menées au laboratoire soulignent les effets de TrkA sur la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de sein (Descamps *et al.*, 2001a ; 2001b ; Lagadec *et al.*, 2009). TrkA interagit avec HER-2 pour activer la croissance des cellules de cancer du sein (Tagliabue *et al.*, 2000). Dans les cancers de la prostate, l'administration conjointe de CEP-701 (inhibiteur de TrkA) et de pertuzumab a un effet synergique sur l'inhibition de la croissance des cellules tumorales (Festuccia *et al.*, 2009).

Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs d'HER-2, en particulier le trastuzumab, sont multiples, notamment de par ses interactions avec d'autres récepteurs tyrosine kinase. Les stratégies thérapeutiques actuelles doivent tenir compte de ces données et cibler non plus uniquement HER-2, mais plusieurs kinases à la fois (comme le lapatinib contre HER-2 et EGFR) ou co-administrer le trastuzumab avec des thérapies ciblées contre d'autres récepteurs. La compréhension des coopérations membranaires entre les récepteurs tyrosine kinase et les voies de signalisation associées reste donc un enjeu majeur dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le cancer du sein.

II. LE NGF ET SES RECEPTEURS

A. Le NGF et son précurseur

1. Découverte

Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger et Stanley Cohen découvrirent, il y a plus de 50 ans, 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), séquencé en 1971 (Angeletti & Bradshaw, 1971) et valut, en 1986, le prix Nobel de médecine à Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen. Ce n'est que 30 ans plus tard, en 1982, que la deuxième neurotrophine, le BDNF, fut purifiée à partir de tissu issu du cerveau de cochon (Barde *et al.*, 1982). Feront suite les découvertes de la neurotrophine-3 (NT-3) par plusieurs équipes en 1990 (Hohn *et al.*, 1990 ; Jones & Reichardt, 1990 ; Maisonpierre *et al.*, 1990 ; Rosenthal *et al.*, 1990) et de la neurotrophine-4/5 (NT-4/5) découverte consécutivement chez le xénope, le rat et l'homme (Berkemeier *et al.*, 1991 ; Hallbook *et al.*, 1991 ; Ip *et al.*, 1992).

2. Structure : du gène aux protéines

a. Les produits du gène

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, NT-3 et NT-4/5. Leurs synthèses aboutissent à des précurseurs protéiques de tailles voisines présentant une forte homologie de séquence et des poids moléculaires très proches (Tableau 3).

INTRODUCTION

| 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 |
| NT-3 | 12p13 | 1204 | NM_002527 | 257 | P20783 |
| NT-4/5 | 19q13,3 | 1021 | NM_006179 | 210 | P34130 |

Tableau 3 : Caractéristiques des neurotrophines humaines

Neurotrophines humaines et leurs localisations chromosomiques. Dans le tableau, sont également référencées la taille de l'ARNm majoritaire avec son numéro d'accèsion NCBI et la taille en acides aminés de la préproneurotrophine avec son numéro d'accèsion Uniprot.

La synthèse des neurotrophines se fait par le même processus de maturation pour tous les membres de la famille. D'abord sous la forme de préproneurotrophines immatures d'environ 30 kDa, leur peptide signal est éliminé au niveau du réticulum endoplasmique. Les proneurotrophines peuvent ensuite être clivées au niveau de résidus d'acides aminés dibasiques par des protéases intracellulaires telles que la furine ou des proconvertases (Bresnahan *et al.*, 1990 ; Seidah *et al.*, 1996) ou, après sécrétion, par des protéases extracellulaires comme la plasmine et certaines métalloprotéases (MMP-3 et MMP-7) pour donner les neurotrophines matures (Lee *et al.*, 2001 ; Pang *et al.*, 2004) (Figure 11).

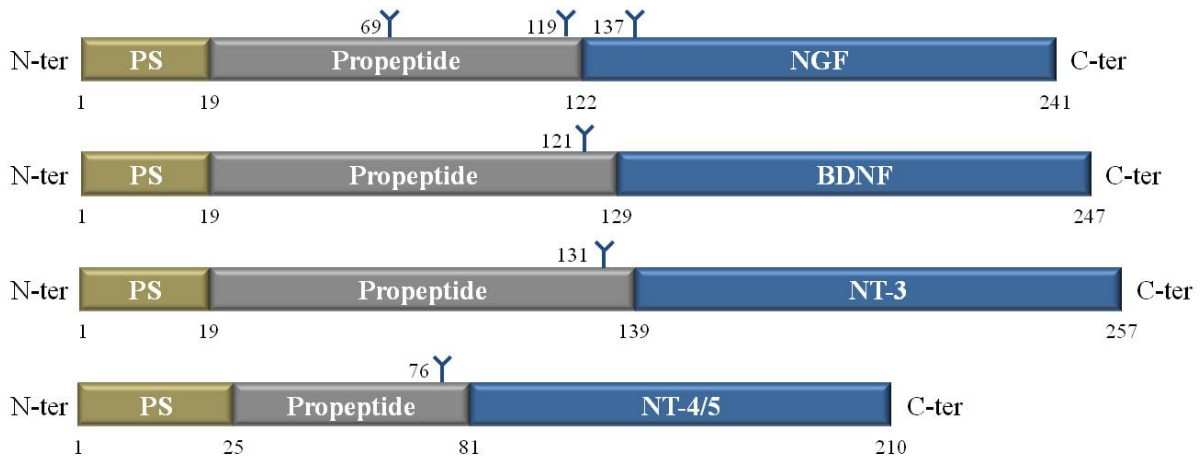


Figure 11 : Représentation schématique des pro/neurotrophines

Les gènes des neurotrophines codent des préproneurotrophines possédant un peptide signal (PS, marron), un propeptide (gris) et la protéine mature (bleu). Le peptide signal (18 à 24 aa) est clivé après séquestration de la protéine dans le réticulum endoplasmique. La neurotrophine mature est obtenue suite au clivage du propeptide par des enzymes spécifiques (furine, plasmine, métalloprotéases). Les motifs (Y) représentent des sites potentiels de N-glycosylation.

INTRODUCTION

b. Organisation des pro/neurotrophines

✓ *Les pro/neurotrophines en solution*

Chaque monomère de neurotrophine est constitué de 3 boucles variables (V1-V3), 4 feuillets β (β 1- β 4) et de 6 cystéines conservées formant un nœud de cystéines ou « *cystine knot* » avec 3 ponts disulfures permettant de rigidifier la structure (McDonald *et al.*, 1991 ; McDonald & Hendrickson, 1993) (Figure 12A). En solution, les neurotrophines existent sous la forme d'homodimères associés de façon non covalente (Figure 12B) où deux protomères sont orientés en miroir (Bradshaw *et al.*, 1994). En revanche, le propeptide seul est monomérique en solution ; il apparaît donc que ce sont les parties matures des proneurotrophines qui permettent leur dimérisation (Figure 12C) (Kliemann *et al.*, 2004 ; Paoletti *et al.*, 2009 ; 2011). Les motifs structuraux des neurotrophines étant très conservés, elles peuvent s'hétérodimériser *in vitro* (Arakawa *et al.*, 1994 ; Heymach & Shooter, 1995). Néanmoins, ces hétérodimères sont très instables et les homodimères respectifs sont rapidement reformés (Radziejewski & Robinson, 1993). Le rôle biologique de ces hétérodimères *in vivo* demeure, par ailleurs, très incertain.

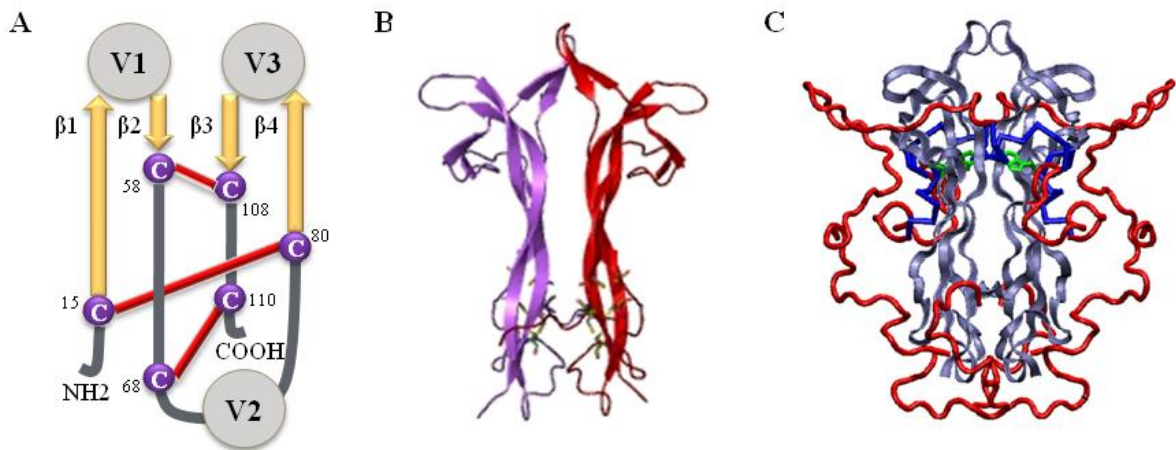


Figure 12 : Structure du NGF et de son précurseur

A. Monomère de NGF composé de 3 boucles variables V1 à V3 (en gris), 4 feuillets β 1 à β 4 (en jaune) et de 6 cystéines conservées (en violet) établissant 3 ponts disulfures (en rouge). **B.** Dimère de NGF formé de 2 protomères (un violet et un rouge) orientés en tête à tête et de façon parallèle. **C.** Dimère de proNGF avec le cœur formé par le dimère des parties matures (en bleu clair) et les propeptides de chaque monomère de proNGF rejetés à l'extérieur (en rouge). L'interface d'interaction entre le propeptide (en bleu foncé) et la partie mature (en vert) permet la bonne mise en conformation du proNGF et inhibe sa liaison à TrkA (Kliemann *et al.*, 2004 ; Paoletti *et al.*, 2009 ; 2011).

INTRODUCTION

✓ Importance des propeptides

Les propeptides des proneurotrophines ont un rôle primordial dans la conformation des neurotrophines. Ainsi, le propeptide du proNGF facilite la mise en place des ponts disulfures de la partie mature (Rattenholl *et al.*, 2001a ; 2001b ; Hauburger *et al.*, 2007). Lorsqu'il est libre, le propeptide apparaît lâche car aucun contact tertiaire interne ne le stabilise, alors qu'associé au NGF, il adopte une conformation tridimensionnelle plus stable (Kliemann *et al.*, 2004). Les deux entités se stabilisent donc mutuellement (Figure 12C). Cette interaction, au sein du proNGF, met en jeu les résidus W¹⁹ à A⁴⁰ du propeptide et le tryptophane en position 21 de la partie mature (soit en position 142 du proNGF). Le propeptide masque ce tryptophane décrit comme étant impliqué dans l'interaction avec TrkA, ce qui expliquerait la faible affinité du proNGF pour ce récepteur (Kliemann *et al.*, 2007 ; Paoletti *et al.*, 2009 ; 2011). Bien que les études réalisées ne permettent pas d'expliquer pourquoi les proneurotrophines se lient avec plus d'affinité à p75^{NTR} (*p75 Neurotrophin Receptor*) que les neurotrophines, l'hypothèse émise suggère que le propeptide entraînerait une modification structurale de la partie mature accroissant son affinité pour ce récepteur. Nykjaer et ses collaborateurs ont par ailleurs montré que le proNGF se lie à p75^{NTR} par sa partie mature et non par son propeptide (Nykjaer *et al.*, 2004).

Pour les autres proneurotrophines, les propeptides présentent de fortes homologies de séquence et par conséquent des propriétés fonctionnelles communes. Ainsi, les acides aminés K⁷⁶ à E¹⁰³ du proBDNF sont essentiels à sa fixation sur la sortiline et à sa sécrétion puisque la délétion de cette région inhibe plus de 80% de son interaction avec ce récepteur et diminue la quantité de proBDNF sécrété (Teng *et al.*, 2005). Une région très homologue a aussi été identifiée, dans le prodomaine du proNGF (N⁶⁹-E⁹⁶), comme suffisante pour permettre la sécrétion du proNGF (Suter *et al.*, 1991). Comme illustré dans la figure 11, le propeptide de la NT-4/5 est beaucoup plus petit que ceux des autres proneurotrophines et bien qu'il soit homologue, pour une bonne partie, avec la région précédemment citée, il ne peut pas se lier à la sortiline (Chen *et al.*, 2005b). Jusqu'à présent, aucune donnée ne concerne la liaison du prodomaine de la proNT-3 à la sortiline. En revanche, une protéine chimérique, avec le propeptide de la proNT-3 et la partie mature du proNGF, se comporte comme le proNGF sauvage pour la bonne mise en conformation de la partie mature du proNGF. Par conséquent, l'association intramoléculaire entre le propeptide et la partie

INTRODUCTION

mature peut s'établir et donc le propeptide de la proNT-3 pourrait, lui aussi, masquer son site d'interaction avec TrkC (Hauburger *et al.*, 2007).

3. Les proneurotrophines, une réalité physiologique

Le fait que des cellules puissent sécréter des proneurotrophines de façon physiologique a longtemps été un sujet de débats (Willnow *et al.*, 2008). Bien que l'existence de ces proformes fût connue, elles étaient considérées comme inactives et ce n'est qu'au début des années 2000 que les proneurotrophines furent « redécouvertes ». Ainsi, Lee et ses collaborateurs montrèrent que le proNGF et le proBDNF pouvaient être sécrétés et avoir une action pro-apoptotique sur les neurones, là où les formes matures induisaient la survie et la différenciation cellulaires (Lee *et al.*, 2001). L'effet pro-apoptotique du proNGF a ensuite été confirmé dans plusieurs modèles cellulaires (Nykjaer *et al.*, 2004 ; Lebrun-Julien *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010). De plus, il apparaît que le proNGF est la forme majoritaire des produits du gène *NGF* dans de nombreux organes (Bierl *et al.*, 2005). Le proNGF est ainsi sécrété, *in vitro*, par de nombreuses populations neuronales comme les neurones corticaux (Bruno & Cuello, 2006), les neurones sympathiques (Hasan *et al.*, 2003), les cellules microgliales (Srinivasan *et al.*, 2004) et les astrocytes (Domeniconi *et al.*, 2007) mais également *in vivo* où il induit la mort des neurones après lésion cérébrale (Harrington *et al.*, 2004). Le proNGF peut également engendrer une réponse biologique dans des populations non-neuronales comme les cellules NK où il induit l'apoptose (Rogers *et al.*, 2010) et les cellules de mélanome où il favorise la migration (Truzzi *et al.*, 2008).

Dans des troubles neuronaux, comme la maladie d'Alzheimer (Fahnestock *et al.*, 2001) et l'encéphalomyélopathie spongiforme (Stoica *et al.*, 2008), l'expression du proNGF est augmentée. Ceci suggère qu'en plus d'apparaître comme un marqueur de ces pathologies, le proNGF pourrait avoir un rôle biologique. A cet égard, le proNGF, isolé du cerveau de malades atteints d'Alzheimer, induit la mort des cellules de phéochromocytome de rat PC12 alors que le NGF permet leur survie et leur différenciation (Pedraza *et al.*, 2005). Outre ces effets sur des cellules en culture, plusieurs équipes ont montré que le proNGF est responsable de la mort neuronale dans différents modèles d'atteintes du système nerveux *in vivo*. Ainsi, des souris ou des rats auxquels une lésion du système nerveux a été pratiquée présentent une augmentation du proNGF sécrété qui induit la mort neuronale (Beattie *et al.*, 2002 ; Harrington *et al.*, 2004 ; Volosin *et al.*, 2006 ; Volosin *et al.*, 2008).

INTRODUCTION

La dichotomie des effets entre le NGF et son précurseur a été récemment illustrée par la modulation de sous-groupes distincts d'ARNm, dans les cellules PC12 (D'Onofrio *et al.*, 2011). De plus, il a été montré que le proNGF peut induire la mort de neurones malgré la stimulation trophique du NGF, ce qui suggère que le signal des proneurotrophines peut éventuellement outrepasser celui des neurotrophines qu'elles peuvent générer (Sobottka *et al.*, 2008). Par ailleurs, une étude a également montré que les voies de signalisation induites par les proneurotrophines et par les neurotrophines matures pouvaient être interconnectées. En effet, un traitement simultané au proNGF et au BDNF, dans des neurones, conduit à la mort cellulaire. Le proNGF peut se lier à p75^{NTR} qui va alors recruter la phosphatase PTEN, responsable de l'inactivation de la voie PI3-K sous l'axe BDNF/TrkB (Song *et al.*, 2010).

Dans le cas des autres proneurotrophines, le proBDNF est sécrété *in vitro* par les lymphocytes B (Fauchais *et al.*, 2008) et les neurones corticaux (Teng *et al.*, 2005) et *in vivo* dans le cerveau (Pang *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2009). De même que pour le proNGF, le proBDNF induit des effets différents du BDNF mature puisqu'il régule négativement la migration de cellules du cervelet alors que la neurotrophine mature favorise la prolifération, la migration et la survie de ces cellules (Xu *et al.*, 2011b). Le proBDNF est également capable d'induire l'apoptose des motoneurones (Taylor *et al.*, 2011). Enfin, outre le proNGF et le proBDNF, la proNT-3 a également une activité biologique propre puisqu'elle induit la mort des neurones de l'oreille interne (Yano *et al.*, 2009 ; Tauris *et al.*, 2011).

Comme nous avons pu le voir à travers plusieurs exemples, les proneurotrophines et les neurotrophines matures induisent des effets biologiques différents (Lu *et al.*, 2005). Par conséquent, le processus de clivage de ces protéines doit être hautement régulé. Ainsi, la conversion du proNGF en NGF, dans le milieu extracellulaire, dépend de l'activité de plusieurs protéases exprimées par différentes populations neuronales *in vitro* et *in vivo* (Bruno & Cuello, 2006). Dans les neurones, le ratio d'expression proBDNF/BDNF est, par exemple, contrôlé par des *stimuli* externes qui modulent la sécrétion et l'activité des protéases extracellulaires (Nagappan *et al.*, 2009 ; Ding *et al.*, 2011). La maturation du NGF a également été décrite récemment pour être régulée par une nouvelle enzyme, la tryptase, dans les mastocytes (Spinnler *et al.*, 2011). Une autre voie de contrôle est la régulation de la biodisponibilité des neurotrophines. Ainsi, la sortiline peut lier et internaliser le proNGF et le proBDNF pour les cibler vers une voie de sécrétion (Chen *et*

INTRODUCTION

al., 2005b). Le trafic intracellulaire du proBDNF est également dépendant d'un complexe trimérique proBDNF/sortiline/HAP1 (*Huntingtin-associated protein-1*) (Yang *et al.*, 2011) ainsi que de l'expression de l'ectodomaine de la sortiline, généré par un clivage par ADAM17, qui va inhiber le ciblage vers la voie des lysosomes et la dégradation du BDNF (Hermeijer *et al.*, 2006 ; Evans *et al.*, 2011).

Le NGF et son précurseur exercent leurs effets *via* trois types de récepteurs membranaires : le récepteur TrkA à activité tyrosine kinase, p75^{NTR}, un récepteur de la famille des récepteurs au TNF et la sortiline, un récepteur transmembranaire à domaine Vps10p (*Vacuolar protein sorting 10 protein*).

B. Le récepteur TrkA

1. Découverte

Dans les années 80, la première protéine Trk (*Tropomyosin receptor kinase*) doit son nom à la découverte d'un oncogène impliqué dans le cancer du côlon ; celui-ci contient les 7 premiers des 8 exons de la tropomyosine fusionnés à une séquence codant les domaines transmembranaire et intracellulaire d'une kinase inconnue à l'époque (Martin-Zanca *et al.*, 1986). Peu après, une deuxième kinase hautement similaire à TrkA fut purifiée et nommée TrkB (Klein *et al.*, 1989). Enfin, TrkC fut identifié en 1991, en même temps que fut attribué à chaque récepteur son ligand (Klein *et al.*, 1991a ; 1991b ; Lamballe *et al.*, 1991 ; Klein *et al.*, 1992).

2. Structure : du gène à la protéine

Le gène *NTRK1* humain codant le récepteur TrkA contient 17 exons et couvre environ 23 kb du chromosome 1, en région q21-q22. Ce gène est transcrit en un ARNm de 2,7 kb (Tableau 4) (Martin-Zanca *et al.*, 1989).

INTRODUCTION

| 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 | 790 | P04629 |

Tableau 4 : Caractéristiques du récepteur TrkA humain

Récepteur TrkA humain et sa localisation chromosomique. Dans le tableau, sont également référencées la taille de l'ARNm majoritaire avec son numéro d'accèsion NCBI et la taille en acides aminés de la protéine avec son numéro d'accèsion Uniprot.

Le récepteur TrkA appartient à la superfamille des récepteurs tyrosine kinase. C'est un récepteur transmembranaire de type I, glycosylé, de 790 acides aminés pour un poids moléculaire de 140 kDa. Son domaine extracellulaire est relié au domaine intracellulaire de 304 acides aminés par une seule hélice transmembranaire (Figure 13).

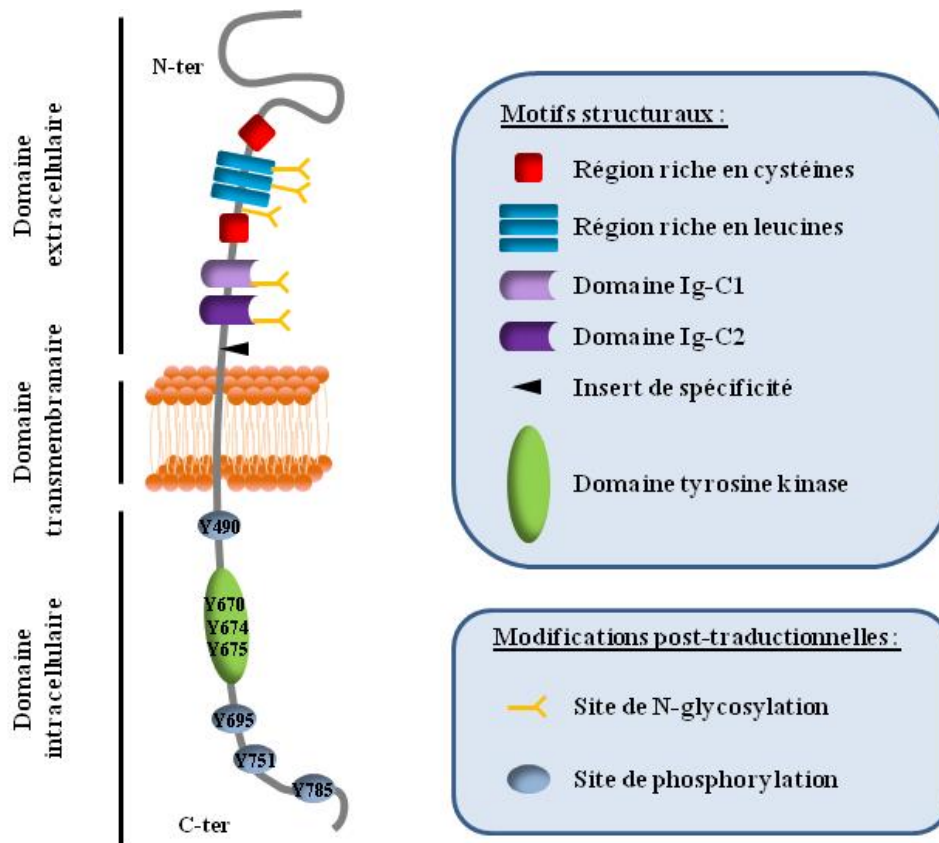


Figure 13 : Représentation schématique du récepteur TrkA

Le récepteur TrkA se compose d'un domaine extracellulaire constitué de régions riches en leucines encadrées par 2 régions riches en cystéines, suivies de 2 domaines de type immunoglobuline Ig-C1 et Ig-C2 et d'un insert augmentant la spécificité par rapport à son ligand primaire. Le domaine intracellulaire est, lui, composé d'un large domaine tyrosine kinase responsable de la trans-autophosphorylation du récepteur et de son activation. D'autres phosphorylations en dehors de ce domaine sont possibles et sont impliquées dans le recrutement de partenaires protéiques et/ou dans l'internalisation du récepteur. Les numéros des tyrosines mentionnées ici correspondent à l'isoforme TrkA-I, exprimée dans les tissus non-neuronaux.

INTRODUCTION

✓ *Domaine extracellulaire*

Le domaine extracellulaire de TrkA contient deux **régions riches en cystéines** (domaines D1 et D3) encadrant une **région riche en leucines** (domaine D2), suivies, dans le domaine juxtamembranaire, de deux **domaines de type immunoglobuline C2** (Ig-C2 ; domaines D4 et D5) et d'un **insert** de 6 résidus d'acides aminés (Val-Ser-Phe-Ser-Pro-Val), présent ou non, modifiant la spécificité du récepteur pour ses ligands. Le rôle du domaine D2 est pour l'instant controversé. Il participerait à la fixation du ligand sur le récepteur, mais seulement dans le cas de la liaison de la NT-3 (MacDonald & Meakin, 1996). Le domaine D4 participe à l'expression et à la bonne conformation du récepteur TrkA, notamment au niveau du deuxième domaine Ig-C2 (D5) (Urfer *et al.*, 1995 ; Holden *et al.*, 1997 ; Ultsch *et al.*, 1999). Ce domaine D5 joue par ailleurs un rôle important dans la liaison du NGF (Wiesmann & de Vos, 2001). Deux régions majeures d'interaction ont été mises en évidence grâce à la cristallisation du NGF lié au domaine D5 (Wiesmann *et al.*, 1999). Une première région appelée « *specificity patch* » ou domaine de spécificité met en jeu les 10 derniers résidus de la partie N-terminale du NGF et constitue certainement le premier déterminant à la spécificité de liaison. La deuxième région appelée « *conserved patch* » ou domaine conservé fait intervenir la partie C-terminale du domaine D5 et la partie centrale du NGF. Les domaines Ig-C2 stabilisent également la forme monomérique du récepteur TrkA, empêchant ainsi sa dimérisation spontanée et son activation en absence de NGF (Arevalo *et al.*, 2000).

La partie extracellulaire comporte également de nombreuses glycosylations qui permettent d'adresser le récepteur TrkA à la membrane et de prévenir son activation en absence de NGF (Watson *et al.*, 1999). Elles semblent essentielles à la signalisation, car des récepteurs non glycosylés peuvent former des homodimères mais sont incapables d'induire une réponse cellulaire comme la différenciation des cellules neuronales (Friedman & Greene, 1999).

✓ *Domaine intracellulaire*

Le domaine intracellulaire du récepteur TrkA présente de nombreuses tyrosines phosphorylables. Trois résidus tyrosines Y⁶⁷⁰, Y⁶⁷⁴ et Y⁶⁷⁵, au sein du **domaine tyrosine kinase**, sont responsables de la trans-autophosphorylation du récepteur. D'autres sites de phosphorylation sont également présents dans le domaine intracellulaire : Y⁴⁹⁰, Y⁶⁹⁵, Y⁷⁵¹

INTRODUCTION

et Y⁷⁸⁵ et sont responsables du recrutement des protéines adaptatrices nécessaires à la signalisation du récepteur. Enfin, bien que cela soit encore controversé, des résidus sérine et thréonine intracellulaires ont également été décrits mais leur rôle dans l'activité du récepteur TrkA est encore inconnu (MacPhee & Barker, 1997).

✓ *Isoformes de TrkA*

Deux isoformes ont été initialement identifiées et appelées TrkA-I et TrkA-II. Ces isoformes, d'une taille respective de 790 et 796 acides aminés, ne diffèrent que de 18 pb suite à l'épissage alternatif de l'exon 9 (Figure 14). En effet, TrkA-II, qui contient l'exon 9, possède un insert de 6 acides aminés dans son domaine extracellulaire dont la 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 puisque cette neurotrophine ne se lie pas sur TrkA-I (Clary & Reichardt, 1994). De plus, ces deux isoformes ont une expression différentielle : TrkA-I est préférentiellement exprimée dans les tissus non-neuronaux alors que TrkA-II est retrouvée dans les tissus neuronaux et en faible quantité dans le rein et le poumon (Barker *et al.*, 1993).

Une troisième isoforme, TrkA-III, a été identifiée plus récemment dans les neuroblastomes de stade précoce et le thymus et résulte de l'épissage alternatif des exons 6, 7 et 9 (Tacconelli *et al.*, 2004 ; 2007). Cette isoforme, dépourvue du premier domaine Ig-C2 et d'une partie normalement N-glycosylée, est générée préférentiellement en conditions d'hypoxie et est capable d'induire une signalisation indépendamment de la fixation du NGF dans les cellules de neuroblastomes pour promouvoir leur potentiel tumorigène (Tacconelli *et al.*, 2004 ; 2005a). L'utilisation de cette isoforme TrkA-III comme marqueur de la phase précoce des neuroblastomes est actuellement à l'étude (Tacconelli *et al.*, 2005b).

Enfin, deux variants appelés TrkA-L1 et TrkA-L0 présentent des modifications dans la séquence du domaine D2 extracellulaire (Figure 14). Pour TrkA-L1, l'épissage des exons 2 et 3 conduit à l'absence d'un des trois domaines riches en leucines alors que ces derniers sont totalement manquants dans l'isoforme TrkA-L0, de par l'épissage supplémentaire de l'exon 4 (Dubus *et al.*, 2000). Ces isoformes sont retrouvées dans le thymus, les testicules, le poumon et le rein chez le rat, mais pas dans le système nerveux et sont toujours

INTRODUCTION

exprimées en même temps que l'isoforme TrkA-I (Dubus *et al.*, 2000). Pour l'heure, les caractéristiques de liaison du NGF à ces isoformes ne sont pas encore connues.

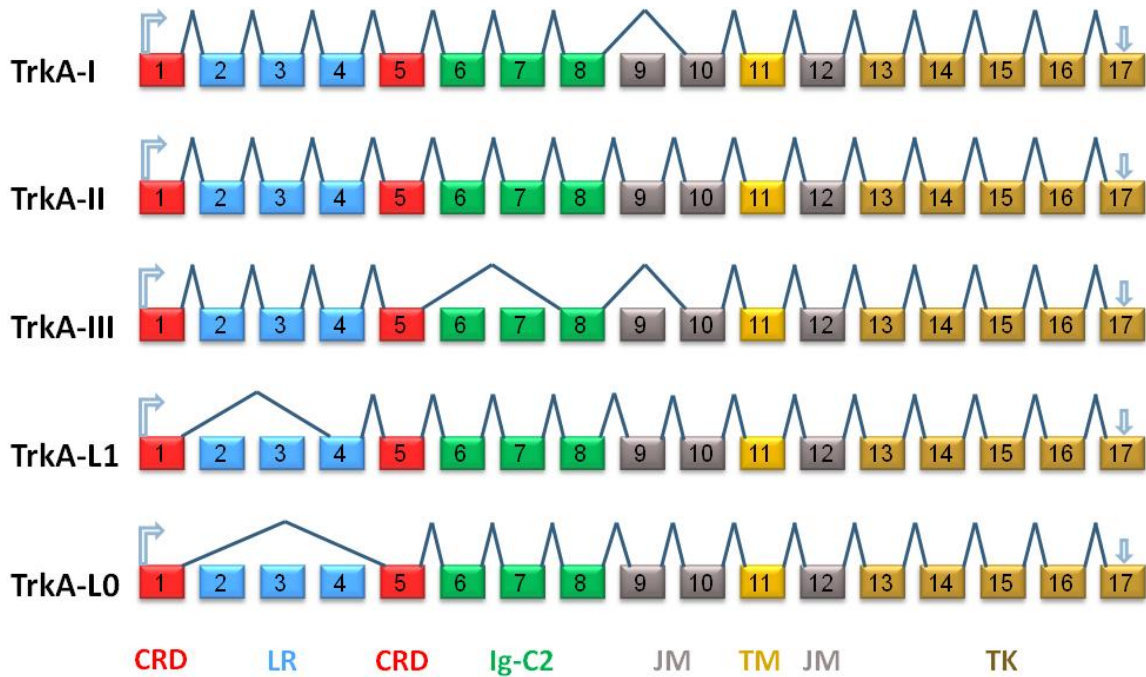


Figure 14 : Isoformes du récepteur TrkA

Les carrés représentent les 17 exons du gène *NTRK1*. *TrkA-II* est l'isoforme la plus longue, *TrkA-I* est épissée de l'exon 9 et *TrkA-III* est dépourvue des exons 6, 7 et 9. *TrkA-L1* est épissée des exons 2 et 3 alors que les exons 2, 3 et 4 sont absents de l'isoforme *TrkA-L0*. Les différentes couleurs correspondent aux différentes parties de la protéine, codées par les exons. Rouge : les CRD (Cystein Rich Domain) ; Bleu : LR (Leucine Rich motif) ; Vert : domaines immunoglobuline-like (Ig-C2) ; Gris : parties juxtamembranaires ; Orange : domaine transmembranaire ; Marron : domaine tyrosine kinase (TK).

3. Signalisation du récepteur TrkA

a. *Activation du récepteur*

L'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase, suite à la fixation de leur ligand, est classiquement décrite par une dimérisation des récepteurs, initiant l'activation du domaine kinase et la trans-autophosphorylation de résidus tyrosine au niveau du domaine intracellulaire (Schlessinger, 2000 ; Lemmon & Schlessinger, 2010). Néanmoins, une étude récente a montré que les récepteurs TrkA étaient présents dans les cellules, principalement, sous forme d'homodimères inactifs qui sont formés dans le réticulum endoplasmique (Shen & Maruyama, 2011). Cette observation a également été faite pour

INTRODUCTION

d'autres récepteurs comme l'EGFR et le GHR (*Growth Hormone Receptor*) (Gent *et al.*, 2002 ; Tao & Maruyama, 2008). En effet, les domaines transmembranaires de nombreux RTK, dont TrkA, ont la capacité intrinsèque de former des dimères membranaires stables (Finger *et al.*, 2009). Dans ce cas, le NGF n'induirait plus une homodimérisation du récepteur, mais plutôt une rotation des domaines transmembranaires des dimères de TrkA préformés, résultant en un réarrangement des domaines cytoplasmiques nécessaire à l'activation des récepteurs. Ce mécanisme a été décrit, entre autres, pour l'EGFR et le GHR (Moriki *et al.*, 2001 ; Latz *et al.*, 2007 ; Tao & Maruyama, 2008).

Le réarrangement conformationnel des domaines cytoplasmiques entraîne la trans-autophosphorylation des récepteurs, où chaque domaine kinase d'un monomère induit la phosphorylation de l'autre monomère. Les premiers résidus phosphorylés sont les tyrosines Y⁶⁷⁰, Y⁶⁷⁴ et Y⁶⁷⁵ à l'intérieur du domaine kinase, permettant d'augmenter l'activité catalytique de la tyrosine kinase (Mitra, 1991), qui va ensuite phosphoryler les tyrosines secondaires Y⁴⁹⁰, Y⁶⁹⁵, Y⁷⁵¹ et Y⁷⁸⁵ (Figure 15) (Stephens *et al.*, 1994).

INTRODUCTION

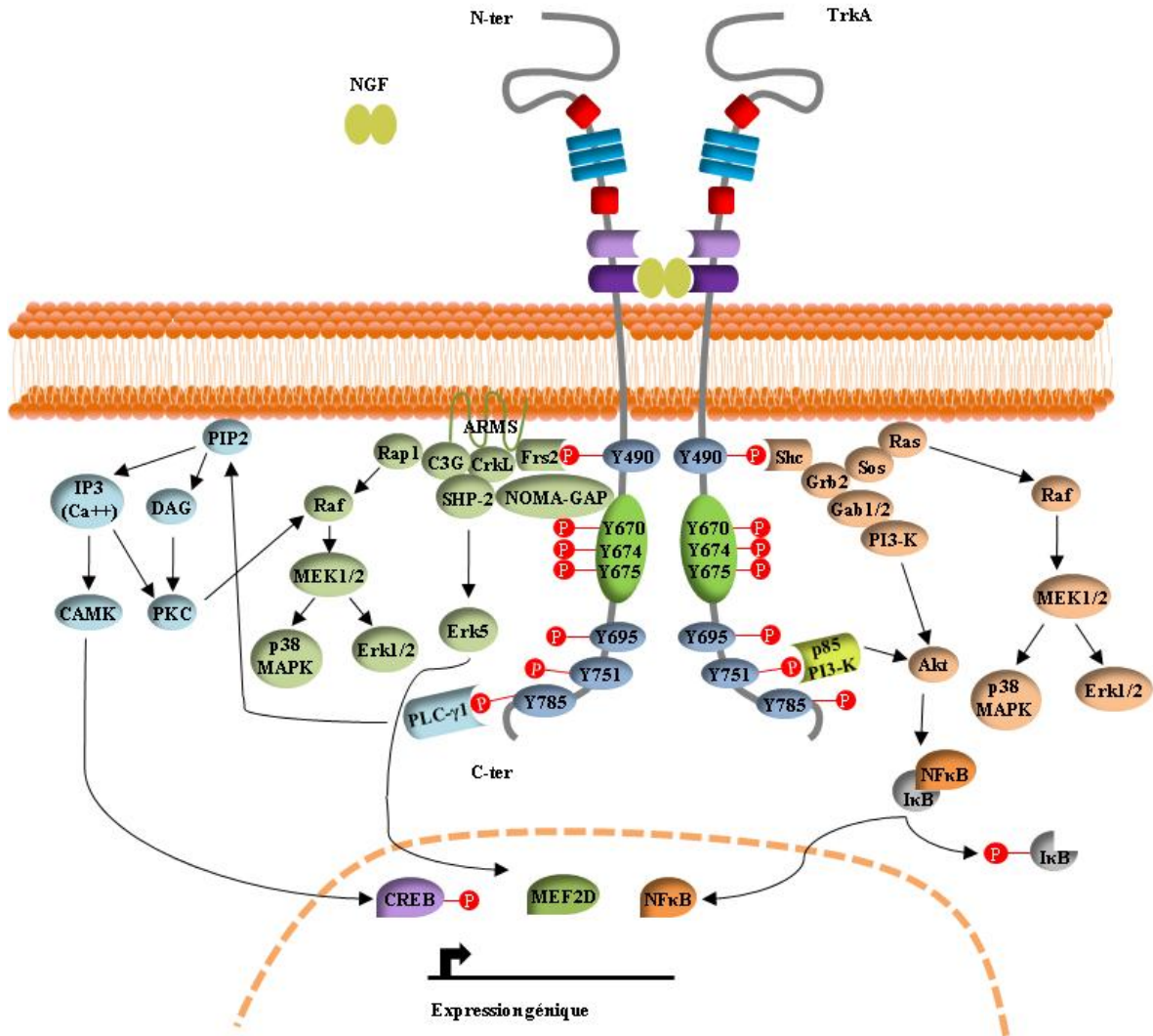


Figure 15 : Voies de signalisation associées au récepteur TrkA

Suite à la fixation du NGF, le dimère de récepteurs *TrkA* est activé, permettant sa trans-autophosphorylation au niveau des tyrosines Y^{670} , Y^{674} et Y^{675} du domaine kinase puis la phosphorylation des résidus Y^{490} , Y^{695} , Y^{751} et Y^{785} . Des protéines adaptatrices sont alors recrutées sur ces tyrosines phosphorylées : *Shc* et *Frs2* sur Y^{490} , la sous-unité p85 de la *PI3-K* sur Y^{751} et la *PLC- γ 1* au niveau du résidu Y^{785} . Le recrutement de *NOMA-GAP* est indépendant de la phosphorylation de *TrkA* et le site d'interaction sur le récepteur est encore inconnu. Les voies de signalisation sous-jacentes sont activées et vont conduire, en fonction du type cellulaire, à la survie, la prolifération, la différenciation ou la migration/invasion des cellules. *ARMS* : Ankyrin repeat-rich membrane spanning protein ; *CAMK* : Calcium/calmodulin-regulated protein kinase ; *C3G* : Rap guanine nucleotide exchange factor 1 ; *CREB* : Cyclic AMP-responsive element-binding protein ; *DAG* : Diacylglycerol ; *Erk* : Extracellular signal-regulated kinase ; *Frs2* : Fibroblast growth factor receptor substrate 2 ; *Gab1/2* : *Grb2*-associated-binding protein 1/2 ; *Grb2* : Growth factor receptor-bound protein 2 ; *Ikb* : Inhibitor of kappa B ; *IP3* : inositol 1,4,5-trisphosphate ; *MAPK* : Mitogen-activated protein kinase ; *MEF2D* : Myocyte-specific enhancer factor 2D ; *MEK1/2* : *MAPK* kinase 1/2 ; *NF- κ B* : Nuclear factor-kappa B ; *NGF* : Nerve Growth Factor ; *NOMA-GAP* : Neurite outgrowth multiadaptor Rho-GTPase-activating protein ; *PI3-K* : Phosphoinositide 3-kinase ; *PIP₂* : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; *PKC* : Protein kinase C ; *PLC- γ 1* : Phospholipase C-gamma1 ; *Rap1* : Ras-related protein 1 ; *Shc* : Src homology-2 containing protein ; *SHP2* : Src homology-2 containing tyrosine-protein phosphatase ; *Sos* : Son of sevenless ; *TrkA* : Tropomyosin-receptor kinase A.

INTRODUCTION

b. Recrutement des “docking proteins”

Suite à la phosphorylation des différents résidus tyrosine de son domaine intracellulaire, le récepteur TrkA va pouvoir recruter des protéines qui vont faire le lien direct ou indirect entre le récepteur activé et les protéines effectrices à domaines SH2 (*Src homology-2*) ou PTB (*Phospho-tyrosine binding domain*) (Segal & Greenberg, 1996) ; ce sont les « *docking proteins* » ou protéines d’amarrage (Brummer *et al.*, 2010). Quatre grandes familles de « *docking proteins* » ont été définies : les protéines Gab/DOS (*Daughter of sevenless*), les protéines IRS (*Insulin Receptor Substrate*), les protéines Dok (*Downstream of tyrosine kinases*) et Frs2 (*Fibroblast growth factor receptor substrate 2*). Ces protéines sont indispensables à la signalisation des RTK, et donc de TrkA, puisqu’elles jouent le rôle de plateformes d’assemblage pour l’activation, la coordination et la régulation de cette signalisation, et ce dans des compartiments subcellulaires spécifiques (Brummer *et al.*, 2010).

Les « *docking proteins* » sont recrutées sur les RTK *via* deux mécanismes essentiels :

- Interaction avec la membrane plasmique grâce à une modification post-traductionnelle ou un domaine particulier dans leur extrémité N-terminale. Cette relocalisation membranaire se fait, soit *via* une myristoylation de la protéine, dans le cas de Frs2 (Gotoh, 2008), soit par liaison à des phospholipides spécifiques (PIP₂, *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* ; PIP₃, *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*) par l’intermédiaire de domaines PH (*Pleckstrin homology*), pour les autres « *docking proteins* » (Wohrle *et al.*, 2009).
- Interaction avec le RTK phosphorylé sur un ou des résidu(s) tyrosine, soit directement par l’intermédiaire d’un domaine PTB (Frs2, IRS et Dok), soit indirectement *via* une ou plusieurs protéines adaptatrices comme Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) pour les protéines Gab (Lock *et al.*, 2000 ; Brummer *et al.*, 2010). Les « *docking proteins* » sont alors phosphorylées sur plusieurs résidus tyrosine permettant le recrutement des protéines adaptatrices à domaines SH2 et PTB.

Dans le cas de la signalisation induite par le récepteur TrkA, ces « *docking proteins* » revêtent une importance toute particulière puisqu’elles vont réguler le choix de la signalisation engagée mais également la durée (transitoire ou prolongée) du signal, en fonction du compartiment subcellulaire dans lequel se fera le recrutement de ces protéines.

INTRODUCTION

Les « *docking proteins* » interagissent avec TrkA au niveau de la tyrosine Y⁴⁹⁰ juxtamembranaire. Ainsi, Frs2 est capable de se lier directement au récepteur (Meakin *et al.*, 1999 ; Ong *et al.*, 2000) alors que Gab1 nécessite tout d'abord l'interaction de Shc (*Src homology-2 containing protein*) puis de Grb2 (Obermeier *et al.*, 1993b ; Stephens *et al.*, 1994 ; Holgado-Madruga *et al.*, 1997). Les voies de signalisation associées à ces protéines seront décrites ultérieurement.

L'interaction des protéines IRS-1 et IRS-2 avec le récepteur TrkA activé a également été décrite, dans les cellules HEK293, pour intervenir dans le recrutement de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3-K, de SHP-2 (*SH2-containing tyrosine phosphatase*) et de Grb2, associé à une activité accrue de la PI3-K (Miranda *et al.*, 2001). Cette interaction est majoritairement localisée sur la tyrosine Y⁴⁹⁰, même si une interaction résiduelle est observée sur un récepteur TrkA muté Y⁴⁹⁰F, suggérant l'implication d'autres résidus (Wolf *et al.*, 1995). L'interaction et l'activation (phosphorylation) d'IRS-1 est, par ailleurs, dépendante de l'activité kinasique de TrkA puisqu'elles sont inhibées par le K252a ou l'expression d'un mutant dépourvu d'activité kinasique (Tapley *et al.*, 1992). En revanche, dans les cellules PC12, aucune interaction entre IRS-1 et TrkA n'est observée après traitement au NGF (Ohmichi *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent que l'interaction des « *docking proteins* » sur TrkA est étroitement liée au type cellulaire. Ainsi, pour le récepteur TrkB, un traitement au BDNF permet le recrutement d'IRS-1 et d'IRS-2 dans les neurones primaires mais pas dans les cellules PC12 (Yamada *et al.*, 1997).

Enfin, bien que cela n'ait pas été démontré pour TrkA, la protéine Dok5 interagit avec les récepteurs TrkB et TrkC et joue un rôle dans l'activation des MAPK après stimulation par les neurotrophines (Shi *et al.*, 2006). Dok6 peut également être activée par TrkC et participe à la neuritogenèse induite par la NT-3 dans les neurones corticaux de souris (Li *et al.*, 2010b).

Suite à l'activation du récepteur TrkA par le NGF, trois voies de signalisation principales ont été décrites, en particulier dans les cellules neuronales et les cellules de phéochromocytome de rat PC12 : la voie des MAPK Ras/Raf, la voie PI3-K/Akt et la voie PLC- γ 1 (*PhosphoLipase C- γ 1*)-PKC (*Protein Kinase C*) (Figure 15) (Huang & Reichardt, 2003 ; Arevalo & Wu, 2006).

INTRODUCTION

c. Voies de signalisation associées au récepteur TrkA

✓ *Voies des MAPK*

L'importance des « *docking proteins* » dans la signalisation de TrkA induite par le NGF est particulièrement bien illustrée avec l'activation des MAPK. En effet, au niveau de la tyrosine Y⁴⁹⁰, la protéine Shc peut se lier pour ensuite recruter la protéine Grb2 puis le facteur Sos (*Son of sevenless*), facteur d'échange de GTP pour la petite protéine G Ras (Stephens *et al.*, 1994). Les protéines Raf-1 et B-Raf sont alors activées et vont à leur tour induire l'activation des MAPK, en particulier Erk1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase*) et p38MAPK (Thomas *et al.*, 1992 ; Troppmair *et al.*, 1992 ; Xing *et al.*, 1998). Cette voie de transduction conduit à une activation transitoire des MAPK nécessaire à la différenciation des neurones et des cellules PC12 (Marshall, 1995).

Sur le même résidu Y⁴⁹⁰, la protéine Frs2 peut également se lier pour conduire au recrutement d'un complexe protéique CrkL/C3G/Rap1 qui aboutit, cette fois-ci, à une activation prolongée des MAPK (York *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2001 ; Hisata *et al.*, 2007). La formation de ce complexe est contrôlée par la protéine transmembranaire ARMS/Kidins220 (*Ankyrin repeat-rich membrane spanning protein*), phosphorylée suite à un traitement au NGF, et qui s'associe à TrkA *via* une interaction entre les domaines transmembranaires (Kong *et al.*, 2001 ; Arevalo *et al.*, 2004). Cette signalisation nécessite l'internalisation du récepteur TrkA dans les compartiments endosomaux (York *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 2001). Une activation d'Erk5 est aussi reportée pour cette voie, *via* l'interaction de la phosphatase SHP-2 avec Frs2 et CrkL, et conduit à la survie cellulaire (Watson *et al.*, 2001). La phosphatase SHP-2 peut également être recrutée sur TrkA, *via* l'adaptateur NOMA-GAP (*Neurite outgrowth multiadaptor RhoGTPase-activating protein*) qui se fixe sur le récepteur au niveau d'un site encore inconnu. Cette voie permet, sous l'effet du NGF, l'activation soutenue d'Erk5, associée à une régulation négative des protéines Cdc42 et PAK (*p21-activated kinase*) conduisant à la croissance des neurites (Rosario *et al.*, 2007).

La phosphorylation des MAPK permet l'activation de protéines telles que Rsk et MSK1 qui contrôlent la transcription génique. Ces deux kinases vont en effet phosphoryler et activer CREB (*Cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein*), un facteur de transcription pouvant réguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la survie et la différenciation cellulaires, entre autres (Riccio *et al.*, 1999 ; West *et al.*, 2002).

INTRODUCTION

Ainsi, en fonction de la « *docking protein* » recrutée au niveau de Y⁴⁹⁰ de TrkA et de la localisation subcellulaire du récepteur, la signalisation sous-jacente induite par l'axe NGF/TrkA conduit à des effets biologiques distincts (Meakin *et al.*, 1999 ; Kao *et al.*, 2001 ; Arevalo *et al.*, 2006a).

✓ Voie PI3-K/Akt

L'activation du récepteur TrkA par le NGF conduit à l'induction de la voie de signalisation PI3-K/Akt. En effet, le recrutement des protéines Shc, Grb2, Gab1 et Ras, au niveau de Y⁴⁹⁰, permet l'interaction entre la PI3-K et Gab1/Ras et une activation de la PI3-K par Ras (Holgado-Madruga *et al.*, 1997 ; Korhonen *et al.*, 1999). L'association entre Gab1 et la PI3-K est primordiale puisque l'expression de Gab1 mutée dans son site de liaison à la PI3-K diminue l'effet de survie du NGF (Holgado-Madruga *et al.*, 1997). Dans plusieurs populations neuronales, TrkA peut également recruter et activer la PI3-K, *via* la protéine IRS-1 (Yamada *et al.*, 1997). Enfin, le recrutement de la PI3-K sur TrkA peut aussi se faire de manière directe, *via* l'interaction de la sous-unité régulatrice p85 sur le résidu Y⁷⁵¹ (Ohmichi *et al.*, 1992 ; Obermeier *et al.*, 1993b).

Dans tous les cas, la PI3-K peut alors activer la protéine kinase Akt, impliquée dans de nombreux processus biologiques (Fayard *et al.*, 2010). Entre autres, la voie PI3-K/Akt est décrite pour jouer un rôle important dans la survie neuronale. Les acteurs de cet effet ont été identifiés. Il s'agit de la protéine Bad et des facteurs de transcription « *forkhead* » et NF-κB. La phosphorylation de Bad par Akt conduit à sa phosphorylation par d'autres kinases et à sa séquestration par les protéines 14-3-3, inhibant alors son action pro-apoptotique (Datta *et al.*, 1997). De même, le facteur de transcription « *forkhead* », une fois phosphorylé par Akt, quitte le noyau et est séquestré par les protéines 14-3-3, empêchant l'activation de la transcription de gènes codant des protéines pro-apoptotiques (Brunet *et al.*, 1999 ; 2002 ; Zheng *et al.*, 2002). Au contraire, NF-κB est transloqué dans le noyau suite à la phosphorylation de sa sous-unité inhibitrice IκB par Akt ; il peut alors activer la transcription de divers facteurs anti-apoptotiques (Foehr *et al.*, 2000).

✓ Voie PLC-γ1-PKC

Avant même que le NGF ne soit identifié comme le ligand de TrkA, il avait déjà été montré qu'il activait la phosphorylation de la PLC-γ1 (Kim *et al.*, 1991). La liaison du NGF sur TrkA entraîne la phosphorylation de la tyrosine Y⁷⁸⁵, à l'extrémité C-terminale du

INTRODUCTION

récepteur, qui permet le recrutement et la phosphorylation de la PLC- γ 1 (Vetter *et al.*, 1991 ; Obermeier *et al.*, 1993a ; Stephens *et al.*, 1994). La PLC- γ 1 hydrolyse alors des PIP₂ en IP₃ (*Inositol 1,4,5-trisphosphate*) et en DAG (*Diacylglycerol*). D'une part, les IP₃ se lient à leurs récepteurs exprimés à la membrane du réticulum endoplasmique et induisent le relargage des stocks calciques internes dans le cytoplasme, ce qui stimule les isoformes de la PKC régulées par le Ca²⁺ et active les CAMK (*Ca²⁺/calmodulin-regulated protein kinase*). D'autre part, les DAG sont également capables d'activer des isoformes de la PKC. Dans les PC12 stimulées par le NGF, la PKC active ensuite Raf, puis les MAPK, ce qui aboutit à la croissance des neurites (Corbit *et al.*, 1999).

Dans les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer, des taux élevés de PLC- γ 1 phosphorylée sont retrouvés (Zhang *et al.*, 1998). Plus récemment, il a été montré que, suite à une déplétion longue en NGF, TrkA s'autophosphoryle par un mécanisme encore inconnu mais qui conduit à la phosphorylation de la PLC- γ 1 concomitante à l'inactivation d'Akt et à l'agrégation de peptides A β (marqueur moléculaire d'Alzheimer) avec le récepteur, conduisant à la mort neuronale (Matrone *et al.*, 2009). Comme l'absence de signal trophique du NGF est considérée comme une des causes possibles de la maladie d'Alzheimer (Covaceuszach *et al.*, 2009), les auteurs proposent que la phosphorylation anormale de la PLC- γ 1 *via* TrkA reflète un évènement moléculaire majeur de la maladie.

d. Mécanismes de régulation de l'activité de TrkA

✓ Recrutement de phosphatases

Dans les cellules neuronales, suite à la fixation du NGF et l'induction des voies de signalisation associées à TrkA, le récepteur subit l'action de différentes phosphatases qui vont pouvoir déphosphoryler les tyrosines Y⁶⁷⁴ et Y⁶⁷⁵ du domaine kinase et établir un rétrocontrôle négatif de son activité. Ainsi, la phosphatase SHP-1 est capable de se lier au récepteur sur le résidu Y⁴⁹⁰ et de déphosphoryler le domaine kinase, inhibant ainsi la survie des neurones (Marsh *et al.*, 2003). Contrairement à la phosphatase SHP-2 qui est impliquée dans l'activation des MAPK et l'induction de la différenciation neuronale après traitement au NGF (Goldsmith & Koizumi, 1997 ; Rusanescu *et al.*, 2005), SHP-1 semble jouer uniquement un rôle de régulateur négatif de la signalisation de TrkA (Wright *et al.*, 1997). Dans les cellules cancéreuses de sein où nous verrons par la suite que la signalisation de l'axe NGF/TrkA est très importante, l'expression du récepteur et de la protéine p53 non mutée inhibent l'expression de SHP-1, favorisant ainsi la phosphorylation du domaine

INTRODUCTION

kinase de TrkA qui conduit à une inhibition de la prolifération dans ces cellules (Montano, 2009). Enfin, plusieurs membres de la famille des RPTP (*Receptor-like protein tyrosine phosphatase*) ont également été décrits pour inhiber la phosphorylation du domaine kinase de TrkA et la croissance des neurites induite par le NGF (Shintani *et al.*, 2001 ; Faux *et al.*, 2007 ; Shintani & Noda, 2008).

Une autre protéine phosphatase, PP2A (*Protein phosphatase 2A*), a été décrite pour jouer, cette fois-ci, un rôle dans l'amplification de la réponse au NGF. En effet, les sous-unités B'beta et B'delta de cette sérine/thréonine phosphatase permettent son interaction avec le récepteur TrkA et la déphosphorylation de résidus sérine et thréonine du récepteur. Ceci aboutit à une autophosphorylation soutenue de TrkA ainsi qu'à une activation prolongée des voies des MAPK et d'Akt, induisant la différenciation neuronale (Van Kanegan & Strack, 2009). Cette étude suggère ainsi l'existence de résidus sérine et thréonine phosphorylés qui réguleraient négativement l'activité du récepteur, comme cela a déjà pu être proposé auparavant (MacPhee & Barker, 1997 ; Van Kanegan & Strack, 2009).

✓ *Clivage du récepteur TrkA*

Une forme soluble du récepteur TrkA a été mise en évidence dans les liquides biologiques et les surnageants de culture. Cette forme résulte d'un clivage du récepteur, générant deux fragments : le fragment soluble constitué de la partie extracellulaire du récepteur et un fragment, lié à la membrane cellulaire, constitué des domaines transmembranaire et intracellulaire (Cabrera *et al.*, 1996). Plusieurs tailles de fragments clivés ont été identifiées, avec un fragment majoritaire de 41 kDa et des fragments mineurs de 38 et 40 kDa (Diaz-Rodriguez *et al.*, 1999). Le clivage de la partie extracellulaire est induit par le NGF lui-même et pourrait ainsi constituer un mécanisme de régulation de l'activation du récepteur comme cela a été montré pour d'autres RTK (Ancot *et al.*, 2009). D'autre part, le clivage du récepteur TrkA conduit à l'activation de son domaine tyrosine kinase intrinsèque et entraîne l'activation d'une signalisation intracellulaire NGF-indépendante (Cabrera *et al.*, 1996 ; Diaz-Rodriguez *et al.*, 1999). Néanmoins, à l'heure actuelle, les protéases impliquées dans ce clivage ainsi que le rôle fonctionnel des fragments générés restent inconnus.

INTRODUCTION

✓ *Transactivation du récepteur TrkA*

L'expression et l'activation de TrkA peut être sous l'influence d'autres récepteurs co-exprimés dans les cellules. En particulier, une activation de TrkA a été mise en évidence, en absence de NGF, après traitement des cellules PC12 par l'adénosine (Lee & Chao, 2001). La cinétique d'activation du récepteur par cette voie est plus lente que l'activation directe par le NGF. En effet, la phosphorylation de TrkA est détectée après 90 min de traitement par l'adénosine. Aucune liaison directe de l'adénosine sur le récepteur TrkA n'a été mise en évidence et cette transactivation n'implique pas la néo-synthèse de NGF. Cet effet est en fait dû à l'activation par l'adénosine de son récepteur A2A couplé à une protéine G_s qui conduit à l'activation de Fyn, une kinase appartenant à la famille de la tyrosine kinase Src. Cette kinase phosphoryle TrkA et induit notamment l'activation de la voie PI3-K/Akt (Lee & Chao, 2001 ; Rajagopal & Chao, 2006). Cet effet serait également dépendant du calcium puisque le pré-traitement des cellules par des chélateurs de calcium bloque cette transactivation (Lee & Chao, 2001). De plus, le pré-traitement des cellules par des inhibiteurs de la PI3-K entraîne une inhibition de la phosphorylation d'Akt, mais pas du récepteur TrkA montrant que l'activation de la voie PI3-K ne participe pas directement à la transactivation de TrkA, mais en est bien une conséquence (Lee & Chao, 2001 ; Lee *et al.*, 2002a).

Un autre agoniste de récepteur couplé aux protéines G (RCPG), le peptide PACAP (*Pituitary adenylate cyclase activating peptide*), est également capable d'induire l'activation du récepteur TrkA et de la voie PI3-K/Akt dans les cellules PC12, avec la même cinétique que l'adénosine, en mettant en jeu la tyrosine kinase Src (Lee *et al.*, 2002b ; Shi *et al.*, 2010). La découverte de ce phénomène de transactivation suggère que l'activation du récepteur TrkA, en absence de NGF, par ces peptides, pourrait participer à leur effet neuroprotecteur, inexpliqué jusqu'alors (Lee *et al.*, 2002b). Un traitement des cellules PC12 par la forskoline, un activateur de l'adénylyl cyclase entraînant une augmentation intracellulaire d'AMP cyclique (AMPC), conduit également à une phosphorylation du récepteur TrkA et à une activation de la voie PI3K (Piiper *et al.*, 2002). Cette étude démontre que l'activation de l'adénylyl cyclase par les RCPG couplés à des protéines G de type G_s, comme le récepteur A2A de l'adénosine et les récepteurs du peptide PACAP, participent à la transactivation du récepteur TrkA.

INTRODUCTION

De plus, dans les cellules PC12 et les neurones, LRP1 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 1*), une protéine d'endocytose, peut aussi transactiver TrkA *via* les kinases de la famille de Src et induire la croissance des neurites (Shi *et al.*, 2009). Enfin, la transactivation du récepteur TrkA interviendrait au niveau intracellulaire, notamment sur des récepteurs TrkA néo-formés présents au niveau de l'appareil de Golgi, avant leur expression à la membrane cellulaire (Rajagopal *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces travaux démontre que les mécanismes de transactivation du récepteur TrkA sont un moyen d'induire des signaux intracellulaires participant à la survie neuronale indépendamment d'une stimulation par le NGF.

4. Internalisation du récepteur

Suite à la fixation du NGF sur TrkA, le complexe ligand/récepteur est internalisé (Eveleth & Bradshaw, 1992 ; Loeb & Greene, 1993 ; Gargano *et al.*, 1997 ; Zapf-Colby & Olefsky, 1998). Trois mécanismes contribuant à cette internalisation ont été décrits jusqu'à présent : la voie de la clathrine, la voie des cavéoles et la macropinocytose (Figure 16) (Zweifel *et al.*, 2005). La variété des voies permettant l'internalisation du récepteur TrkA suggère que ces mécanismes pourraient dépendre du contexte cellulaire dans lequel le NGF active TrkA, ou de l'amplitude du signal généré par l'activation du récepteur (Zweifel *et al.*, 2005). La concentration en ligand pourrait également entrer en jeu : il a été montré pour le récepteur EGFR que l'EGF à faibles concentrations favorise son internalisation *via* la voie de la clathrine, alors que l'EGF à des concentrations plus fortes induit préférentiellement l'internalisation *via* la voie des cavéoles (Aguilar & Wendland, 2005 ; Sigismund *et al.*, 2005). Ceci est aussi corrélé à une différence dans la signalisation sous-jacente puisque la première voie favorise le recyclage membranaire de l'EGFR et sa signalisation alors que la seconde voie conduit préférentiellement à son ubiquitination et à sa dégradation (Aguilar & Wendland, 2005 ; Sigismund *et al.*, 2005).

INTRODUCTION

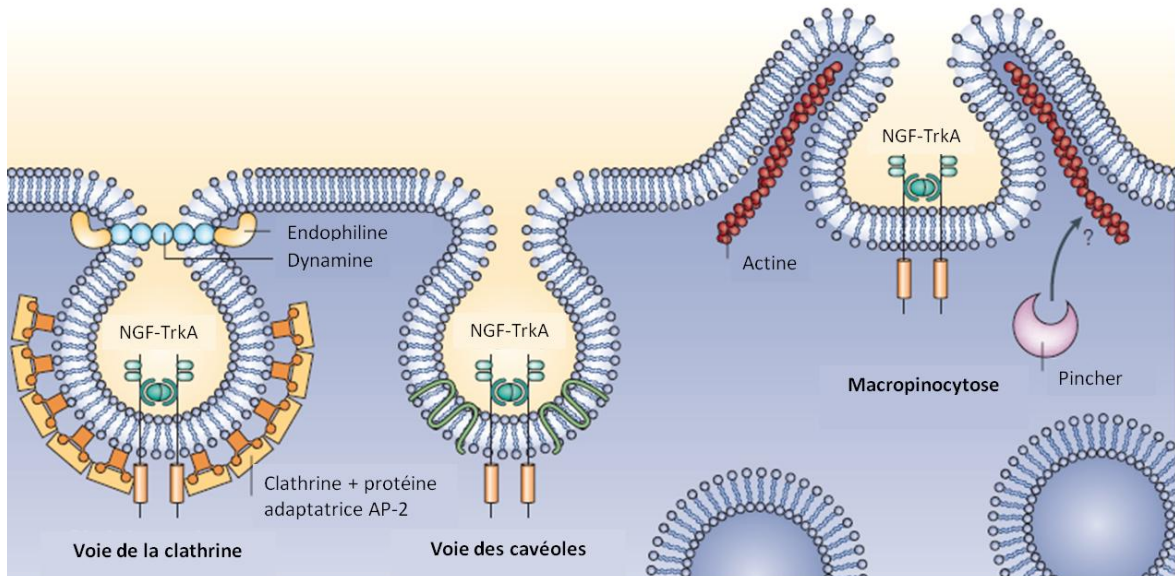


Figure 16 : Mécanismes d'internalisation du récepteur TrkA

L'internalisation du récepteur TrkA peut avoir lieu au niveau de puits de clathrine à la surface de la cellule, avec formation des endosomes par séparation de la membrane cellulaire grâce à la dynamine. Le second mécanisme met en jeu une internalisation au niveau des cavéoles pré-formées via la phosphorylation de la cavéoline-1. Enfin, le troisième mécanisme est la macropinocytose, mettant en jeu la formation de pseudopodes membranaires grâce à la polymérisation de l'actine, permettant d'englober les récepteurs et de les internaliser. Ce mécanisme est sous la dépendance d'une protéine chaperonne appelée Pincher (Zweifel et al., 2005).

a. Voies d'internalisation de TrkA

✓ Voie de la clathrine

L'activation du récepteur TrkA conduit au recrutement de la clathrine sous la membrane cellulaire, au niveau de zones particulières pré-formées, appelées puits à clathrine (Figure 16). La membrane s'invagine à cet endroit, puis des vésicules intracellulaires se détachent de la membrane pour former des endosomes (Wiley & Burke, 2001). Le NGF induit le recrutement de la clathrine sous la membrane des cellules PC12 et des neurones sensitifs de rat, en favorisant la formation de complexes contenant le récepteur TrkA activé, la chaîne lourde de la clathrine et la protéine adaptatrice de la clathrine AP-2 (Beattie et al., 2000 ; Howe et al., 2001). Ce recrutement est sous le contrôle du résidu phosphorylé Y⁶⁹⁵, contenu dans un motif d'endocytose Yxxφ (où φ est un acide aminé aromatique) (de Pablo et al., 2008). En effet, un récepteur muté sur ce site est moins internalisé et n'est plus capable de recruter la chaîne lourde de la clathrine. Les complexes formés contiennent également des protéines activées de la voie des MAPK, en particulier

INTRODUCTION

MEK et Erk1/2 phosphorylés (Howe *et al.*, 2001). Enfin, l'internalisation de TrkA dépend également de la déphosphorylation de la dynamine, une protéine GTPase, régulée par la calcineurine, et qui permet la scission et la séparation des vésicules d'internalisation de la membrane cellulaire (Zhang *et al.*, 2000 ; Ye *et al.*, 2003 ; Bodmer *et al.*, 2011).

✓ *Voie des cavéoles*

Le récepteur TrkA est également exprimé dans des invaginations de membrane appelées cavéoles. Ces cavéoles sont des domaines riches en cholestérol, présents de manière constitutive sur la membrane des cellules (Stan, 2005), et constitués de protéines spécifiques appelées cavéolines. L'association de ces protéines avec les RTK activés permet leur phosphorylation et le recrutement de protéines comme Csk (*C-terminal Src kinase*) ou Grb7 (*Growth factor receptor-bound protein 7*) pour le récepteur de l'EGF, ou IRS-1 pour le récepteur de l'insuline, qui participent à l'internalisation de ces récepteurs de manière clathrine-indépendante (Pike, 2005). Les mécanismes exacts d'internalisation du récepteur TrkA par les cavéoles ne sont pas connus, mais il est concevable que ceux-ci aient des points communs avec ceux décrits pour les autres RTK (Figure 16). Le récepteur TrkA phosphorylé interagit directement avec les cavéolines exprimées dans la membrane des cavéoles, en particulier la cavéoline-1 (Bilderback *et al.*, 1999 ; Huang *et al.*, 1999) et celle-ci semble jouer un rôle dans la régulation de cette phosphorylation (Huang *et al.*, 1999), ainsi que dans l'activation des voies de signalisation du récepteur TrkA, en particulier de la voie des MAPK (Peiro *et al.*, 2000). Ainsi, l'interaction entre TrkA et la cavéoline-1 induit une diminution de la phosphorylation du résidu Y⁴⁹⁰, un clivage du récepteur et l'inhibition de la mort cellulaire induite par TrkA dans des cellules d'ostéosarcome (Jung & Kim, 2010).

✓ *Macropinocytose*

Une étude réalisée sur des neurones sympathiques a montré que l'internalisation du NGF pouvait être bloquée par un agent dépolymérisant l'actine (Reynolds & Hendry, 1999). L'implication d'un mécanisme de macropinocytose dans l'internalisation du récepteur TrkA a ensuite été proposée grâce à des travaux réalisés dans les PC12 (Jullien *et al.*, 2003). Cette voie est régulée principalement par la protéine Pincher, puisque que la surexpression de cette protéine entraîne une augmentation de l'internalisation du récepteur

INTRODUCTION

TrkA au niveau de sites de macropinocytose, de manière totalement clathrine-indépendante (Shao *et al.*, 2002). La protéine Rac, une Rho GTPase, est également impliquée dans ce phénomène (Valdez *et al.*, 2007). Cette voie joue un rôle majeur dans la signalisation de l'axe NGF/TrkA puisqu'elle est impliquée dans le transport rétrograde du récepteur conduisant à la survie neuronale (Valdez *et al.*, 2005 ; Philippidou *et al.*, 2011) mais également dans l'induction de l'apoptose dans des cellules de médulloblastome (Li *et al.*, 2010a).

✓ *Rôle du domaine kinase de TrkA dans son internalisation*

Le rôle de l'activité kinasique du récepteur TrkA dans son internalisation reste controversé pour l'instant. L'inhibition de cette activité par des inhibiteurs pharmacologiques ou par expression de mutants ne possédant pas de domaine tyrosine kinase intrinsèque, dans les cellules neuronales, peut conduire dans certaines études à une inhibition de l'internalisation du récepteur TrkA (Reynolds *et al.*, 1998 ; Ye *et al.*, 2003 ; Heerssen *et al.*, 2004), alors que d'autres études, réalisées dans les mêmes cellules, montrent que l'internalisation du récepteur n'est pas affectée (Kahle *et al.*, 1994 ; Jullien *et al.*, 2003). Une autre étude suggère que l'activité kinasique de TrkA pourrait être impliquée dans l'adressage vers les endosomes tardifs puis les lysosomes, puisqu'un mutant du récepteur TrkA ne possédant pas de domaine tyrosine kinase est plutôt dirigé vers des endosomes de recyclage après internalisation (Saxena *et al.*, 2005). Des résultats comparables ont été observés pour un récepteur TrkB tronqué de son domaine kinase, qui suit alors préférentiellement la voie des endosomes de recyclage (Alderson *et al.*, 2000). Ainsi, l'activité kinasique du récepteur TrkA ne serait pas impliquée dans les mécanismes mêmes d'internalisation du récepteur mais contribuerait à diriger préférentiellement le récepteur vers la voie des endosomes précoces puis tardifs, par rapport à la voie des endosomes de recyclage.

b. Notion d'endosome de signalisation (« signaling endosome »)

La notion d'endosome de signalisation a été établie grâce à l'étude du transport rétrograde du NGF et de TrkA dans les neurones. En effet, il a été décrit que le NGF était capable d'induire la survie des neurones en favorisant l'expression de gènes spécifiques dans les corps cellulaires neuronaux. L'internalisation du NGF dans des vésicules contenant des marqueurs caractéristiques des endosomes précoces, comme la petite protéine G Rab5 et son effecteur EEA1 (*Early endosome antigen 1*) est nécessaire pour l'induction de cet effet

INTRODUCTION

(Delcroix *et al.*, 2003). Ces endosomes jouent ainsi le rôle de navettes pour transporter le NGF lié au récepteur TrkA le long de l'axone. Ils servent également de plateformes à partir desquelles les signaux vont être initiés (Figure 17) (Grimes *et al.*, 1996 ; Delcroix *et al.*, 2003). En effet, l'endosome précoce permet à de très nombreuses protéines non exprimées à la membrane cellulaire d'accéder au récepteur TrkA. Une activation prolongée dans le temps de la voie des MAPK semble par exemple possible uniquement à partir d'une localisation endosomale du récepteur TrkA (York *et al.*, 1998). En effet, le NGF active la petite protéine G Rap1 exprimée sur les membranes endosomales, qui elle-même induit l'activation de Raf et de la voie de Erk1/2 (York *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2001). Ainsi, les composants de la voie des MAPK Rap1, Raf, Erk1 et Erk2 sont associés à l'endosome précoce et migrent avec lui au cours du transport rétrograde (Delcroix *et al.*, 2003).

Dans les cellules PC12, la signalisation engagée par le NGF dépend de la localisation subcellulaire du récepteur TrkA. En effet, lorsque le récepteur est présent à la surface cellulaire, sa signalisation conduit à la survie des cellules alors que le récepteur présent dans les endosomes permet d'induire la différenciation cellulaire (Zhang *et al.*, 2000).

INTRODUCTION

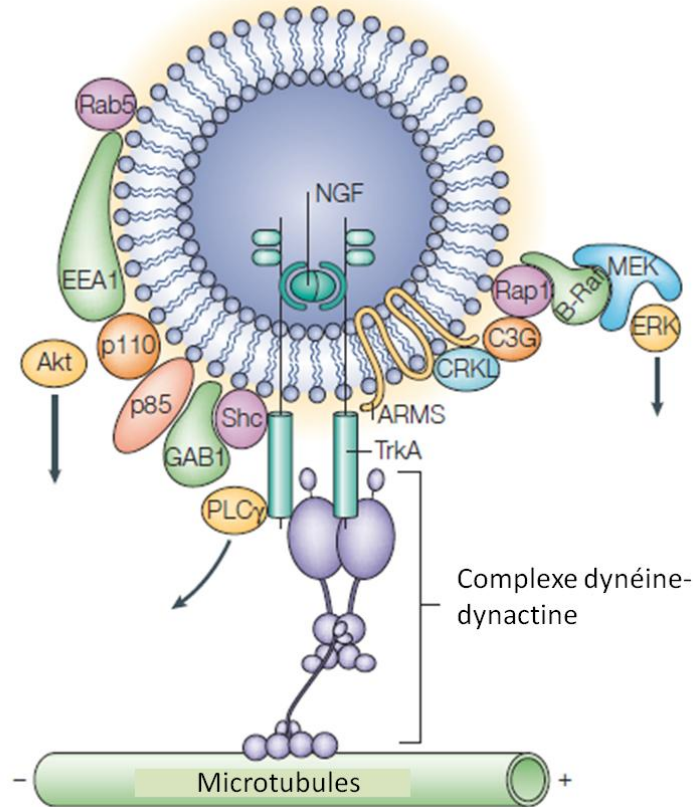


Figure 17 : Représentation schématique d'un endosome de signalisation

L'internalisation du récepteur TrkA conduit à la formation d'endosomes précoces qui servent de plateformes de signalisation. Les effecteurs recrutés sont la protéine adaptatrice Shc, les petites protéines G Rap1 et Rab5, la protéine EEA1, la PLC- γ 1, des constituants de la voie des MAPK, notamment Raf, MEK et Erk et des constituants de la voie PI3-K/Akt. Le récepteur TrkA interagit également avec le complexe dynéine-dynactine qui le relie au réseau des microtubules et permet le transport rétrograde le long des axones des nerfs (Zweifel et al., 2005).

c. Endosomes précoces : vers le recyclage ou la dégradation ?

Après internalisation, les RTK activés vont subir un tri au niveau des endosomes précoces pour être adressés soit vers les endosomes de recyclage pour retourner à la membrane plasmique soit vers les endosomes tardifs puis les lysosomes pour être dégradés (Wiley & Burke, 2001 ; Jullien *et al.*, 2002 ; Saxena *et al.*, 2005). Ainsi, le récepteur TrkA, une fois activé par le NGF et internalisé, peut être dirigé vers des endosomes de recyclage, avant d'être réexprimé à la surface de la cellule. Ce recyclage est dépendant d'une séquence en acides aminés spécifique (résidus 464-484) contenue dans la partie juxtamembranaire du récepteur (Chen *et al.*, 2005a). L'adressage vers l'une des deux voies est également dépendant de l'ubiquitination du récepteur et de l'activité du protéasome.

INTRODUCTION

En effet, l'ubiquitination du récepteur TrkA, suite à une activation par le NGF, joue un rôle majeur dans son endocytose et son trafic intracellulaire (Acconcia *et al.*, 2009), notamment en ciblant le récepteur vers la voie des endosomes tardifs et des lysosomes pour permettre sa dégradation (Geetha & Wooten, 2008). Le récepteur peut être soit polyubiquitinylé par des chaînes d'ubiquitine liées par le résidu K⁶³, soit multimonoubiquitinylé.

La polyubiquitination de TrkA, sur le résidu K⁴⁸⁵, est régulée par TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*), une E3 ubiquitine ligase, et est nécessaire à la fois pour l'activation des cascades de signalisation menant à la survie et à la différenciation neuronale, mais également à la dégradation du récepteur dans les lysosomes (Geetha *et al.*, 2005 ; Geetha & Wooten, 2008 ; Jadhav *et al.*, 2008). Ce mécanisme est dépendant de la co-expression de p75^{NTR} bien que cela soit encore controversé. En effet, une étude a montré que l'expression de p75^{NTR} diminuait l'ubiquitination de TrkA et donc son internalisation (Makkerh *et al.*, 2005) alors qu'une autre étude a montré que cette co-expression était absolument nécessaire pour la polyubiquitination de TrkA puisque p75^{NTR} agirait comme intermédiaire pour le recrutement de TRAF6, *via* la protéine p62 (Geetha *et al.*, 2005 ; Wooten *et al.*, 2005).

La monoubiquitination de TrkA est également un mécanisme complexe puisqu'elle peut être régulée par plusieurs enzymes. La protéine NEDD4-2 (*Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2*) interagit avec TrkA au niveau du motif PPxY à l'extrémité C-terminale du récepteur (contenant le résidu phosphorylable Y⁷⁸⁵) et ubiquitinye le récepteur principalement sur le résidu K⁵⁴⁷ (Arevalo *et al.*, 2006b). La surexpression de NEDD4-2 conduit à une diminution de l'expression du récepteur TrkA et à une inhibition de la survie neuronale (Arevalo *et al.*, 2006b). En effet, la monoubiquitination par NEDD4-2 favorise l'adressage vers les lysosomes, diminuant ainsi le recyclage à la membrane et l'expression du récepteur à la surface cellulaire, et ce même en absence d'une stimulation par le NGF (Georgieva *et al.*, 2011 ; Yu *et al.*, 2011). L'autre E3 ubiquitine ligase qui régule la monoubiquitination de TrkA est la protéine c-Cbl. Comme pour NEDD4-2, elle se fixe au récepteur phosphorylé et induit la dégradation du récepteur dans les lysosomes (Takahashi *et al.*, 2011). A ce jour, le site d'interaction de c-Cbl sur TrkA n'est pas connu. Enfin, les deux enzymes NEDD4-2 et c-Cbl, en ubiquitinylant le récepteur, régulent son trafic intracellulaire en favorisant l'adressage vers les endosomes tardifs et les lysosomes au détriment de la voie de recyclage mais elles

INTRODUCTION

n'ont pas d'effet propre sur l'internalisation de TrkA (Arevalo *et al.*, 2006b ; Takahashi *et al.*, 2011).

Le trafic intracellulaire du récepteur TrkA est également sous le contrôle de l'activité du protéasome. En effet, il a été montré que l'activité protéasomale induit une déubiquitination du récepteur permettant sa dégradation dans les lysosomes (Geetha & Wooten, 2008). Le récepteur TrkA polyubiquitinylé interagit avec le domaine UBA (*Ubiquitin-associating domain*) de la protéine p62 qui va ensuite pouvoir lier la sous-unité Rpt1 du protéasome (Geetha *et al.*, 2008 ; Wooten *et al.*, 2008).

A l'inverse, une inhibition de l'activité du protéasome va permettre un adressage du récepteur vers la voie de recyclage et une augmentation du taux de récepteurs à la surface cellulaire (Moises *et al.*, 2009). Cet adressage est corrélé à une augmentation de l'activation des voies Erk1/2 et PI3-K/Akt et à une croissance accrue des neurites (Song *et al.*, 2009). Il a également été décrit que l'inhibition du protéasome induisait une ubiquitination de TrkA en présence de NGF, conduisant à une augmentation de l'internalisation du récepteur et à sa concentration dans les compartiments endosomaux (Song & Yoo, 2011).

Enfin, plusieurs protéines exprimées dans les endosomes précoces ont été décrites comme participant activement au choix de l'adressage du récepteur vers les voies de dégradation ou de recyclage. Ainsi, l'endophiline B1 interagit avec TrkA et la protéine EEA1, marqueur des endosomes précoces, pour favoriser le recyclage du récepteur à la membrane. L'inhibition de cette protéine conduit donc à un adressage préférentiel vers les lysosomes, à une dégradation du récepteur et à une diminution de l'activation de la voie Erk1/2 (Wan *et al.*, 2008 ; Cheung & Ip, 2009). La protéine APPL1 (*Adapter protein containing PH domain, PTB domain and leucine zipper motif 1*), interagissant avec TrkA au niveau des endosomes précoces, permet le recrutement de GIPC1 (*GAIIP-interacting protein, C-terminus 1*) et ces deux protéines jouent un rôle majeur dans la transduction du signal induit par le NGF, notamment au niveau des endosomes de signalisation (Lin *et al.*, 2006 ; Varsano *et al.*, 2006). L'activation soutenue de la signalisation dans ces structures est également due à l'interaction entre TrkA et RabGAP5 (*Rab GTPase-activating protein 5*) qui va diminuer le taux de Rab5-GTP actif, condition nécessaire pour une signalisation soutenue du NGF (Liu *et al.*, 2007).

INTRODUCTION

C. Les autres récepteurs du NGF et de son précurseur

1. p75^{NTR}

a. Découverte

La protéine p75^{NTR} fut identifiée en 1973 comme étant le récepteur du *Nerve Growth Factor* et fut donc logiquement appelé NGFR (*Nerve Growth Factor Receptor*) (Herrup & Shooter, 1973). Son clonage en 1986 et des expériences de transfection ont révélé qu'il liait le NGF avec une faible affinité ($K_d=10^{-9}M$), il fut alors renommé récepteur de faible affinité au NGF, LNGFR (*Low affinity NGFR*) (Chao *et al.*, 1986 ; Johnson *et al.*, 1986 ; Radeke *et al.*, 1987). Avec la découverte des autres membres de la famille des neurotrophines (BDNF, NT-3, NT-4/5), il est apparu que toutes liaient ce récepteur avec la même affinité dans la plupart des types cellulaires, d'où le nom de p75^{NTR} pour *Neurotrophin Receptor* et en référence à son poids moléculaire (75 kDa) (Rodriguez-Tebar *et al.*, 1990 ; 1992).

b. Structure : du gène à la protéine

Le gène *NGFR* humain codant le récepteur p75^{NTR} contient 6 exons et couvre environ 23 kb du chromosome 17 en région q21-q22. Ce gène est transcrit en un ARNm de 3,4 kb (N° accession NCBI : NM_002507) (Tableau 5).

| Nom du gène | Localisation du gène | Taille de l'ARNm (pb) | N° NCBI | Taille en acides aminés | N° Uniprot |
|-------------|----------------------|-----------------------|-----------|-------------------------|------------|
| <i>NGFR</i> | 17q21-q22 | 3420 | NM_002507 | 427 | P01138 |

Tableau 5 : Caractéristiques du récepteur p75^{NTR} humain

Gène du récepteur p75^{NTR} humain et sa localisation chromosomique. Dans le tableau, sont également référencées la taille de l'ARNm avec son numéro d'accèsion NCBI et la taille en acides aminés de la protéine avec son numéro d'accèsion Uniprot.

Après le clivage de son peptide signal (28 aa), p75^{NTR} est un récepteur transmembranaire de type I de 399 acides aminés répartis en un domaine extracellulaire (222 aa), transmembranaire (19 aa) et intracellulaire (158 aa) (Figure 18).

INTRODUCTION

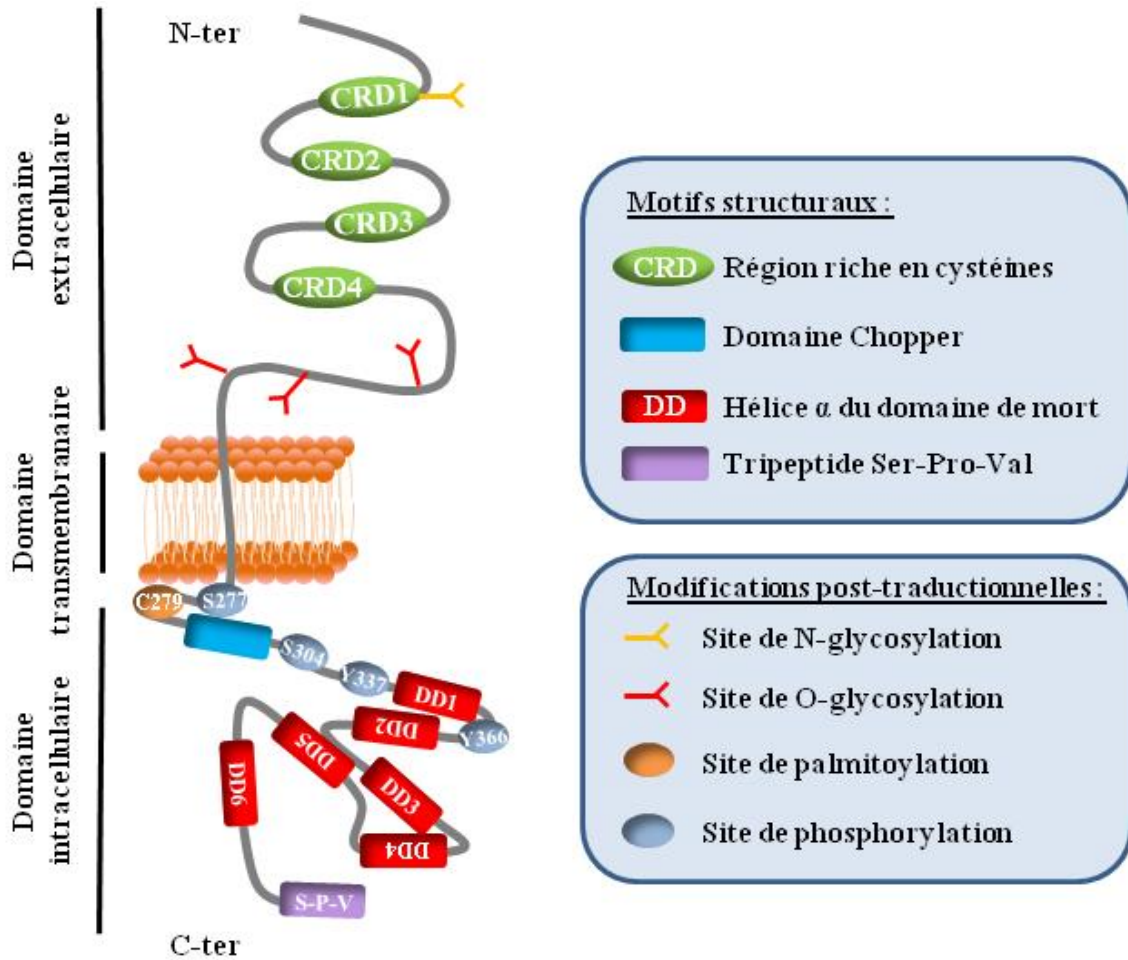


Figure 18 : Représentation schématique du récepteur p75^{NTR}

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

✓ Domaines extracellulaire et transmembranaire

Le récepteur p75^{NTR} possède un site de N-glycosylation en N-terminal (position 33) et plusieurs sites de O-glycosylation dans le domaine juxtamembranaire, faisant passer sa masse moléculaire de 45 à 75 kDa (Large *et al.*, 1989). Ces glycosylations seraient impliquées dans l'adressage du récepteur à la membrane (Breuza *et al.*, 2002) ainsi que dans la liaison de ses ligands (Gong *et al.*, 2008). Le domaine extracellulaire de p75^{NTR} est

INTRODUCTION

également constitué de 4 domaines riches en cystéines appelés CRD (*Cystein-Rich Domain*), ce qui lui vaut d'appartenir à la superfamille des récepteurs du TNF (Aggarwal, 2003). Chacun de ces CRD, numérotés de 1 à 4 à partir de l'extrémité N-terminale, contient 3 ponts disulfures impliqués dans la mise en conformation du récepteur et dans la liaison aux ligands (Barker, 2007 ; 2009).

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

✓ *Domaine intracellulaire*

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

Une autre région du domaine intracellulaire, identifiée plus récemment, a également un rôle prépondérant dans l'action de p75^{NTR}. Ce domaine de 29 acides aminés, localisé dans la partie juxtamembranaire, est suffisant et nécessaire pour induire la mort neuronale et fut baptisé « Chopper » en référence à un célèbre criminel australien. Il présente 95% d'homologie de séquence entre l'homme, le rat et le poulet mais n'est cependant pas conservé au sein des autres membres de la famille du TNFR. Notons que le domaine Chopper doit rester attaché à la membrane pour exercer son effet pro-apoptotique dans les neurones ; la forme soluble agit plutôt comme un dominant négatif et est donc anti-apoptotique (Coulson *et al.*, 2000 ; 2004).

INTRODUCTION

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

Enfin, le domaine intracellulaire de p75^{NTR} est sujet à des modifications post-traductionnelles telles qu'une palmitoylation et plusieurs phosphorylations. En effet, une palmitoylation a été reportée sur la cystéine 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 & Blochl, 2007). Dans une autre étude, la même tyrosine Y³³⁶ phosphorylée permet la fixation d'une E3-ubiquitine ligase c-Cbl favorisant ainsi l'ubiquitination de p75^{NTR} et probablement sa dégradation (Ohr *et al.*, 2004). p75^{NTR} peut également être phosphorylé sur la sérine S³⁰⁴ par la PKA (*c-AMP-dependent Protein Kinase A*) permettant sa relocalisation dans les radeaux lipidiques (Higuchi *et al.*, 2003). Enfin, une autre phosphorylation a été identifiée plus récemment sur la sérine S²⁷⁷. Ce résidu serait phosphorylé par la PKC et permettrait de contrôler la durée du signal du complexe p75^{NTR}/ligand après le transport rétrograde dans les neurones (Butowt & von Bartheld, 2009).

c. Différentes formes de p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} peut être présent dans les cellules sous différentes formes. Celles-ci résultent soit d'un épissage alternatif de l'ARNm, soit d'une protéolyse du récepteur et sont présentées en figure 19.

INTRODUCTION

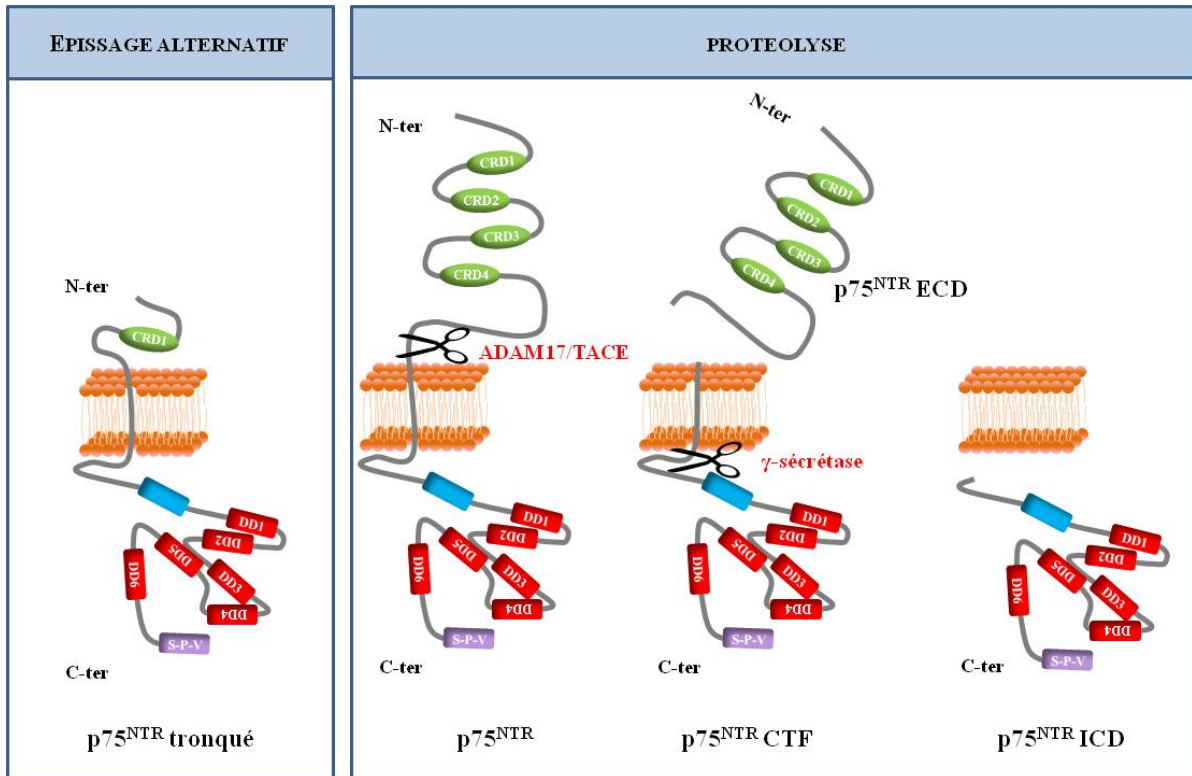


Figure 19 : Différentes formes du récepteur p75^{NTR}

La transcription du gène *NGFR* conduit à la forme complète du récepteur mais aussi à une forme tronquée résultant de l'épissage alternatif de l'exon 3. Cette forme tronquée possède un domaine extracellulaire très court, composé du seul CRD1, ne pouvant plus lier les neurotrophines. La forme complète de p75^{NTR} peut, elle, subir une protéolyse par une série de deux clivages successifs. Le premier clivage par la métalloprotéase ADAM17/TACE libère, d'une part, un fragment soluble correspondant à la partie extracellulaire du récepteur, le p75^{NTR}-ECD, pouvant toujours fixer les neurotrophines. D'autre part, la partie ancrée à la membrane, le p75^{NTR}-CTF, comprend les domaines transmembranaire et intracellulaire et est toujours capable de recruter des partenaires protéiques. Le second clivage par le complexe γ -sécrétase a lieu dans la partie transmembranaire du fragment CTF et libère, dans le cytoplasme, la partie intracellulaire, nommée p75^{NTR}-ICD, capable de transloquer dans le noyau, suggérant une activité transcriptionnelle.

✓ Epissage alternatif

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

INTRODUCTION

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

✓ Protéolyse de p75^{NTR}

Comme beaucoup d'autres protéines telles que l'APP (*β-Amyloid Precursor Protein*), Notch ou Erb-B4, le récepteur p75^{NTR} est la cible de deux clivages successifs connus sous le nom de RIP (*Regulated Intramembrane Proteolysis*) (Skeldal *et al.*, 2011). Cette protéolyse de p75^{NTR} consiste tout d'abord en un premier clivage par la métalloprotéase ADAM17/TACE qui a lieu dans la partie extracellulaire juxtamembranaire. Ce clivage permet la libération d'un fragment soluble nommé p75^{NTR}-ECD (*ExtraCellular Domain*) comprenant le domaine extracellulaire de p75^{NTR} composé des CRD capables de lier les neurotrophines. L'autre partie du récepteur, toujours liée à la membrane, comprend les domaines transmembranaire et intracellulaire et est appelée p75^{NTR}-CTF (*C-Terminal Fragment*). Le site exact de clivage par ADAM17 n'est pas connu, néanmoins des expériences de mutagenèse dirigée et une analyse par spectrométrie de masse ont permis d'identifier 2 sites potentiels dans la séquence de p75^{NTR} : soit entre la proline 241 et la valine 242, soit entre la thréonine 244 et l'arginine 245 (Weskamp *et al.*, 2004 ; Zampieri *et al.*, 2005). De plus, la mutation de la valine 242 en asparagine permet la création d'un site de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) et inhibe le clivage de p75^{NTR} par ADAM17, probablement par encombrement stérique (Underwood *et al.*, 2008). Ce premier clivage est un pré-requis à un second clivage réalisé sur le CTF par la préséniline-1 qui fait partie du complexe protéique γ -sécrétase. Ce second clivage a lieu dans la partie transmembranaire et libère, dans le cytoplasme, un fragment intracellulaire nommé p75^{NTR}-ICD (*IntraCellular Domain*). L'association entre la préséniline-1 et l'E3 ubiquitine ligase TRAF6 est nécessaire pour générer le fragment p75^{NTR}-ICD (Powell *et al.*, 2009). Le site de ce second clivage a été identifié par spectrométrie de masse et se situe entre les valines 263 et 264 juste après la séquence ²⁶⁰AAVV²⁶³ (Jung *et al.*, 2003).

La protéolyse du récepteur p75^{NTR} est considérée comme partie intégrante de sa signalisation et est, par conséquent, un mécanisme finement régulé (Nykjaer *et al.*, 2005). L'implication du récepteur TrkA, dans la régulation de la protéolyse de p75^{NTR}, a été reportée par plusieurs équipes. En effet, dans les cellules de rat PC12, l'activation de TrkA par le NGF augmenterait le clivage de p75^{NTR} par ADAM17 ; le fragment p75^{NTR}-CTF serait alors transloqué dans les endosomes précoces pour y être clivé par le complexe

INTRODUCTION

γ -sécrétase (Urrea *et al.*, 2007). Dans la même lignée cellulaire, une autre équipe a montré que l'activation de TrkA par le NGF favorisait le clivage de p75^{NTR} via la voie des MAPK. Suite à ce clivage, p75^{NTR} activerait la voie Akt et provoquerait l'arrêt du cycle cellulaire (Ceni *et al.*, 2010). En effet, le récepteur TrkA active les MAPK qui peuvent phosphoryler ADAM17 sur la thréonine 735 intracellulaire et conduire au clivage de p75^{NTR} et à la formation du fragment ICD. Ce mécanisme est requis pour l'activation d'Erk et d'Akt et l'induction de la survie des cellules PC12, après stimulation par les neurotrophines (Kommaddi *et al.*, 2011). Dans un autre modèle, la lignée HEK293, la surexpression de TrkA augmente également le clivage de p75^{NTR} ; de plus, le premier clivage est inhibé par un inhibiteur de Erk confirmant ainsi l'implication de la voie des MAPK (Kanning *et al.*, 2003). Il est à noter que dans cette étude, aucune des neurotrophines testées (*i.e.* NGF, BDNF, NT-3, proNGF et proBDNF) n'a d'effet sur le clivage de p75^{NTR}. Dans les mêmes cellules HEK293, il a été montré que suite au premier clivage, la palmitoylation de p75^{NTR} était nécessaire à la translocation du fragment CTF dans les radeaux lipidiques où a lieu le second clivage par le complexe γ -sécrétase. En revanche, dans cette étude, l'activation de TrkA inhibe la translocation du CTF et donc le second clivage, remettant en question le rôle de TrkA dans la protéolyse de p75^{NTR} (Underwood *et al.*, 2008).

d. Coopération entre p75^{NTR} et TrkA

Le récepteur TrkA a longtemps été considéré comme le récepteur de haute affinité du NGF. Néanmoins, on sait aujourd'hui que son affinité pour ce ligand est similaire à celle de p75^{NTR} ($K_d=10^{-9}M$) lorsqu'ils sont exprimés séparément. En revanche, en cas de co-expression, des sites de haute affinité ($K_d=10^{-11}M$) sont créés par changement de conformation des domaines transmembranaires et intracellulaires des deux récepteurs (Hempstead *et al.*, 1991 ; Mahadeo *et al.*, 1994 ; Esposito *et al.*, 2001). Plusieurs études ont montré que l'inhibition de la liaison du NGF sur p75^{NTR} affectait l'activation de TrkA (Barker & 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 deux récepteurs (Ryden *et al.*, 1997). C'est pourquoi, aujourd'hui, certains considèrent que la perte neuronale observée chez les souris KO (*Knockout*) pour p75^{NTR} ne serait que le reflet d'une diminution d'activité des récepteurs Trk.

INTRODUCTION

D'autre part, l'expression de p75^{NTR} module la spécificité de TrkA pour ses ligands. En effet, un anticorps bloquant anti-p75^{NTR} augmente l'activation de TrkA en réponse à la NT-3, suggérant que p75^{NTR} diminue l'affinité de TrkA pour cette neurotrophine (Clary & Reichardt, 1994). Cet effet a été également décrit *in vivo* dans des neurones sympathiques, où la NT-3 peut signaler localement *via* les récepteurs TrkA, en absence de p75^{NTR}. Ainsi, la signalisation rétrograde du récepteur TrkA, dans les axones, induit une augmentation de l'expression de p75^{NTR} et une insensibilité des cellules à la NT-3 (Brennan *et al.*, 1999 ; Kuruvilla *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces résultats suggère une étroite collaboration entre p75^{NTR} et TrkA, ce qui a conduit à des études sur une éventuelle interaction physique entre les deux entités. Ainsi, plusieurs travaux ont montré par co-immunoprécipitation que p75^{NTR} se liait physiquement à TrkA et que la présence du domaine kinase de TrkA était également nécessaire à ces interactions bien que les mécanismes impliqués ne soient pas encore élucidés (Gargano *et al.*, 1997 ; Bibel *et al.*, 1999 ; Lad *et al.*, 2003).

D'autres proposent un modèle où p75^{NTR} ne servirait qu'à présenter le dimère de NGF à TrkA avec la formation d'un complexe tripartite p75^{NTR}/NGF/TrkA (stœchiométrie 1/2/1) (He & Garcia, 2004 ; Barker, 2007 ; Wehrman *et al.*, 2007). Récemment, une étude a montré l'interaction directe entre les domaines intracellulaires des deux récepteurs et ce, même en absence d'une stimulation au NGF (Iacarusso *et al.*, 2011).

La formation d'hétérodimères p75^{NTR}/TrkA impliquerait également d'autres protéines associées. La protéine transmembranaire ARMS a été isolée par co-immunoprécipitation avec p75^{NTR} et pourrait servir d'intermédiaire dans la formation de ces hétérodimères (Yano *et al.*, 2001). La formation d'un complexe ternaire comprenant les récepteurs TrkA, p75^{NTR} et la protéine ARMS a été identifiée plus récemment avec l'interaction entre les deux récepteurs assurée par leurs domaines transmembranaires et la liaison avec la protéine ARMS assurée par le domaine juxtamembranaire de p75^{NTR} (Chang *et al.*, 2004). De plus, ARMS est un substrat de la kinase de TrkA, suggérant que cette protéine participerait à la signalisation intracellulaire activée par la formation des hétérodimères TrkA/p75^{NTR} (Yano *et al.*, 2001 ; Chang *et al.*, 2004).

La cavéoline est une protéine-clé dans la formation des *caveolae*, permettant la concentration des protéines de signalisation au niveau de ces microdomaines invaginés, servant de plateformes de signalisation. Ainsi, p75^{NTR} est localisé dans ces microdomaines et interagit avec les cavéolines par l'intermédiaire de son domaine intracellulaire. Cette

INTRODUCTION

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 PI3-K 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).

L'association entre p75^{NTR} et TrkA peut également être régulée par la formation d'un complexe entre la protéine adaptatrice p62 et la protéine TRAF6. En effet, p75^{NTR} peut recruter la protéine p62, induisant l'activation d'une isoforme atypique de PKC encore non identifiée et de NF- κ B, en réponse au NGF (Samuels *et al.*, 2001). Dans les cellules PC12, la protéine p62 forme un complexe avec TRAF6 et les récepteurs p75^{NTR} et TrkA et favorise l'activation de NF- κ B par le NGF (Wooten *et al.*, 2001). Ce complexe joue par ailleurs un rôle important dans l'internalisation du récepteur TrkA dans les endosomes (Geetha & Wooten, 2003).

Le récepteur p75^{NTR} peut également recruter la protéine Shc, protéine adaptatrice du récepteur TrkA. Cette interaction va entraîner la phosphorylation de Shc, favorisant ainsi la signalisation de TrkA (Epa *et al.*, 2004). De même, 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).

Une dernière protéine adaptatrice impliquée dans les interactions entre p75^{NTR} et TrkA a été identifiée ; il s'agit de la protéine NRH2 (*Neurotrophin Receptor Homolog 2*), homologue de p75^{NTR} (Murray *et al.*, 2004). Cette protéine ne lie pas directement le NGF mais lorsqu'elle est recrutée par p75^{NTR}, elle peut interagir avec TrkA et contribuer à la formation d'un site de haute affinité pour le NGF (Murray *et al.*, 2004).

L'interaction entre les voies de signalisation de p75^{NTR} et TrkA a également été mise en évidence. Ainsi, dans les oligodendrocytes, la liaison du NGF sur p75^{NTR} conduit à l'activation de la voie JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) et à la mort cellulaire mais une co-expression de TrkA peut bloquer cet effet, conduisant à la survie neuronale (Casaccia-Bonnet *et al.*, 1996 ; Yoon *et al.*, 1998). L'inhibition des voies de l'apoptose par l'activation de TrkA est réalisée notamment par l'activation de Ras et de la voie de la PI3-K conduisant à une inhibition de JNK (Yoon *et al.*, 1998 ; Mazzoni *et al.*, 1999) et au

INTRODUCTION

bloquée de la voie des céramides, en particulier *via* l'activation des PKC (Bilderback *et al.*, 1999 ; Plo *et al.*, 2004). De plus, la mort cellulaire induite par le complexe p75^{NTR}/NRAGE (*Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog*), en réponse au NGF, est également bloquée par l'expression de TrkA qui va entrer en compétition avec NRAGE pour se lier sur p75^{NTR} (Salehi *et al.*, 2000).

Enfin, la bidirectionnalité du système TrkA/p75^{NTR} est étroitement liée au ratio d'expression entre les deux récepteurs. De nombreuses équipes ont ainsi montré l'importance du ratio TrkA/p75^{NTR} dans la réponse cellulaire induite par une stimulation par le NGF (Chao & Hempstead, 1995 ; Twiss *et al.*, 1998 ; Gatzinsky *et al.*, 2001). De plus, la surexpression de TrkA résulte en une augmentation de l'expression de p75^{NTR} (Hempstead *et al.*, 1992) alors que des cellules PC12 n'exprimant pas TrkA montrent un taux plus faible d'ARNm de p75^{NTR} (Loeb *et al.*, 1991). Par ailleurs, des mutations ponctuelles sur les sites de phosphorylation de TrkA résultent en une expression différentielle de p75^{NTR} (Rankin *et al.*, 2005). Enfin, plus récemment, l'activation de la PLC- γ 1 et des isoformes de PKC associées, sous TrkA, induit une augmentation de l'expression de p75^{NTR} (Rankin *et al.*, 2008). Ainsi, l'expression des récepteurs est hautement régulée et dans les cellules PC12 et il a été décrit que celle-ci était dépendante des phases du cycle cellulaire ; TrkA est plus exprimé à la surface cellulaire en début de phase G1 et lors de la mitose alors que p75^{NTR} est principalement exprimé en fin de phase G1 et lors des phases S et G2, conduisant à des effets biologiques différents suite à une stimulation au NGF (Urdiales *et al.*, 1998).

2. La sortiline

a. *Découverte*

La sortiline est le récepteur commun aux proneurotrophines. Sa découverte s'est faite de façon concomitante, à la fin des années 90, par 3 équipes à travers le monde travaillant sur des sujets de recherche totalement différents. Ainsi, la protéine identifiée fut dénommée, en fonction des équipes : sortiline, NTR3 (*Neurotensin receptor 3*) et GP110 (*Glycoprotein 110*) (Lin *et al.*, 1997 ; Petersen *et al.*, 1997 ; Mazella *et al.*, 1998).

INTRODUCTION

b. Structure : du gène à la protéine

Le gène de la sortiline (*SORT1*) est situé sur le chromosome 1, en région p13.1-p21.3. Il contient 20 exons qui s'étendent sur 50 kb (Tableau 6). Son transcrit est présent dans de nombreux tissus humains tels que le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, les testicules, la thyroïde, le sein ou encore la moelle épinière (Petersen *et al.*, 1997 ; Mazella, 2001).

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

Tableau 6 : Caractéristiques de la sortiline humaine

Gène de la sortiline humaine et sa localisation chromosomique. Dans le tableau, sont également référencées la taille de l'ARNm avec son numéro d'accèsion NCBI et la taille en acides aminés de la protéine avec son numéro d'accèsion Uniprot.

La sortiline fait partie de la famille des récepteurs à domaine Vps10p (*Vacuolar protein sorting 10 protein*) qui doit son nom à une protéine de levure impliquée dans le trafic intracellulaire entre le réseau trans-golgien et les vacuoles. Tout comme son homologue chez la levure, la sortiline joue un rôle important dans l'internalisation de ses nombreux ligands et leur transport entre l'appareil de Golgi, les endosomes et les lysosomes (Hermey, 2009). Après clivage de son peptide signal (33 aa), la sortiline est une protéine N-glycosylée, de type I et de 798 acides aminés présentant un seul domaine transmembranaire (23 aa), une courte partie cytosolique (53 aa) et une longue portion N-terminale (722 aa) (Figure 20) (Munck Petersen *et al.*, 1999).

La sortiline est essentiellement localisée au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, et seulement 8 à 10% de la sortiline est exprimée à la membrane plasmique, principalement au niveau de microdomaines riches en cholestérol (Nielsen *et al.*, 2001 ; Canuel *et al.*, 2009). Ainsi, selon que la sortiline est vésiculaire ou exposée à la membrane plasmique, la partie N-terminale est soit luminale ou extracellulaire. L'expression de la sortiline à la surface cellulaire est, par ailleurs, régulée par la protéine NRH2 qui va interagir avec la sortiline, *via* leurs domaines cytoplasmiques, et diminuer sa dégradation par les lysosomes (Kim & Hempstead, 2009). La sortiline exposée à la surface

INTRODUCTION

cellulaire est alors capable d'interagir avec p75^{NTR} pour créer des sites de liaison de haute affinité pour les proneurotrophines.

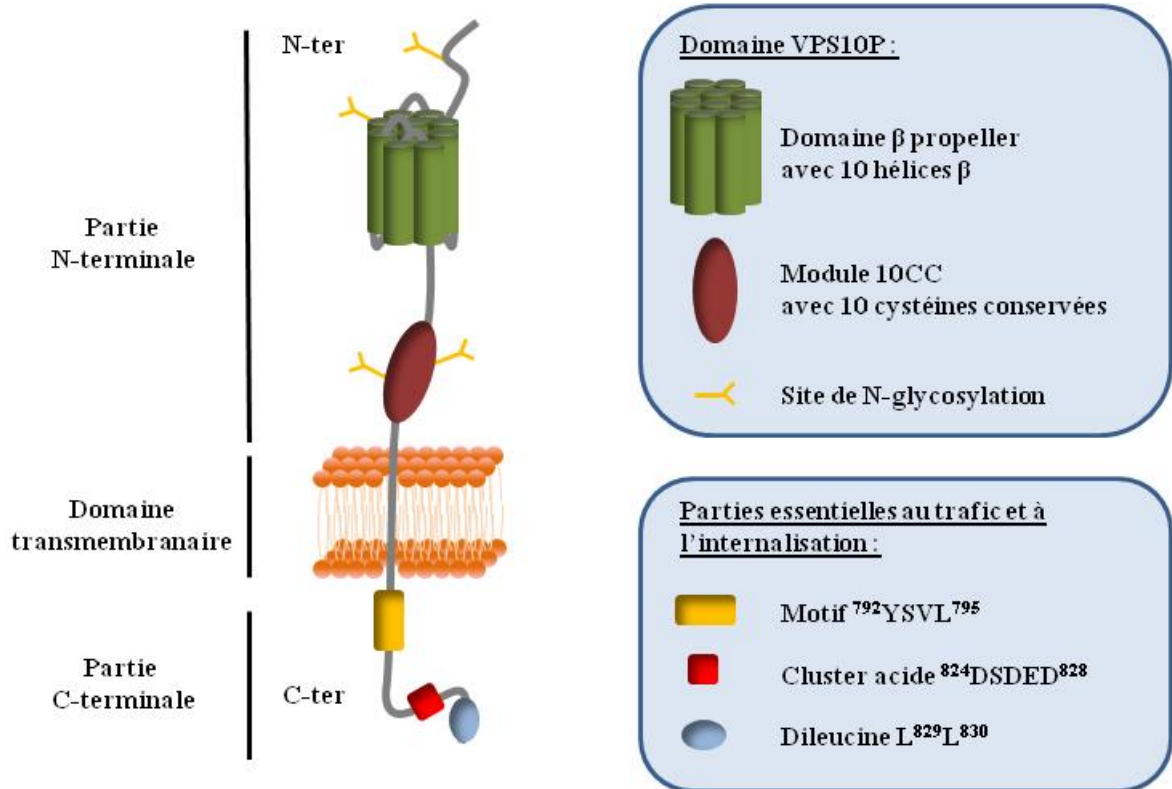


Figure 20 : Représentation schématique de la sortiline

La sortiline est une glycoprotéine de type I dont le domaine Vps10p constitue la quasi-totalité de sa partie N-terminale. Ce domaine est essentiel à la liaison des ligands. Il est composé d'un module 10CC où 10 cystéines conservées établissent 5 ponts disulfures, et d'un domaine β -propeller formé de 10 hélices β . La partie cytoplasmique est très courte et comprend 3 séquences impliquées dans son internalisation et son trafic intracellulaire : un motif $^{792}\text{YSVL}^{795}$, un cluster acide phosphorylable $^{824}\text{DSDED}^{828}$ et la dileucine $\text{L}^{829}\text{L}^{830}$.

✓ Partie N-terminale

Dans sa partie N-terminale, la sortiline contient un propeptide (44 aa) qui est clivé dans les compartiments tardifs de l'appareil de Golgi par la furine, permettant au récepteur une fois clivé de fixer ses ligands (Munck Petersen *et al.*, 1999).

La sortiline contient également un domaine Vps10p qui est un module d'environ 700 acides aminés. D'un point de vue structural, ce domaine renferme notamment un **module 10CC** ($\text{C}^{612}\text{-C}^{740}$) où 10 cystéines conservées établissent des jonctions

INTRODUCTION

intramoléculaires (Westergaard *et al.*, 2004), ainsi qu'un **domaine β -propeller** composé de 10 hélices β . Une première étude à partir de protéines chimériques a montré que le module 10CC est primordial pour l'interaction de la sortiline avec ses ligands (Westergaard *et al.*, 2004). Cependant, une modélisation informatique du récepteur propose que ces interactions passent plutôt par le domaine β -propeller (Paiardini & Caputo, 2008). Cette dernière hypothèse a été confortée par la résolution de la structure du domaine N-terminal de la sortiline complexée à la neurotensine, un de ses ligands (Quistgaard *et al.*, 2009). Les auteurs ont ainsi montré que la neurotensine se fixait à la sortiline en rentrant à l'intérieur du domaine β -propeller. Notons toutefois que, même si tous les ligands entrent en compétition pour lier la sortiline, leurs sites d'interaction au sein de ce domaine sont différents. Aussi, leur capacité à entrer en compétition les uns avec les autres serait due à la place restreinte à l'intérieur du β -propeller plutôt qu'à un même site de fixation (Quistgaard *et al.*, 2009). Récemment, une étude a montré l'existence d'un épitope linéaire, en dehors des domaines cités précédemment, permettant la liaison des proneurotrophines (Serup Andersen *et al.*, 2010). Enfin, des études structurales et moléculaires ont révélé que la formation du complexe proNGF/p75^{NTR}/sortiline était dépendante du calcium (Feng *et al.*, 2010).

✓ *Partie cytosolique*

Avec seulement 53 acides aminés, la partie cytosolique de la sortiline est très courte. Elle présente des motifs similaires à ceux retrouvés dans la queue cytoplasmique du récepteur M6P (*Mannose 6-phosphate*), lui aussi impliqué dans le trafic intracellulaire et les processus d'internalisation. Il s'agit de 3 motifs caractéristiques : la séquence ⁷⁹²YSVL⁷⁹⁵ impliquée dans l'endocytose du récepteur, un cluster acide ⁸²⁴DSDED⁸²⁸ potentiellement phosphorylable par la CKII (*Casein kinase II*) et d'une dileucine L⁸²⁹L⁸³⁰, impliquée à la fois dans l'internalisation du récepteur et dans le trafic intracellulaire de protéines cytoplasmiques (Petersen *et al.*, 1997 ; Nielsen *et al.*, 2001).

c. Coopération entre p75^{NTR} et la sortiline

L'identification de la sortiline a permis d'apporter des éléments de réponse quant aux effets biologiques propres aux proneurotrophines. En effet, le proNGF stimule la mort

INTRODUCTION

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 était 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 (Nykjaer *et al.*, 2004 ; Schweigreiter, 2006 ; Paiardini & Caputo, 2008). 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 cette proneurotrophine 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 NT-3 avec une activation de la voie JNK, et cette induction peut être contrecarrée par un traitement au NGF (Yano *et al.*, 2009). Par ailleurs, hormis cette voie, les voies de signalisation activées par le complexe ternaire proneurotrophine/sortiline/p75^{NTR} restent encore inconnues.

Récemment, un nouveau complexe entre la sortiline et les récepteurs Trk a été décrit pour intervenir dans l'adressage de ces derniers au niveau de la synapse et pour stimuler la survie et la différenciation neuronale suite à une stimulation par les neurotrophines (Vaegter *et al.*, 2011). Cette découverte laisse entrevoir l'existence de nouveaux complexes entre les récepteurs pour une régulation fine de la signalisation des neurotrophines et de leurs précurseurs.

D'autre part, l'activité du proNGF est décrite comme dépendant du niveau d'expression relative entre les récepteurs p75^{NTR} et TrkA (Masoudi *et al.*, 2009). Ainsi, de façon intéressante, bien que p75^{NTR} et la sortiline soient considérés comme les récepteurs principaux du proNGF, une activation de la phosphorylation de TrkA et de sa signalisation sous-jacente a été reportée par plusieurs équipes (Fahnestock *et al.*, 2004 ; Boutilier *et al.*, 2008 ; Clewes *et al.*, 2008).

INTRODUCTION

D. NGF, proNGF et TrkA dans les cancers

Nous avons vu que l'activation de l'axe NGF/TrkA est principalement impliquée dans le développement et le maintien du système nerveux central et périphérique. Cependant, un nombre croissant de travaux montre que le NGF et TrkA sont exprimés dans des cellules non-neuronales et peuvent avoir un effet sur le développement tumoral. C'est d'ailleurs dans un carcinome de côlon que le récepteur TrkA fut découvert (Martin-Zanca *et al.*, 1986). De même, le NGF était décrit, avant sa découverte, comme un facteur sécrété par les tissus en prolifération (notamment les sarcomes murins) qui permettait la croissance et l'attraction des fibres nerveuses. Néanmoins, alors que de nombreuses études, détaillées ci-dessous, ont démontré l'implication du NGF dans la pathologie cancéreuse, les travaux concernant le proNGF, et les proneurotrophines en général, restent parcellaires.

1. NGF, TrkA et cancer

a. *Cancer de la thyroïde*

La première association clinique entre les récepteurs Trk et le cancer vient de la découverte de mutations activatrices causées par des réarrangements chromosomiques ou des mutations dans la séquence du gène *NTRK1*, dans les carcinomes thyroïdiens papillaires et médullaires, respectivement (Pierotti & Greco, 2006). Le gène *NTRK1* est fréquemment modifié dans les carcinomes thyroïdiens papillaires en formant des récepteurs chimériques constitutivement activés, composés du domaine kinase de TrkA et de séquences codées par d'autres gènes comme *TPM3* (*Tropomyosin-3*), *TPR* (*Translocated promoter region*) et *TFG* (*Trk-fused gene*) (Greco *et al.*, 2010). Par exemple, l'oncogène Trk-T1, issu du réarrangement entre les gènes *NTRK1* et *TPR*, contribue à la transformation néoplasique de l'épithélium thyroïdien (Russell *et al.*, 2000). De même, l'oncoprotéine Trk (*TPM3-NTRK1*), formée par la même inversion (1)(q21;q22) que celle qui a permis sa découverte dans le cancer du côlon (Martin-Zanca *et al.*, 1986), est retrouvée dans 7 à 12% des carcinomes papillaires de la thyroïde (Butti *et al.*, 1995). Du fait de leur rôle majeur dans les cancers thyroïdiens, l'activation des récepteurs Trk, suite aux réarrangements géniques, a été proposée comme marqueur moléculaire dans ces cancers (Kouniavsky & Zeiger, 2010). Le NGF, quant à lui, est décrit comme inhibant la prolifération et l'invasion d'une lignée papillaire, en induisant l'expression du récepteur p75^{NTR} (Paez Pereda *et al.*, 2000) alors qu'il stimule la prolifération d'une lignée médullaire (Goretzki *et al.*, 1987).

INTRODUCTION

En résumé, le NGF et le récepteur TrkA semblent bien impliqués dans les cancers thyroïdiens mais leurs impacts précis restent encore flous et ne permettent pas de dégager des mécanismes d'action clairs.

b. Cancer de la prostate

Dans les cancers de la prostate, les récepteurs TrkA et p75^{NTR} sont exprimés et induisent des effets biologiques différents sous l'effet du NGF : TrkA est associé à un effet promotoral alors que p75^{NTR} est considéré comme un suppresseur de tumeur (Arrighi *et al.*, 2010). Ainsi, l'effet du NGF sur les cellules cancéreuses prostatiques est dépendant du ratio d'expression TrkA/p75^{NTR}. Au cours de la progression tumorale dans la prostate, ce ratio augmente (Papatsoris *et al.*, 2007), conduisant à une induction de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses prostatiques (Sortino *et al.*, 2000 ; Festuccia *et al.*, 2007). La ré-expression du récepteur p75^{NTR} induit la mort cellulaire (Allen *et al.*, 2005 ; Khwaja *et al.*, 2006) et diminue la migration de ces cellules (Nalbandian & Djakiew, 2006 ; Wynne & Djakiew, 2010). De plus, l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-NGF ou d'un inhibiteur de Trk diminue très fortement la croissance tumorale et la formation de métastases dans des modèles murins de xénogreffes (Weeraratna *et al.*, 2001 ; Miknyoczki *et al.*, 2002). Enfin, les récepteurs TrkA peuvent également être ciblés par des endocannabinoïdes, diminuant la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques (Melck *et al.*, 2000).

c. Cancer du pancréas

Dans les cancers pancréatiques, l'expression des ARNm de TrkA et p75^{NTR} est inversement corrélée. Ainsi, une expression élevée de TrkA induit une augmentation de la prolifération cellulaire et de l'invasion périneurale des cellules cancéreuses pancréatiques et est considérée comme un marqueur de tumorigénicité dans les adénocarcinomes pancréatiques ductaux (Sakamoto *et al.*, 2001). Au contraire, l'expression de p75^{NTR} est associée à un bon pronostic et une survie à long terme (Dang *et al.*, 2006). Lorsque l'expression des récepteurs est la même, le NGF induit la croissance tumorale *via* l'activation de la voie des MAPK, suggérant une signalisation préférentielle par le récepteur TrkA (Zhu *et al.*, 2001). De plus, le NGF stimule l'expression et l'activité de la métalloprotéase MMP-2 et augmente le potentiel pro-invasif des cellules cancéreuses pancréatiques, *via* l'activation de TrkA et des MAPK (Okada *et al.*, 2004). Comme dans le

INTRODUCTION

cancer de la prostate, l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-NGF ou d'un inhibiteur de Trk diminue très fortement la croissance tumorale et la formation de métastases dans des modèles murins de xénogreffes (Miknyoczki *et al.*, 2002).

d. Cancer de l'ovaire

Dans le cancer de l'ovaire, l'expression de p75^{NTR} n'est pas modifiée alors que l'activation du récepteur TrkA (phospho-TrkA) est corrélée avec des stades avancés de la maladie et un mauvais pronostic (Odegaard *et al.*, 2007). De plus, l'observation *in vivo* de la co-expression du NGF, de phospho-TrkA et de molécules angiogéniques suggère un rôle de l'axe NGF/TrkA dans l'angiogenèse tumorale (Davidson *et al.*, 2003). A cet égard, il a été démontré que le NGF est surexprimé dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales dans des biopsies ovariennes. De plus, des explants de carcinomes ovariens traités avec des doses croissantes de NGF secrètent en réponse des doses croissantes de VEGF (Campos *et al.*, 2007). Ainsi, dans le cancer de l'ovaire, le NGF joue un rôle dans la tumorigenèse en stimulant notamment l'angiogenèse. L'utilisation d'anticorps neutralisants anti-NGF diminue très fortement la croissance tumorale et la formation de métastases dans des modèles murins de xénogreffes (Miknyoczki *et al.*, 2002).

Enfin, il est établi que le NGF participe au cycle ovarien en stimulant l'expression du récepteur à la FSH (FSHR, *Follicle-stimulating hormone receptor*) et la sécrétion d'œstrogènes ainsi qu'en réduisant l'expression de la progestérone (Salas *et al.*, 2006). Comme il a été montré que l'expression de FSHR, au niveau des cellules de l'épithélium de surface des ovaires, peut accélérer la transformation tumorale, le NGF pourrait également favoriser la cancérogenèse ovarienne *via* son effet sur l'expression de FSHR (Bose, 2005).

e. Neuroblastome

Les neuroblastomes sont des tumeurs solides communes chez l'enfant, ils touchent des cellules embryonnaires de la crête neurale qui constituent le système nerveux autonome sympathique. Les patients atteints de neuroblastomes ont des tumeurs de bon pronostic pouvant régresser spontanément ou des tumeurs agressives, à risque élevé dans lesquelles *MYCN* est souvent amplifié. Dans ce cancer, les neurotrophines et leurs récepteurs ont des rôles différents (Brodeur *et al.*, 2009).

INTRODUCTION

Le récepteur TrkA est associé à un bon pronostic et il est inversement corrélé à l'amplification de *MYCN* (Nakagawara *et al.*, 1992 ; Kogner *et al.*, 1993 ; Nakagawara *et al.*, 1993). Sous l'effet du NGF, il induit la différenciation des cellules cancéreuses (Nakagawara & Brodeur, 1997). Comme nous l'avons vu précédemment (§II.B.2), Tacconelli et ses collaborateurs ont montré l'implication d'une nouvelle isoforme de TrkA, TrkA-III (Tacconelli *et al.*, 2004 ; Tacconelli *et al.*, 2005b). Cette isoforme est générée préférentiellement en conditions d'hypoxie (Tacconelli *et al.*, 2005a) et est capable de s'autoactiver et d'antagoniser les fonctions des autres isoformes de TrkA, augmentant ainsi la tumorigenèse et l'angiogenèse *in vivo*. L'utilisation de cette isoforme TrkA-III comme marqueur de la phase précoce des neuroblastomes est actuellement à l'étude (Tacconelli *et al.*, 2005b). TrkB et son ligand BDNF sont, quant à eux, surexprimés dans les neuroblastomes à mauvais pronostic (Nakagawara *et al.*, 1994). En définitive, les neurotrophines interviennent dans les neuroblastomes par un jeu fin entre leurs propres présences et l'expression des différents récepteurs Trk et de leurs isoformes conduisant à la progression tumorale ou à la différenciation.

f. Cancer du sein

Les neurotrophines, comme nous l'avons vu précédemment (§I.B.3.d), ont une influence sur le cancer du sein. En effet, les cellules épithéliales cancéreuses mammaires produisent et sécrètent le NGF, le BDNF et la NT-4/5 et ces facteurs induisent, *via* une boucle autocrine, la prolifération et/ou la survie de ces mêmes cellules (Descamps *et al.*, 2001b ; Dolle *et al.*, 2003 ; Vanhecke *et al.*, 2011). En revanche, le NGF n'a pas d'effet sur les cellules épithéliales normales de sein qui expriment pourtant les récepteurs TrkA et p75^{NTR} (Descamps *et al.*, 1998 ; Dolle *et al.*, 2003).

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, d'anticorps neutralisants et de modèles de surexpression a permis de discriminer le rôle des récepteurs TrkA et p75^{NTR} dans l'effet pro-tumoral du NGF. Ainsi, TrkA, *via* l'activation des MAPK, PI3-K/Akt et p38 MAPK, stimule la prolifération, la survie et la migration/invasion des cellules cancéreuses de sein *in vitro* et *in vivo*, et augmente l'angiogenèse et la formation de métastases (Descamps *et al.*, 2001b ; Lagadec *et al.*, 2009). Ces effets font également intervenir les protéines Ku qui interagissent avec TrkA et régulent la survie, pour Ku70 (Com *et al.*, 2007), et l'invasion cellulaire, pour Ku86 (Lagadec *et al.*, 2010). Le ciblage de l'axe NGF/TrkA, par l'utilisation d'anticorps neutralisant le NGF, de siRNA anti-NGF ou de K252a, un

INTRODUCTION

inhibiteur de l'activité kinasique du récepteur, réduit la formation de tumeurs mammaires dans un modèle de xéno greffes (Adriaenssens *et al.*, 2008). Le récepteur p75^{NTR}, quant à lui, recrute la protéine TRADD pour stimuler NF-κB et la survie cellulaire (Descamps *et al.*, 2001b ; El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003). La surexpression de p75^{NTR} augmente également la survie des cellules cancéreuses de sein en faisant intervenir la protéine p21^{WAF1} (Verbeke *et al.*, 2010). Un traitement par un inhibiteur spécifique de p75^{NTR} (Pep5) induit l'apoptose des cellules cancéreuses de sein (Naderi & Hughes-Davies, 2009). Le NGF produit par les cellules cancéreuses mammaires agit également de manière paracrine en augmentant la migration et l'invasion des cellules endothéliales (Dolle *et al.*, 2005 ; Romon *et al.*, 2010). En effet, le NGF induit des effets pléiotropes sur ces cellules puisqu'il augmente leur invasion, leur perméabilité et la tubulogénèse (Romon *et al.*, 2010). Ces effets sont corrélés à une activité accrue de la MMP-2 et de l'enzyme NOS (*Nitric Oxide Synthase*) et à une augmentation de la sécrétion de VEGF par les cellules endothéliales, en réponse au NGF. Enfin, l'invasion de ces cellules est régulée par l'activation du récepteur TrkA et des voies PI3-K/Akt et MAPK.

D'un point de vue clinicopathologique, les quantités d'ARNm de TrkA et de p75^{NTR} dans des homogénats de résections tumorales sont corrélées à un bon pronostic (Descamps *et al.*, 2001a). En revanche, la forme active de TrkA (phospho-TrkA) est associée à des tumeurs agressives : elle est retrouvée plus fréquemment dans les effusions et les récurrences locorégionales par rapport aux tumeurs primaires, suggérant un rôle dans la progression tumorale (Davidson *et al.*, 2004). Enfin, en comparaison avec l'épithélium normal, le NGF est surexprimé dans la quasi majorité des tumeurs mammaires (Adriaenssens *et al.*, 2008). Une étude récente a, par ailleurs, montré que le NGF et le récepteur TrkA (de même que le BDNF et TrkB) étaient surexprimés dans des biopsies de sein prélevées chez des patientes présentant une maladie de Paget au niveau du mamelon (Qian *et al.*, 2010).

2. ProNGF et cancer

L'implication du proNGF, et des proneurotrophines en général, dans les cancers est peu détaillée dans la littérature. Néanmoins, certaines données existent sur leur expression et leurs effets dans les cancers de la prostate, du pancréas, du foie et les mélanomes.

INTRODUCTION

a. Cancer de la prostate

Des études réalisées sur des cellules stromales prostatiques ont mis en évidence la présence de formes de haut poids moléculaire, immunoréactives avec un anticorps dirigé contre le NGF, dans le sécrétome de ces cellules alors qu'aucune bande au poids du NGF n'est observée (Djakiew, 1992). Ces formes sont également détectées avec des anticorps dirigés contre le propeptide du proNGF, suggérant que la forme de NGF sécrétée par les cellules stromales prostatiques est du proNGF (Delsite & Djakiew, 1999). Par ailleurs, le milieu de culture conditionné par ces cellules favorise la migration de cellules cancéreuses prostatiques. Cet effet est diminué par l'ajout d'anticorps bloquants dirigés contre le NGF dans le milieu conditionné. Comme ces anticorps peuvent reconnaître à la fois le NGF et le proNGF, on peut penser que le proNGF sécrété par les cellules stromales prostatiques pourrait favoriser la migration des cellules cancéreuses (Djakiew *et al.*, 1993).

b. Cancer du pancréas

Lors de la sélection de clones exprimant stablement la séquence codante du *NGF*, Zhu et ses collaborateurs ont mis en évidence deux clones surexprimant une protéine de 25 kDa détectée, par Western-blot, avec un anticorps dirigé contre le NGF (Zhu *et al.*, 2002). De plus, aucune forme à 14 kDa (poids du NGF mature) n'a été observée, suggérant que la protéine surexprimée est du proNGF. Les auteurs montrent que ces clones présentent une prolifération et une croissance en agar mou accrues et sont plus tumorigènes en souris *nude*. Cependant, cette étude ne permet pas de dégager les effets propres au proNGF ou au NGF. De façon intéressante, on pourra remarquer les travaux de Mijatovic et ses collaborateurs qui ont montré l'implication de la sortiline dans la migration des cellules pancréatiques cancéreuses (Mijatovic *et al.*, 2007). L'ensemble de ces données suggère donc une intervention potentielle des proneurotrophines dans ce cancer.

c. Cancer du foie

Lors d'une étude globale de marqueurs de la cancérogenèse hépatique, Yang et ses collaborateurs ont identifié une protéine de 27 kDa dont les taux sériques augmentent au cours du développement de la tumeur, diminuent après son exérèse puis réaugmentent lors de la récurrence (Yang *et al.*, 2005). Une analyse en spectrométrie de masse a permis d'identifier des peptides issus de la séquence protéique du BDNF. Néanmoins, comme le

INTRODUCTION

BDNF (14 kDa) et le proBDNF (27 kDa) peuvent générer des fragments tryptiques communs et que la protéine identifiée migre à 27 kDa sur un gel bidimensionnel en condition dénaturante, il apparaît que la protéine d'intérêt est en fait du proBDNF. Les auteurs ont également montré que l'ARNm du pro/BDNF est surexprimé dans les biopsies cancéreuses par rapport aux biopsies normales de foie. Toutefois, le rôle du proBDNF dans ce cancer reste à évaluer.

d. Mélanome

Dans les mélanomes, le proNGF est capable d'induire très fortement la migration cellulaire puisque la concentration nécessaire est 20 fois plus faible que celle du NGF pour obtenir le même effet (Shonukan *et al.*, 2003 ; Truzzi *et al.*, 2008). Par ailleurs, les auteurs ont montré que la capacité migratoire des cellules de mélanomes était directement corrélée au taux d'expression de la sortiline. En effet, plus le récepteur est exprimé, plus les cellules sont capables de se déplacer. Ainsi, bien que l'ensemble des données soit fragmentaire, l'axe proNGF/sortiline semble augmenter l'agressivité des cellules de mélanome en favorisant leur migration.

3. Axe NGF/TrkA comme cible thérapeutique dans les cancers

Comme nous venons de le voir, la signalisation du NGF et de ses récepteurs joue un rôle important dans le développement tumoral et est, par conséquent, la cible, depuis plusieurs années, de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses.

Dans le cancer de la prostate, la signalisation induite par l'axe NGF/TrkA favorise la croissance des cellules cancéreuses (Arrighi *et al.*, 2010). Dans ce contexte, des inhibiteurs pharmacologiques anti-Trk, dérivés du K252a, présentent un intérêt particulier. Parmi eux, le CEP-701 (**lestaurtinib**) est capable d'inhiber l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques *in vivo* (Festuccia *et al.*, 2007) et est actuellement en phase II d'essai clinique dans ce cancer (NCT00081601). Le CEP-751, dérivé oral du CEP-701, peut également induire l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques et diminuer la formation de métastases *in vivo*. Ces effets conduisent à une augmentation de la survie des animaux dans lesquels les cellules cancéreuses prostatiques ont été injectées (George *et al.*, 1999 ; Weeraratna *et al.*, 2001). Dans ce cancer, TrkA peut également coopérer avec HER-2 pour augmenter la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques (Festuccia *et al.*, 2009). Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment (§I.B.4.c), l'administration conjointe de

INTRODUCTION

CEP-701 et de pertuzumab (inhibiteur de HER-2) a un effet synergique sur l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses prostatiques (Festuccia *et al.*, 2009).

Dans les neuroblastomes, le CEP-701 est utilisé pour inhiber l'activité kinase du récepteur TrkB. Il induit une diminution de la croissance des cellules cancéreuses, seul ou en combinaison avec des rétinoïdes (Norris *et al.*, 2011) ou des agents chimiothérapeutiques (Iyer *et al.*, 2010 ; Norris *et al.*, 2011). Le lestaurtinib est actuellement en phase I d'essai clinique chez des patients avec des neuroblastomes de haut grade (NCT00084422) (Minturn *et al.*, 2011). De même, dans le cancer du pancréas, cet inhibiteur a montré une efficacité anti-tumorale dans un modèle pré-clinique de xénogreffe (Miknyoczki *et al.*, 1999). Néanmoins, la combinaison du lestaurtinib avec la gemcitabine (agent anti-métabolite) n'a pas montré d'effet synergique entre les deux thérapies par rapport à la chimiothérapie seule (Chan *et al.*, 2008). D'autres inhibiteurs de TrkA, comme le PHA-848125AC ou l'AZ-23, sont actuellement en cours d'étude pré-clinique dans des modèles murins de xénogreffes et dans des tumeurs solides métastatiques (Thress *et al.*, 2009 ; Weiss *et al.*, 2011).

Enfin, le CEP-701 peut également cibler d'autres tyrosine kinases comme FLT3 ou JAK/STAT (*Janus-Associated Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*) (Shabbir & Stuart, 2010). Dans les leucémies myéloïdes aiguës, le CEP-701 inhibe FLT3 et est actuellement en phase II d'essai clinique (NCT00079482) (Levis *et al.*, 2011) alors qu'il est en phase III pour le traitement des leucémies lymphoblastiques aiguës, en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques (NCT00557193). Le CEP-701 inhibe la voie JAK/STAT dans le cas des syndromes myéloprolifératifs (Santos *et al.*, 2010) où il est testé en phase II d'essai clinique (NCT00494585).

En dehors des stratégies visant le récepteur TrkA, d'autres approches ont été développées pour cibler directement le ligand, le NGF. Ainsi, dans le cancer du sein, l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-NGF entraîne une réduction de la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffes (Adriaenssens *et al.*, 2008). Par ailleurs, dans le cancer de la prostate, des anticorps anti-NGF peuvent inhiber la migration de deux lignées cellulaires cancéreuses prostatiques (DU-145 et PC-3) (Warrington & Lewis, 2011). Enfin, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-NGF a montré un effet important sur l'inhibition de la douleur associée aux métastases osseuses du cancer du sein. En effet, pendant la progression tumorale, les cellules cancéreuses de sein sont capables de migrer et

INTRODUCTION

de métastaser au niveau des os. Ce phénomène est en général accompagné d'une douleur accrue chez les patientes. Les fibres nerveuses qui innervent les cellules cancéreuses de sein au niveau des os sont sous le contrôle, entre autres, de l'axe NGF/TrkA (Bloom *et al.*, 2011). Le NGF pourrait être sécrété à la fois par les cellules cancéreuses de sein et les cellules du stroma associées à la tumeur pour agir ensuite sur les récepteurs TrkA exprimés par les cellules nerveuses. Un traitement avec le **Tanezumab** (RN-624 ; Pfizer), un anticorps monoclonal bloquant la liaison du NGF sur TrkA et p75^{NTR} et inhibant la phosphorylation de TrkA, a ainsi montré une inhibition efficace de la dissémination des fibres nerveuses et une diminution de la douleur (Bloom *et al.*, 2011). La douleur neuropathique peut également être réduite en utilisant des peptides synthétiques inhibiteurs de TrkA (Ma *et al.*, 2010).

Enfin, dans le cancer du sein, des études ont montré que l'axe NGF/TrkA pouvait être ciblé de façon indirecte. En effet, l'inhibition de l'expression de HER-2, un récepteur surexprimé dans 20% des cancers du sein, diminue l'effet du NGF sur la prolifération des cellules cancéreuses (Tagliabue *et al.*, 2000). De même le tamoxifène, drogue anti-oestrogénique couramment utilisée en thérapie du cancer du sein, inhibe l'effet mitogène du NGF (Chiarenza *et al.*, 2001).

En conclusion, l'ensemble de ces données montre que la compréhension et le décryptage de la signalisation du NGF et de ses récepteurs dans le cancer sont des enjeux majeurs dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques anticancéreuses.

DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

Notre laboratoire a montré, en 1998, que le NGF est capable de stimuler la croissance des cellules épithéliales cancéreuses mammaires alors qu'il n'a aucun effet sur les cellules épithéliales normales qui expriment pourtant les récepteurs TrkA et p75^{NTR} (Descamps *et al.*, 1998). L'effet mitogène du NGF, *via* une boucle autocrine de stimulation, est lié à l'activation de TrkA et des MAPK sous-jacentes (Descamps *et al.*, 2001b ; Dolle *et al.*, 2003). De plus, l'inhibition du NGF par des siRNA ou des anticorps bloquants diminue la croissance tumorale dans des modèles précliniques de xénogreffe en souris SCID (Adriaenssens *et al.*, 2008). Le NGF apparaît donc comme une molécule clé dans le cancer du sein.

La phosphorylation du récepteur TrkA joue également un rôle important dans la signalisation du NGF dans les cellules cancéreuses de sein. En effet, un traitement au K252a, inhibiteur de l'activité kinasique du récepteur, diminue la prolifération, la survie et la migration/invasion des cellules cancéreuses de sein *in vitro* et *in vivo*, de même que l'angiogenèse et la formation de métastases (Descamps *et al.*, 2001b ; Lagadec *et al.*, 2009). Des travaux ont permis d'identifier des protéines effectrices de la signalisation de TrkA comme les voies MAPK, PI3-K/Akt et p38 MAPK. De plus, les protéines Ku peuvent interagir avec le récepteur et réguler la survie, pour Ku70 (Com *et al.*, 2007) et l'invasion cellulaire, pour Ku86 (Lagadec *et al.*, 2010).

Dans le cancer du sein, la compréhension de la signalisation engagée par l'axe NGF/TrkA est donc une voie prometteuse dans l'optique d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le proNGF a longtemps été considéré comme un simple précurseur protéique permettant de générer du NGF mature après clivage enzymatique intracellulaire par la furine et des proconvertases (Bresnahan *et al.*, 1990 ; Seidah *et al.*, 1996). En 2001, il a été décrit comme une molécule biologiquement active puisqu'il peut induire la mort neuronale là où le NGF favorise la survie et la différenciation (Lee *et al.*, 2001). Cette dichotomie dans les effets induits par le NGF et son précurseur peut s'expliquer par le recrutement de complexes de récepteurs différents. En effet, le NGF engage sa signalisation *via* la formation d'un complexe p75^{NTR}/TrkA alors que le proNGF nécessite la formation d'un complexe p75^{NTR}/sortiline. Néanmoins, plusieurs équipes ont reporté une activation de la phosphorylation de TrkA et de sa signalisation sous-jacente par des formes mutées, non

DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

clivables, du proNGF, (Fahnestock *et al.*, 2004 ; Boutilier *et al.*, 2008 ; Clewes *et al.*, 2008 ; Masoudi *et al.*, 2009).

En 2003, un article a mis en évidence, pour la première fois, l'effet du proNGF dans un contexte tumoral ; cette étude démontre une augmentation de la capacité migratoire des cellules de mélanome sous l'effet de la proneurotrophine (Shonukan *et al.*, 2003). Par ailleurs, en 2005, une étude a montré que le proNGF est le produit du gène *NGF* majoritairement retrouvé dans de nombreux organes (Fahnestock *et al.*, 2001 ; Bierl *et al.*, 2005). Enfin, plusieurs études ont rapporté l'expression du proNGF et de la sortiline dans des cellules cancéreuses (Martin *et al.*, 2002 ; Somai *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 2002 ; Truzzi *et al.*, 2008).

Au début de ma thèse, l'implication du NGF dans le cancer du sein était bien établie. En revanche, aucune donnée n'était disponible sur l'expression et les effets potentiels du proNGF dans les cellules cancéreuses de sein.

L'objectif de mon travail de thèse a donc été de déterminer le rôle du proNGF dans le cancer du sein. Dans cette optique, j'ai développé différentes approches complémentaires me permettant d'analyser les voies de signalisation induites par la proneurotrophine :

- Clonage d'un récepteur chimérique HA-TrkA et mutagenèse dirigée du récepteur sur ses différents sites de phosphorylation,
- Etablissement et caractérisation de lignées cancéreuses de sein surexprimant stablement les différentes formes du récepteur TrkA,
- Etude *in vitro* de l'effet pro-invasif du proNGF par tests en chambres de Boyden,
- Protéomique fonctionnelle de l'interactome du récepteur TrkA.

Les résultats obtenus sont présentés dans les articles suivants :

Article 1 : Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through TrkA and sortilin (*J. Biol. Chem* 2012 Jan 13; 287(3): 1923-31).

Article 2 : ProNGF pro-invasive effect is dependent of Src activation by EphA2 in breast cancer cells (en préparation)

RÉSULTATS

RÉSULTATS

Article 1 : Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through Tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein

Dans ce premier article, nous mettons en lumière l'implication nouvelle du proNGF dans le cancer du sein. Nous montrons que les cellules épithéliales cancéreuses mammaires produisent et sécrètent du proNGF. De même, le proNGF est surexprimé dans des tumeurs mammaires malignes, en comparaison aux tumeurs bénignes et aux biopsies normales. Enfin, nous démontrons que le proNGF induit l'invasion de la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231 *via* une signalisation originale, en comparaison avec le NGF, avec l'intervention de la sortiline et de TrkA et l'activation des voies PI3-K/Akt et Src.

Cet article a été publié dans la revue :

« The Journal of Biological Chemistry » (vol 287(3); p 1923-1931; 2012)

Pro-nerve Growth Factor Induces Autocrine Stimulation of Breast Cancer Cell Invasion through Tropomyosin-related Kinase A (TrkA) and Sortilin Protein^{*[5]}

Received for publication, December 12, 2010, and in revised form, November 25, 2011. Published, JBC Papers in Press, November 29, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.211714

Yohann Demont^{†1,2}, Cyril Corbet^{†1}, Adeline Page^{§3}, Yasemin Ataman-Önal[¶], Genevieve Choquet-Kastylevsky[¶], Ingrid Fliniaux[‡], Xuefen Le Bourhis[‡], Robert-Alain Toillon[‡], Ralph A. Bradshaw^{||}, and Hubert Hondermarck^{‡4}

From [†]INSERM U908 Growth Factor Signaling in Breast Cancer and the [§]Mass Spectrometry Facility, IFR-147, University of Lille, Villeneuve d'Ascq 59655, France, the [¶]Department for Biomarker Research and Validation, BioMérieux, F-69280 Marcy l'Etoile, France, and the ^{||}Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California, San Francisco, California 94158

The precursor of nerve growth factor (proNGF) has been described as a biologically active polypeptide able to induce apoptosis in neuronal cells, via the neurotrophin receptor p75^{NTR} and the sortilin receptor. Herein, it is shown that proNGF is produced and secreted by breast cancer cells, stimulating their invasion. Using Western blotting and mass spectrometry, proNGF was detected in a panel of breast cancer cells as well as in their conditioned media. Immunohistochemical analysis indicated an overproduction of proNGF in breast tumors, when compared with benign and normal breast biopsies, and a relationship to lymph node invasion in ductal carcinomas. Interestingly, siRNA against proNGF induced a decrease of breast cancer cell invasion that was restored by the addition of non-cleavable proNGF. The activation of TrkA, Akt, and Src, but not the MAP kinases, was observed. In addition, the proNGF invasive effect was inhibited by the Trk pharmacological inhibitor K252a, a kinase-dead TrkA, and siRNA against TrkA sortilin, neurotensin, whereas siRNA against p75^{NTR} and the MAP kinase inhibitor PD98059 had no impact. These data reveal the existence of an autocrine loop stimulated by proNGF and mediated by TrkA and sortilin, with the activation of Akt and Src, for the stimulation of breast cancer cell invasion.

Nerve growth factor (NGF),⁵ the prototypical member of the neurotrophin family of polypeptides, is essential for the survival and differentiation of central and peripheral neurons, and its role in the development and regeneration of the sympathetic and sensory nervous systems has been extensively described

(1). NGF binds to the tropomyosin-related kinase A (TrkA) receptor, a tyrosine kinase receptor, and to the p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}), a member of the tumor necrosis factor receptor family, to induce its neurotrophic effects. NGF is synthesized as a 25-kDa precursor protein, named proNGF, that yields the mature NGF polypeptide of 13.5 kDa and an inactive prosegment of 11.5 kDa, released from the N terminus intracellularly by furin, or extracellularly by plasmin as well as by several matrix metalloproteases (2). Importantly, proNGF can be secreted without being processed to mature NGF and can have its own biological effects (3). As more than just a source for NGF, proNGF was shown to induce neuronal death by apoptosis where mature NGF induced survival and differentiation (4, 5). For inducing its proapoptotic effect on neurons, proNGF forms a trimeric complex with two plasma membrane receptors: p75^{NTR} and sortilin (4). Sortilin, a 95-kDa type I receptor, a member of the vacuolar protein sorting-associated protein 10-domain (Vps10p domain) receptors, was first identified for its ability to bind neurotensin and was more recently shown to bind the prosegment of proNGF (4, 6). Interestingly, although p75^{NTR} and sortilin are considered as the main receptors for proNGF, activation of TrkA phosphorylation and downstream signaling has been reported (7, 8). Thus, proNGF, in the absence of processing, is also an active product of the *NGF* gene.

Aside from its neurotrophic properties, NGF has been implicated in a few carcinomas and particularly in breast cancer, where it stimulates both cell proliferation and survival through the activation of TrkA and p75^{NTR}, respectively (9–12). NGF cooperates with the tyrosine kinase receptor HER2 to activate breast cancer cell growth (13), and the anti-estrogen drug tamoxifen, which is widely used in breast cancer therapy, is able to inhibit its mitogenic effect (14). In addition, repression of SHP-1 phosphatase expression by p53 leads to TrkA tyrosine phosphorylation (15). Given TrkA and p75^{NTR} expression in breast tumor cells (16–18), the demonstration that NGF is overexpressed in the majority of human breast tumors and that its inhibition can result in a diminished tumor growth in pre-clinical models underscores the potential value of NGF as a therapeutic target (19). However, despite these findings with NGF, there has not been any study linking proNGF and breast cancer.

In this study, it is shown for the first time that breast cancer cells release proNGF, producing an autocrine stimulation loop

* This work was supported by grants from the "Ligue Nationale Contre le Cancer" (Equipe labellisée 2009 and the Comité du Nord), the INSERM, the French Ministry for Research and Education, the Groupement des Entreprises Françaises pour la Lutte Contre le Cancer (GEFLUC), and the "Région Nord-Pas-de-Calais."

[5] This article contains supplemental Figs. S1 and S2.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Recipient of a fellowship from the "Association pour la Recherche sur le Cancer."

³ Present address: Laboratory of Mass Spectrometry, Institute of Genetic and Molecular and Cellular Biology, 67404 Illkirch CEDEX, France.

⁴ To whom correspondence should be addressed: School of Biomedical Sciences and Pharmacy, University of Newcastle, Callaghan NSW 2308, Australia. E-mail: hubert.hondermarck@newcastle.edu.au.

⁵ The abbreviations used are: NGF, nerve growth factor; pro^{NGF}, precursor of nerve growth factor; TrkA, tropomyosin-related kinase A; NTR, neurotrophin receptor; SIM, selected ion monitoring.

Autocrine proNGF in Breast Cancer

mediated through TrkA plus sortilin and leading to the activation of cancer cell invasion. Thus, these data reveal a direct involvement of proNGF in breast cancer development.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture and Transfection with siRNA and cDNA Constructs—Breast cancer cell lines were routinely grown as described previously (10). For transfection with siRNA, cells were nucleofected using the Amaxa Cell Line Nucleofector kit V (Lonza) according to the manufacturer's recommendations, with 1.5 μ g of annealed siRNA. The siRNA sequences used (Eurogentec) were against proNGF (siproNGF) GAAUGCUGAAGUUAGUCCTT, p75^{NTR} (siP75) AUGCCUCCUUGGACCUCCTT, and sortilin (siSORT) CUCUGCUGUUAACACCACCTT and compared with control (siGFP) GAUGAACUCAGGGUCAGCTT. For TrkA, a pool of three siRNA sequences was used: GAACCUGACUGAGCUCUAC, UGGA-GUCUCUCUCCUGGAA, and GCUGCAGUGUCAUGGGCAA. The decrease in targeted protein level was assessed by immunoblotting with anti-proNGF (AB9040, Millipore), anti-p75^{NTR} (clone D8A8, Cell Signaling Technology), anti-TrkA (Sc-118, Santa Cruz Biotechnology), and anti-sortilin (612101, BD Biosciences or ANT-009 Alomone Labs, for detection of rat sortilin in PC12 cells). Actin detection (A2066, Sigma-Aldrich) was used for an equi-loading control.

The TrkA expression vector (pDisplay/TrkA) was prepared by inserting TrkA cDNA from MDA-MB-231 cells (TrkA variant 1: NM_001012331.1) into the pDisplay vector (Invitrogen). The kinase-dead TrkA construct was obtained by mutating the three tyrosines 670/674/675 of the tyrosine kinase domain. All other constructs were generated by replacing a single tyrosine residue with phenylalanine with the QuikChange[®] site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Cell transfections were done using Amaxa (Lonza) according to the manufacturer's instructions. Cells were selected with 1 mg/ml G418 (Invitrogen), and the resistant cell populations were stored as frozen stocks and used for all the experiments within 20 passages. Expression of TrkA was not modified with passages as verified by Western blot analysis.

Cell Extracts and Conditioned Medium Preparation—Subconfluent breast cancer cells were rinsed with PBS and lysed in 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5, 1% SDS, 1% Nonidet P-40, 100 μ M sodium orthovanadate and then boiled for 5 min at 100 °C. After centrifugation (12,000 \times g, 5 min), the supernatant was frozen (−80 °C) until immunoblotting. For conditioned medium recovery, subconfluent cells were rinsed twice and starved for 24 h. The medium was centrifuged (200 \times g, 10 min, 4 °C), and the supernatant was concentrated by Amicon Ultra-15 with a 10-kDa cut-off according to the manufacturer's recommendations. The concentrated conditioned medium was frozen at −20 °C until immunoblotting or nanoLC mass spectrometry analysis.

Western Blotting—After a 5-min boiling in Laemmli buffer, proteins were submitted to SDS-PAGE and then transferred onto a nitrocellulose membrane by electroblotting. The saturation was done in TBS-Tween 0.1% containing 5% bovine serum albumin, 3% skimmed milk (for anti-TrkA), or 0.2% casein (for anti-sortilin) for 1 h at room temperature. Membranes were

incubated with anti-proNGF (AB9040, Millipore), anti-NGF (Sc-548, Santa Cruz Biotechnology) 1/1000, or anti- β -actin antibody (A2066, Sigma-Aldrich) 1/5000 as control, in saturation buffer (overnight, 4 °C). Antibodies against TrkA were from Santa Cruz Biotechnology, and phospho-TrkA (Tyr-674/-675), pan-Akt, phospho-Akt (Ser-473), Src, phospho-Src (Tyr-416), Erk1/2, and phospho-Erk 1/2 (Thr-202/Tyr-204) were from Cell Signaling. The membranes were rinsed and incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G antibody (711-035-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 1 h at room temperature. After extensive washes, the reaction was revealed using the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate with Amersham Biosciences Hyperfilm ECL or with a Fuji LAS-4000 luminescent analyzer using exposure times at subsaturation.

Mass Spectrometry—A nanoLC-nanoESI/SIM-MS system was used for the detection of proNGF protein, as described previously (19), with an ion trap mass spectrometer (LCQ Deca XP⁺; Thermo Fisher) equipped with a nanoelectrospray ion source coupled with a nano high pressure liquid chromatography system (LC Packings, Dionex). The SIM/MS ionic signal of proNGF was detected at a retention time of 29.43 min after nanoLC separation. The deconvoluted mass spectrum was depicted with the Bioworks 3.1 software (Thermo Fisher).

Immunocytochemistry—Cells were grown on rat tail collagen I-coated Labtek dishes until 60% of confluency was reached. After a 1 μ M ionomycin (or dimethyl sulfoxide (DMSO) for control) treatment of 60 min, cells were successively rinsed with PBS, pH 7.5, fixed for 20 min with paraformaldehyde 4%, permeabilized for 20 min at room temperature with PBS, pH 7.5; 0.05% saponin; 50 mM ammonium chloride and blocked for 30 min with PBS, pH 7.5; 0.05% saponin; 2% bovine serum albumin. Cells were then incubated for 2 h at room temperature in the blocking solution containing 1/500 proNGF antibody (AB9040, Millipore) or normal rabbit immunoglobulin G (AB-105-C, R&D systems) for control, rinsed with PBS, pH 7.5, and incubated for 1 h at 37 °C in the blocking solution containing 1/2000 Alexa Fluor 488 anti-rabbit immunoglobulin G. Slides were mounted and observed at a 494-nm wavelength through a fluorescence microscope (Nikon).

Immunohistochemistry—Analysis of normal and tumor biopsies was performed using tissue arrays (Biomax and BioChain). After deparaffinization and hydration, antigens were recovered in citrate buffer (10 mM, pH 6) at 60 °C. Endogenous peroxidases were quenched by submerging slides in TBS-Tween 20, 0.1%, containing 3% H₂O₂ (10 min, room temperature). After saturation in TBS-Tween 20 0.1% with 3% BSA (60 min, 37 °C), slides were probed with anti-proNGF antibody (AB9040, Millipore) or with normal rabbit immunoglobulin G (AB-105-C, R&D systems) as control at 1/200 in saturating buffer (2 h, 37 °C). Slides were then washed and incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (711-035-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 1/400 in saturating buffer (2 h, 37 °C). Immunostaining was visualized with diaminobenzidine chromogen, and slides were post-stained with Harris hematoxylin. After mounting, photomicrographs were taken.

Cancer Cell Invasion Assay—Cells were rinsed twice and left for 24 h in starvation medium with 0.1% fetal calf serum. Migration assays were done in 12-well Boyden microchambers (Transwell®) with 8- μ m pore size membranes. The Transwell microchambers were first coated with 100 μ l of starvation medium with 0.1% FCS plus 40 μ g of rat tail collagen I for 1 h at 37 °C in 5% CO₂. 100,000 cells in 400 μ l of starvation medium with 0.1% FCS were loaded in the upper chamber, whereas 1.6 ml of starvation medium with 0.1% FCS was placed in the lower chamber. After 20 h of incubation in the presence of proNGF (from Alomone (Israel) and a generous gift from Dr. E. Schwarz, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle, Germany), non-cleavable proNGF (Alomone Labs) including amino acid substitutions or NGF (Scil Proteins GmbH), with or without pharmacological inhibitors (K252a inhibitor of Trk kinase, LY294002 inhibitor of PI3K, PD98059 inhibitor of MAPK, SKI-1 inhibitor of Src, furin inhibitor I, all from Calbiochem) or siRNA sequences, the Transwell microchambers were rinsed with PBS, and the upper surface of the membrane was scraped to remove cells. Neurotensin was from Sigma. The cells remaining on the down side of the membrane were Hoechst-stained and mounted on glass slides with Glycergel before counting (10 fields per membrane) through a fluorescence microscope at 352 nm. Each condition was done in triplicate. Statistics were performed with one-way analysis of variance test and Bonferroni's post test by using GraphPad Prism 5.01 software.

RESULTS

ProNGF Is Produced and Secreted by Breast Cancer Cells—The production of proNGF by breast cancer cells was analyzed by immunoblotting with an anti-proNGF antibody, directed against the prosegment, that does not recognize mature NGF. Each tested cell line was shown to exhibit an immunoreactive band at 25 kDa, which corresponds to the theoretical molecular mass of proNGF (Fig. 1A). This band decreased after cell transfection with siRNA targeting proNGF, further demonstrating that it does indeed correspond to proNGF (Fig. 1B). In addition, proNGF was not detected in conditioned media when cells were treated with siRNA targeting proNGF. Cellular proNGF localization was assessed by immunocytochemistry (Fig. 1C). ProNGF was visualized in the cytoplasm of tested cell lines, whereas normal rabbit immunoglobulin G did not lead to any staining. These data are in accord with our previously published results, which showed that the same cancer cell lines express an NGF transcript (10). Moreover, immunocytochemical observations suggested that proNGF was secreted as it was diminished upon treatment with ionomycin, an inducer of secretion. Importantly, Western blot analysis of conditioned medium with anti-proNGF confirmed the presence of an immunoreactive band from four cell lines (Fig. 1D). The detection of proNGF in the conditioned media was further validated by anti-NGF recognition of the 25-kDa band. Of note, NGF was also detected at about 14 kDa. Finally, proNGF was detected as a single peak after nano-liquid chromatography separation, as shown in the corresponding mass spectrometric spectra (Fig. 1E); the deconvolution of the putative proNGF peak yielded the precise molecular mass (24,928 Da) expected for this protein.

Together, these data indicate that proNGF is synthesized and secreted by breast cancer cells.

ProNGF Overexpression in Breast Tumors—The production of proNGF by breast cancer cells was observed in tumor biopsies. Immunohistochemistry was performed on 521 human breast biopsies representing 144 healthy donors, 11 patients with benign tumors, and 366 patients with malignant tumors. As illustrated in Fig. 2A, proNGF immunoreactivity was found in the epithelial compartment of various malignant tumors, whereas it was poorly detected in benign tumors and normal biopsies. ProNGF was not found in 94 of 144 healthy donors (65%) nor in 64% of the benign tumor samples. In contrast, proNGF was found in the majority of breast cancers (287 of 366, 78%). Thus, proNGF overproduction appears to be a general phenomenon in a significant number of breast tumors. This is consistent with the reported overexpression of NGF in breast tumors (10, 19). There was no significant correlation between the presence of proNGF and the histological grade, the tumor value, the axillary lymph node status, the presence of metastases, the age, and the presence of estrogen or progesterone receptors (data not shown). Nevertheless, when considering only invasive ductal carcinomas, which represent the majority of breast cancers, a statistically significant association ($p = 0.0042$) was obtained between the presence of proNGF and lymph node invasion by breast cancer cells (Fig. 2B), suggesting a potential link to metastasis.

ProNGF Stimulates Invasion of Breast Cancer Cells through TrkA and Sortilin—The biological impact of proNGF on breast cancer cell invasion was tested. As shown in Fig. 3A, non-cleavable proNGF induced a stimulation of breast cancer cell invasion. The data presented in Fig. 3 have been obtained with proNGF from Alomone Labs. In addition, the proNGF 123 construct (20) (generous gift from Dr. Kenneth Neet, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, Chicago, IL) was also tested. As shown in supplemental Fig. S1, the results were identical to what was obtained with Alomone Labs proNGF. Non-cleavable proNGF was used here to ensure that no NGF would be generated from proNGF, but it has been observed that wild type proNGF also induced the same stimulation of breast cancer cell invasion; moreover, for the same concentration, NGF did not lead to any significant effect (data not shown). siRNA against proNGF led to a dramatic disruption of cell invasion, which was restored upon the addition of recombinant non-cleavable proNGF, suggesting the existence of an autocrine loop of stimulation. p75^{NTR} impairment by siRNA had little effect, indicating that p75^{NTR} was at best poorly implicated in the proNGF stimulation of breast cancer cell invasion. Interestingly, siRNA against TrkA or sortilin prevented cells from migrating through the collagen-coated membrane of the Transwell microchambers, in the same manner as siRNA against proNGF did in the presence of non-cleavable proNGF. The addition of proNGF was not able to induce cell invasion in the absence of TrkA or sortilin, indicating that these receptors were necessary to trigger the proNGF pro-invasive effect. In contrast to proNGF, when epidermal growth factor was added to sortilin- or TrkA-depleted cells, a stimulation of cell invasion was observed (data not shown). Of note, siRNA against proNGF induced a greater inhibition than that of TrkA, and this could be

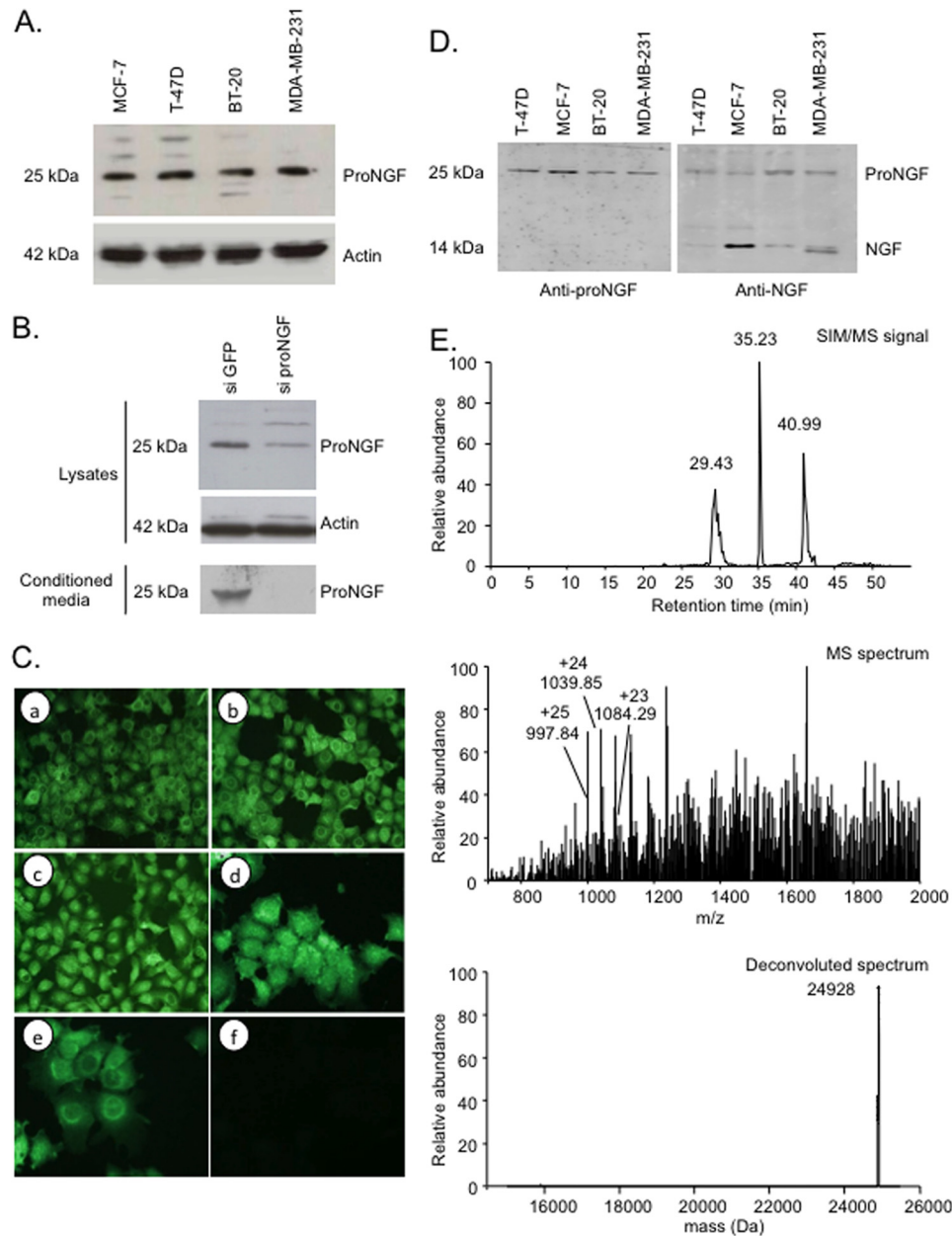


FIGURE 1. ProNGF production and secretion by breast cancer cells. A, Western blot analysis of proNGF production by breast cancer cell lines MCF-7, T-47D, BT-20, and MDA-MB-231, with 50 μ g of protein per lane and anti-proNGF. B, Western blot analysis of proNGF in MDA-MB-231 transfected with siRNA against proNGF (*si*proNGF) or control non-targeting siRNA (*si*GFP), in both cell lysate and conditioned media. C, panels a–c, immunocytochemistry of proNGF in T-47D (panel a), BT-20 (panel b), and MDA-MB-231 (panel c). Panels d and e, magnification of cellular localization in MCF-7 (panel d) and after cells were treated with 1 μ M ionomycin (panel e). Panel f, in control, control MCF-7 cells with rabbit normal immunoglobulin G. D, Western blot analysis of conditioned medium of T-47D, MCF-7, BT-20, and MDA-MB-231 cells, with anti-proNGF (left panel) and anti-NGF (right panel). E, mass spectrometric detection of proNGF in breast cancer cell conditioned media. The MS spectrum of proNGF showed the three multiple charge ions (+23, +24, +25) selected for the SIM acquisition and specific identification of proNGF. The deconvoluted mass spectrum shows the molecular mass of proNGF monomeric chain at 24,928 Da.

due to the inhibition of NGF production as NGF can also stimulate breast cancer cell migration (as shown in Fig. 4). In controls, Western blot analysis showed the efficiency of the siRNA in decreasing the level of the different proteins. A Western blot comparison of TrkA, p75^{NTR}, and sortilin in breast cancer cells *versus* PC12 cells is presented in supplemental Fig. S2. Together, these results indicate that secreted proNGF is able to stimulate breast cancer cell invasion through TrkA and sortilin rather than p75^{NTR}. Significantly, transfection of breast cancer cells with a kinase-dead TrkA abolished the pro-invasive effect of proNGF (Fig. 3A), and phosphorylation of TrkA and activa-

tion of downstream signaling pathways were thus tested (Fig. 3B). ProNGF induced the activation of TrkA, with a maximum level of TrkA phosphorylation observed after 60 min of stimulation that was followed by Akt and Src activation, whereas ERK1/2 were not stimulated. The efficacy and specificity of the pharmacological inhibitors used are shown (Fig. 3C), and this is consistent with the fact that pharmacological inhibitors of TrkA, Akt, and Src abolished the proNGF-induced invasion of breast cancer cells (Fig. 3A). In contrast, the pharmacological inhibitor of MAP kinases, PD98059, had no impact on proNGF-induced cell invasion. The selective mutation of TrkA Tyr-490/

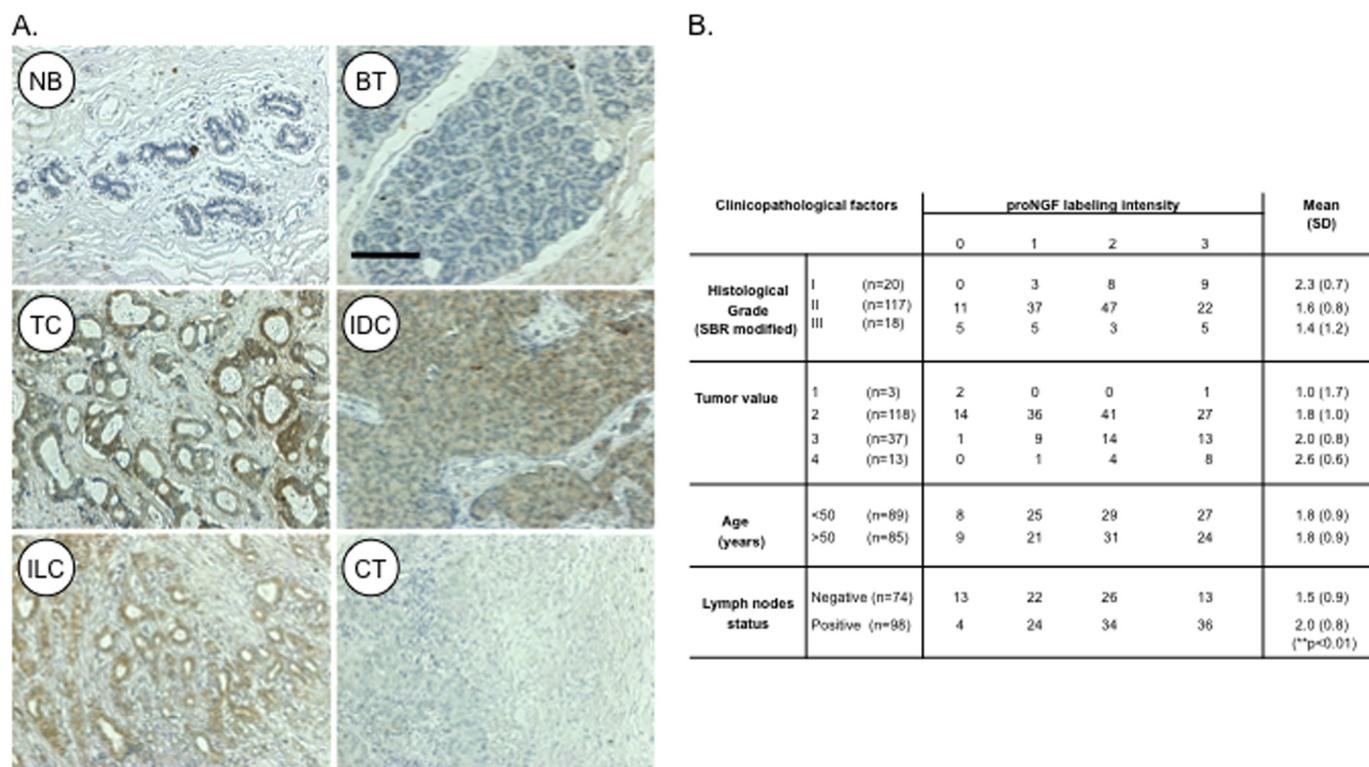


FIGURE 2. Immunolocalization of proNGF in human breast biopsies. *A*, immunohistochemistry with anti-proNGF on normal breast biopsies (NB), benign tumors (BT), and tubular (TC), invasive ductal (IDC) and lobular (ILC) carcinomas. As a control (CT), normal rabbit immunoglobulin G was used on invasive ductal carcinoma. Size bar = 200 μ m. *B*, association of proNGF production and clinicopathological parameters in 174 invasive ductal carcinomas. ProNGF labeling intensity was visually determined, from 0 (no staining) to 3 (intense staining), and association with various clinicopathological parameters was tested with the χ^2 test. For some patients, not all data could be retrieved; consequently, the total number can differ. Biopsies are clustered using histological grade (according to Bloom and Richardson), tumor value, patient age, and axillary and lymph node status.

695/751/785 indicated that only Tyr-490 was required for the proinvasive effect of proNGF (Fig. 3D). The addition of neurotensin, which is a natural ligand of sortilin, inhibited the phosphorylation of TrkA and the activation of Akt induced by proNGF as well as its proinvasive effect (Fig. 3E), suggesting that a proNGF/sortilin interaction is necessary for TrkA activation.

Effect of ProNGF versus NGF on TrkA Signaling and Breast Cancer Cell Invasion—The furin inhibitor I had no impact on either the proinvasive effect of proNGF or the activation of TrkA signaling (Fig. 4A). These data indicate that the activation of TrkA signaling by proNGF and the subsequent proinvasive effect do not involve intracellular cleavage into mature NGF. Comparison of proNGF and NGF shows that mature NGF can also induce breast cancer cell invasion, but at much higher concentration (Fig. 4B). A maximum effect of proNGF was obtained at 0.5 nM, whereas the maximum effect of NGF was obtained with 16 nM. The proinvasive effect of NGF was inhibited by siRNA against TrkA, but in contrast to what was observed for proNGF, siRNA against sortilin or the addition of neurotensin had no effect on NGF-mediated cell invasion (Fig. 4C). The signaling activated by NGF also involves TrkA, Akt, and Src activation (Fig. 4D). A side-by-side comparison of the signaling intensity, obtained on the same blot, for proNGF and mature NGF, at concentrations stimulating breast cancer cell invasion (*i.e.* 0.5 nM proNGF and 16 nM mature NGF), showed that the activation of TrkA, Akt, and Src was stronger for mature NGF when compared with proNGF (Fig. 4E). Neverthe-

less, at the concentration for which proNGF is active, mature NGF does not exhibit any activity on either cell invasion or TrkA signaling. Together, these data show that NGF is less potent than proNGF in inducing breast cancer cell invasion and solely involves TrkA activation, without the participation of sortilin.

DISCUSSION

In this study, it is shown that proNGF, which has mainly been studied for its effects in a neuronal context, is produced and secreted by breast cancer cells. Previous studies have reported that cells of the central nervous system can secrete proneurotrophins (21), but to our knowledge, the study reported herein is the first demonstration that proNGF is also secreted by tumor cells. Although the corresponding mature NGF was previously shown to be produced by breast cancer cells (10), the fact that proNGF can be cleaved intracellularly by prohormone convertases and furin could have prevented the secretion of the precursor form (22–24). Nevertheless, proNGF was found in the conditioned medium, and siRNA inhibition resulted in a diminished biological effect, indicating the secretion of proNGF by breast cancer cells.

Although NGF promotes breast cancer cell survival and growth via p75^{NTR} and TrkA, followed by the activation of NF- κ B and MAP kinases (9, 11, 25, 26), the results shown here indicate that proNGF activates tumor cell dissemination via TrkA and sortilin, without involvement of p75^{NTR}, resulting in Akt and Src activation. P75^{NTR} and sortilin are described as

Autocrine proNGF in Breast Cancer

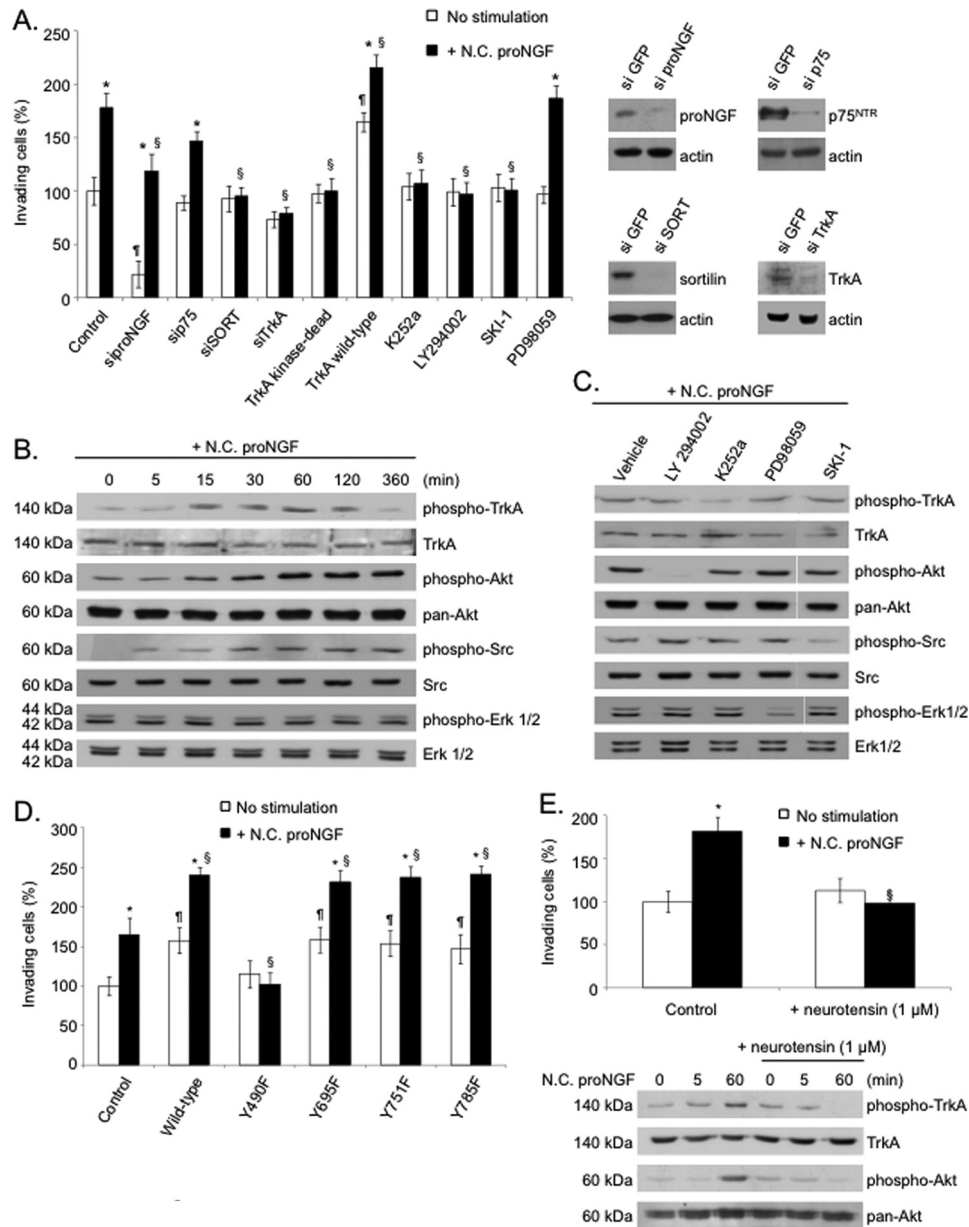


FIGURE 3. Effect of proNGF on invasion of breast cancer cells and associated signaling pathways. *A*, cell invasion assay on MDA-MB-231 transfected with the siRNA against proNGF (*si proNGF*), p75^{NTR} (*si p75*), sortilin (*si SORT*), TrkA (*si TrkA*), control siRNA (*Control*), or TrkA kinase-dead versus TrkA wild type, treated or not with 0.5 nM recombinant human non-cleavable proNGF (N.C. proNGF) and/or 10 nM K252a (Trk inhibitor), 15 μM LY294002 (PI3 kinase inhibitor), 50 nM SKI-1 (Src inhibitor), or 10 μM PD98059 (MAP kinase inhibitor). Untreated siGFP-transfected control cells represent the control 100% of invasion (white bar). The efficiency of siRNA treatments was assessed by Western blotting. *B*, proNGF-induced cell signaling in breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were stimulated by 0.5 nM non-cleavable proNGF for the indicated times. *C*, the efficacy and specificity of pharmacological inhibitors used in cell invasion assays were tested in Western blotting. *D*, cell invasion assay on MDA-MB-231 cells transfected with mutated forms of TrkA. Tyr-490, Tyr-695, Tyr-751, and Tyr-785 were mutated, and response to proNGF was tested. *E*, neurotensin effect on proNGF-induced signaling and breast cancer cell invasion. For Western blotting and cell invasion assay, the experimental conditions were identical to what was described in *A* and *B*. For the statistics in *A*, *D*, and *E*, error bars represent S.D. *, $p < 0.001$ for proNGF stimulation versus no stimulation; §, $p < 0.001$ for experimental versus control under proNGF stimulation; ¶, $p < 0.001$ for experimental versus control with no proNGF stimulation.

receptors of proNGF in the nervous system, and the molecular and structural basis of their interaction has been described (27). In melanoma cells, it has previously been shown that the addition of proNGF can lead to a stimulation of cell invasion through activation of p75^{NTR} and sortilin (28); in this model, TrkA was not found to be necessary. However, the activation of TrkA by proNGF has also been reported in other models (8), with the biological activity of proNGF dependent upon relative levels of TrkA versus p75^{NTR} (29). Therefore, although p75^{NTR}

appears to be mediating proNGF invasive effects in melanoma, in breast cancer, the present study indicates that TrkA is involved without the participation of p75^{NTR}. Whether or not this is related to a different ratio of TrkA/p75^{NTR} between melanoma and breast cancer cells remains to be elucidated, but a common feature between the two models is the necessity of binding to sortilin. A direct interaction between TrkA and sortilin has recently been reported (30), and such an interaction could also occur in breast cancer cells. The fact that neuroten-

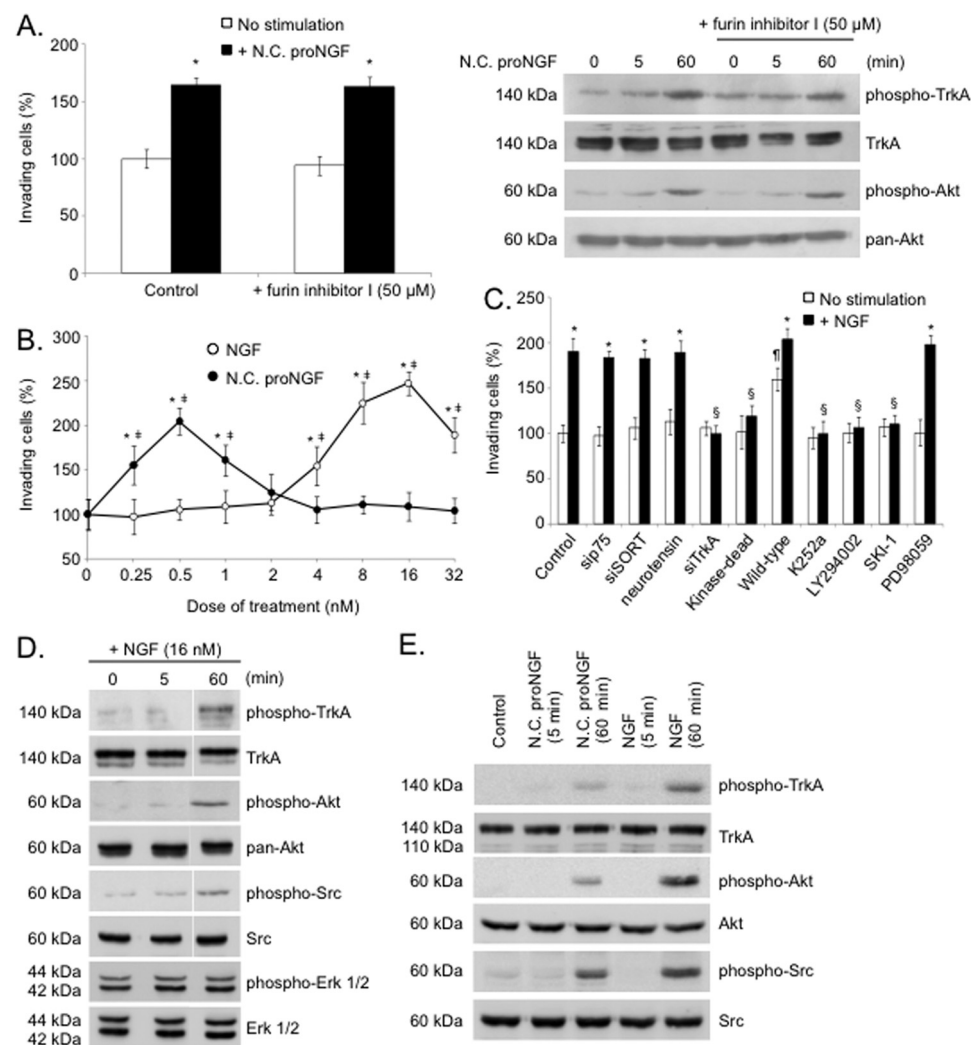


FIGURE 4. ProNGF versus NGF effect on TrkA-mediated signaling and stimulation of breast cancer cell invasion. *A*, ProNGF does not require cleavage into NGF to stimulate TrkA activation and breast cancer cell invasion. The furin inhibitor I was tested at the indicated concentration on both MDA-MB-231 cell invasion and TrkA signaling activation as described under "Experimental Procedures." *N.C. proNGF*, non-cleavable proNGF. *B*, dose effect of proNGF and NGF on breast cancer cell invasion. The indicated concentrations were tested for 20 h. *C*, cell invasion assay on MDA-MB-231 transfected with the siRNA against p75^{NTR} (*sip75*), sortilin (*siSORT*), TrkA (*siTrkA*), control siRNA (*Control*), or TrkA kinase-dead versus TrkA wild type, treated or not with 0.5 nM recombinant human NGF and/or 10 nM K252a (Trk inhibitor), 15 μ M LY294002 (PI3 kinase inhibitor), 50 nM SKI-1 (Src inhibitor), or 10 μ M PD98059 (MAP kinase inhibitor). Untreated siGFP-transfected cells represent the control 100% of invasion (white bar). *D*, NGF-induced cell signaling in breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were stimulated with 16 nM NGF for the indicated times. For statistics in *A*, *B*, and *C*, error bars represent S.D. *, $p < 0.001$ for proNGF stimulation versus no stimulation; $p < 0.001$ for experimental versus control under proNGF stimulation; §, $p < 0.001$ for experimental versus control under proNGF stimulation; ¶, $p < 0.001$ for experimental versus control with no proNGF stimulation. †, $p < 0.001$ for proNGF versus NGF at the same concentration. *E*, side-by-side comparison of signaling intensity, obtained on the same blot, for proNGF and mature NGF. Concentrations for which a stimulation of breast cancer cell invasion was obtained, i.e. 0.5 nM proNGF and 16 nM mature NGF, were used.

sin, the natural ligand of sortilin, was found to inhibit the activation of TrkA by proNGF suggests that a direct interaction of proNGF and sortilin is necessary for the stimulation of TrkA. Moreover, TrkA activation by proNGF has already been observed in PC12 cells, and it requires endocytosis and intracellular proteolysis of the proneurotrophin (7). In breast cancer cells, as demonstrated with the use of non-cleavable proNGFs and the furin inhibitor, the processing of proNGF into NGF is not required for activation of TrkA and cell invasion. Moreover, the activation of breast cancer cell invasion by NGF requires a concentration 15 times higher than proNGF, emphasizing that the generation of mature NGF cannot cause the proinvasive effect of proNGF. Together, this indicates that TrkA is the functional receptor for proNGF in breast cancer cells and that it is involved in the stimulation of tumor cell invasion.

Metastasis of breast cancers is a major issue as it is directly correlated to patient mortality (31). To date, there is no validated biomarker to predict the metastatic nature of breast tumors, and peripheral node invasion by tumor cells remains the criterion used in clinical practice. The observation that proNGF is overproduced in malignant tumors makes it a potentially important molecule in breast cancer development. Importantly, the presence of proNGF was associated with lymph node invasion in invasive ductal carcinomas, whereas the examination of the other breast cancer types did not show such an association. Although further investigation of large cohorts of tumor biopsies will be needed to determine whether proNGF has a practical value as a prognostic biomarker, the data presented here suggest an association between proNGF level and node invasion/metastasis in breast cancer. This

hypothesis is coherent with the *in vitro* effect of proNGF leading to the stimulation of breast cancer cell invasion. In addition, it is also supported by the observation that proNGF induces Src and Akt as these kinases are well known for their involvement in cancer metastases as overexpression or higher activation of both Src and Akt occurs frequently in metastatic cancer cells (32, 33). The activation of Src and Akt downstream to TrkA stimulation has been well described in other models, for instance, in hippocampal neurons (34), and the reported importance of Tyr-490 in activating these pathways is confirmed here. Thus, both *in vitro* and *in vivo* analyses reported in the present study point to a potential role for proNGF in breast cancer metastasis.

In conclusion, proNGF is produced in breast cancer, where it can stimulate tumor cell invasion. ProNGF production adds to the recently reported expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-4/5 (NT-4/5), showing that neurotrophin family members and their receptors are generally involved in breast cancer (35). Brain-derived neurotrophic factor and NT-4/5 exhibit a different type of activity on breast cancer cells as they were found to stimulate tumor cell survival. In addition, the impact of neurotrophins could go beyond the stimulation of breast tumor cells themselves as recent studies suggest an effect of NGF on angiogenesis (36) as well as on the sprouting of sensory nerve fibers participating in cancer-induced pain (37). In addition to other studies reporting neurotrophin intervention in other pathologies, the present work integrates with the emerging concept that proNGF is a biologically active molecule that can function outside the nervous system. This prompts further studies to determine whether targeting proNGF and its receptors may have clinical benefits in the management of breast cancer, as well as in other carcinomas.

Acknowledgments—We thank Nathalie Gelus-Ziental for excellent technical assistance and Dr. Kenneth Neet for the generous gift of the proNGF123 construct.

REFERENCES

- Shooter, E. M. (2001) Early days of the nerve growth factor proteins. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 601–629
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., and Hempstead, B. L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**, 1945–1948
- Harrington, A. W., Leiner, B., Blechschmitt, C., Arevalo, J. C., Lee, R., Mörl, K., Meyer, M., Hempstead, B. L., Yoon, S. O., and Giehl, K. M. (2004) Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 6226–6230
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T. E., Hempstead, B. L., and Petersen, C. M. (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**, 843–848
- Pedraza, C. E., Podlesniy, P., Vidal, N., Arévalo, J. C., Lee, R., Hempstead, B., Ferrer, I., Iglesias, M., and Espinet, C. (2005) ProNGF isolated from the human brain affected by Alzheimer disease induces neuronal apoptosis mediated by p75^{NTR}. *Am. J. Pathol.* **166**, 533–543
- Quistgaard, E. M., Madsen, P., Grøftehaug, M. K., Nissen, P., Petersen, C. M., and Thirup, S. S. (2009) Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed β -propeller domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 96–98
- Boutillier, J., Ceni, C., Pagdala, P. C., Forgie, A., Neet, K. E., and Barker, P. A. (2008) Proneurotrophins require endocytosis and intracellular proteolysis to induce TrkA activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 12709–12716
- Clewes, O., Fahey, M. S., Tyler, S. J., Watson, J. J., Seok, H., Catania, C., Cho, K., Dawbarn, D., and Allen, S. J. (2008) Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, p75^{NTR}, and sortilin. *J. Neurochem.* **107**, 1124–1135
- Descamps, S., Toillon, R. A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S. M., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J. P., and Hondermarck, H. (2001) Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **276**, 17864–17870
- Dollé, L., El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Nurcombe, V., and Hondermarck, H. (2003) Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* **22**, 5592–5601
- El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Dollé, 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
- 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- κ B inhibition of apoptosis in breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **67**, 6725–6736
- Tagliabue, E., Castiglioni, F., Ghirelli, C., Modugno, M., Asnagli, L., Somenzi, G., Melani, C., and Ménard, S. (2000) Nerve growth factor cooperates with p185^{HER2} in activating growth of human breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 5388–5394
- 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
- Montano, X. (2009) Repression of SHP-1 expression by p53 leads to trkA tyrosine phosphorylation and suppression of breast cancer cell proliferation. *Oncogene* **28**, 3787–3800
- Aragona, M., Panetta, S., Silipigni, A. M., Romeo, D. L., Pastura, G., Mesiti, M., Cascinu, S., and La Torre, F. (2001) Nerve growth factor receptor immunoreactivity in breast cancer patients. *Cancer Invest.* **19**, 692–697
- Davidson, B., Reich, R., Lazarovici, P., Ann Flørenes, V., Nielsen, S., and Nesland, J. M. (2004) Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat* **83**, 119–128
- Descamps, S., Pawlowski, V., Révillion, F., Hornez, L., Hebbar, A. M., Boilly, B., Hondermarck, H., and Peyrat, J. P. (2001) Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res.* **61**, 4337–4340
- Adriaenssens, E., Vanhecke, E., Saule, P., Mougél, A., Page, A., Romon, R., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., and Hondermarck, H. (2008) Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* **68**, 346–351
- Pagdala, P. C., Dvorak, L. A., and Neet, K. E. (2006) Construction of a mutated pro-nerve growth factor resistant to degradation and suitable for biophysical and cellular utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 17939–17943
- Hempstead, B. L. (2006) Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. *Curr. Alzheimer Res.* **3**, 19–24
- Bresnahan, P. A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H. L., Brake, A. J., Barr, P. J., and Thomas, G. (1990) Human *fur* gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro- β -NGF *in vivo*. *J. Cell Biol.* **111**, 2851–2859
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., Chrétien, M., and Murphy, R. A. (1996) Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem. J.* **314**, 951–960
- Bruno, M. A., and Cuello, A. C. (2006) Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 6735–6740
- Lagadec, C., Meignan, S., Adriaenssens, E., Foveau, B., Vanhecke, E.,

- Romon, R., Toillon, R. A., Oxombre, B., Hondermarck, H., and Le Bourhis, X. (2009) TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene*, **28**, 1960–1970
26. 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**, 1864–1873
 27. Feng, D., Kim, T., Ozkan, E., Light, M., Torkin, R., Teng, K. K., Hempstead, B. L., and Garcia, K. C. (2010) Molecular and structural insight into proNGF engagement of p75^{NTR} and sortilin. *J. Mol. Biol.* **396**, 967–984
 28. Truzzi, F., Marconi, A., Lotti, R., Dallaglio, K., French, L. E., Hempstead, B. L., and Pincelli, C. (2008) Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2031–2040
 29. Masoudi, R., Ioannou, M. S., Coughlin, M. D., Pagadala, P., Neet, K. E., Clewes, O., Allen, S. J., Dawbarn, D., and Fahnstock, M. (2009) Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors. *J. Biol. Chem.* **284**, 18424–18433
 30. Vaegter, C. B., Jansen, P., Fjorback, A. W., Glerup, S., Skeldal, S., Kjolby, M., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J. R., Tessarollo, L., Lewin, G. R., Willnow, T. E., Chao, M. V., and Nykjaer, A. (2011) Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat. Neurosci.* **14**, 54–61
 31. Weigelt, B., Peterse, J. L., and van't Veer, L. J. (2005) Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 591–602
 32. Kim, L. C., Song, L., and Haura, E. B. (2009) Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 587–595
 33. Dillon, R. L., and Muller, W. J. (2010) Distinct biological roles for the Akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res.* **70**, 4260–4264
 34. Matrone, C., Marolda, R., Ciafrè, S., Ciotti, M. T., Mercanti, D., and Calissano, P. (2009) Tyrosine kinase nerve growth factor receptor switches from prosurvival to proapoptotic activity via A β -mediated phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 11358–11363
 35. Vanhecke, E., Adriaenssens, E., Verbeke, S., Meignan, S., Germain, E., Berteaux, N., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., and Hondermarck, H. (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.* **17**, 1741–1752
 36. 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
 37. Bloom, A. P., Jimenez-Andrade, J. M., Taylor, R. N., Castañeda-Corral, G., Kaczmarek, M. J., Freeman, K. T., Coughlin, K. A., Ghilardi, J. R., Kuskowski, M. A., and Mantyh, P. W. (2011) Breast cancer-induced bone remodeling, skeletal pain, and sprouting of sensory nerve fibers. *J. Pain.* **12**, 698–711

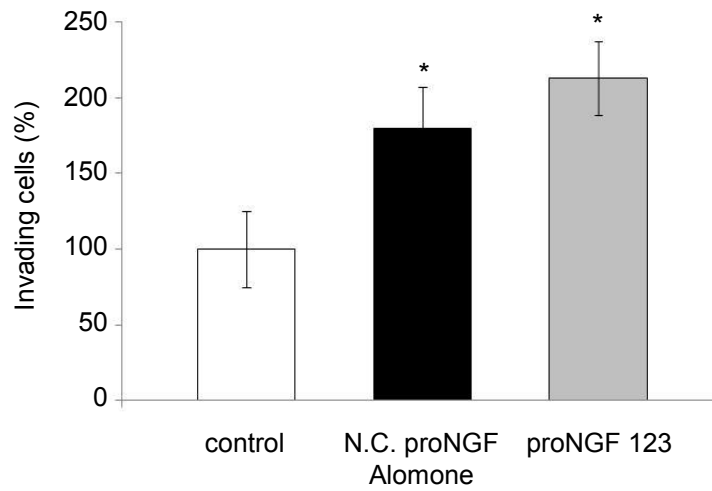
LEGEND TO SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1. Effect of proNGF123 on the invasion of breast cancer cells and associated signaling pathways. The assays were performed in the same conditions as for proNGF (obtained from Alomone) as described in the experimental procedures. For the statistics in A, error bars represent SD. * $p < 0.001$ for proNGF stimulation versus no stimulation.

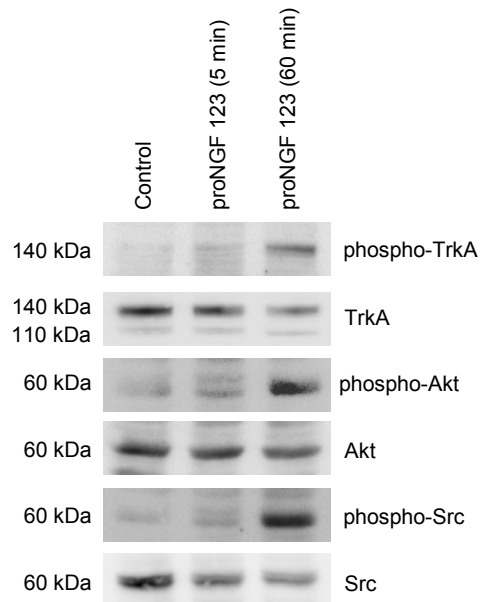
Figure S2. Western-blot analysis of TrkA, sortilin and p75^{NTR} in breast cancer cell lines. Western-blotting was performed as described in the experimental procedures. PC12 cells were used as a positive control.

Supplemental Figure S1

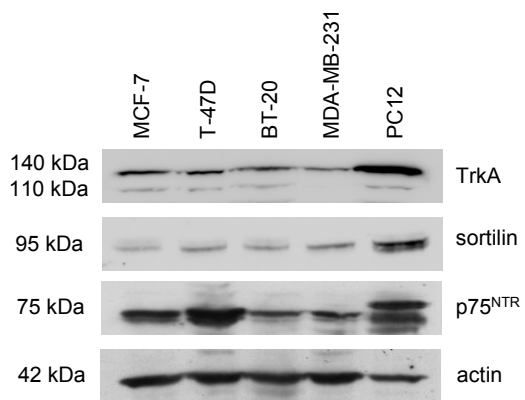
A



B



Supplemental Figure S2



RÉSULTATS

Article 2 : ProNGF pro-invasive effect is dependent of Src activation by EphA2 in breast cancer cells

Dans ce deuxième article, nous démontrons que l'interactome du récepteur TrkA dans les cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 diffère selon le type de ligand, proNGF ou NGF, utilisé. Ainsi, le proNGF permet la formation d'un complexe sortiline/TrkA à l'origine du recrutement du récepteur tyrosine kinase EphA2. Ce complexe ternaire intervient dans l'induction des voies de signalisation et de l'invasion cellulaire, sous l'effet du proNGF. Nous montrons que la phosphorylation de Src est dépendante d'EphA2 alors que TrkA mène à l'activation de la voie PI3-K/Akt.

Cet article est en préparation pour soumission dans la revue :
« The EMBO Journal »

RÉSULTATS

ProNGF pro-invasive effect is dependent of Src activation by EphA2 in breast cancer cells

Corbet Cyril^{1,2,3,¥}, Aubert Léo^{1,2,3,¥}, Magné Nicolas^{4,5}, Hondermarck Hubert^{1,2,3,‡},
Le Bourhis Xuefen^{1,2,3} and Toillon Robert-Alain^{1,2,3,§}

¹ Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France,

² Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France,

³ INSERM U908, 59655 Villeneuve d'Ascq, France,

⁴ ICLOIRE, 42270 Saint Priest en Jarez, France,

⁵ Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, EMR3738 - Equipe 4, Faculté de Médecine
Lyon-Sud, 69000 Lyon, France.

‡ Present address: School of Biomedical Sciences and Pharmacy, University of Newcastle,
Callaghan NSW 2308, Australia,

§ Correspondence: robert.toillon@univ-lille1.fr

¥, the two first authors have equally contributed to this work.

Running title: Sortilin/TrkA/EphA2 lead to proNGF invasion

Keywords: EphA2, invasion, proneurotrophin, sortilin, TrkA

RÉSULTATS

FOOTNOTES

The abbreviations used are: EphA2, Ephrin-type A receptor 2; FBS: Fetal Bovine Serum; HA: Hemagglutinin A; HER-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2; IB: Immunoblot; IP: Immunoprecipitation; NGF: Nerve Growth Factor; p75NTR: p75 Neurotrophin Receptor; TNF: Tumor Necrosis Factor; TrkA: Tropomyosin receptor kinase A.

RÉSULTATS

ABSTRACT

Metastasis is the leading cause of mortality in patients with breast cancer. This multi-step process is under regulation of several growth factors and their receptors which enhance, in particular, invasive capabilities of cancer cells. Among them, Nerve Growth Factor (NGF) and more recently its precursor (proNGF) have been shown to increase breast cancer cell invasion through a signaling mediated by the tyrosine kinase receptor TrkA. In the present study, we have performed a proteomic analysis to decipher signal transduction of proNGF in basal-like MDA-MB-231 breast cancer cells overexpressing a chimeric HA-TrkA receptor. We confirmed that proNGF-stimulated invasion was due to the activation of Akt and Src in the established cellular model. Moreover, proNGF stimulation of breast cancer cells induced a functional interaction between sortilin and TrkA, which in turn recruited another tyrosine kinase receptor EphA2. SiRNA against EphA2 totally abolished the pro-invasive effect of proNGF. Interestingly, by the use of the pharmacological inhibitor K252a or cells expressing a kinase-deficient mutant of TrkA, we demonstrated that proNGF-induced EphA2/TrkA association was independent of TrkA phosphorylation. ProNGF-induced Akt phosphorylation was dependent of TrkA phosphorylation and independent of EphA2, whereas proNGF-induced Src activation was dependent of EphA2 but not TrkA phosphorylation. In contrast, NGF-induced invasion as well as Akt and Src activation implicated only TrkA phosphorylation, but not sortilin nor EphA2. Altogether, our data evidenced that functional interactions between sortilin, TrkA and EphA2 are essential for the pro-invasive effect of proNGF in breast cancer cells. This provides a rationale to consider proNGF as well as the involved signaling pathways as potential therapeutic targets.

RÉSULTATS

INTRODUCTION

Breast cancer development is a multi-step process depending on primary tumor growth but also on the ability of tumor cells to metastasize to distant organs (Weigelt *et al.*, 2005). Mechanisms underlying this progression are frequently regulated by several sets of growth factors and their cognate receptors (Jechlinger *et al.*, 2006 ; Drabsch & ten Dijke, 2011). Consequently, current strategies in the development and application of molecularly targeted therapies for breast cancer are based on the disruption of growth factors and receptor signaling (Alvarez *et al.*, 2010). However, to date, major challenges make difficult the treatment of a large number of patients (Gonzalez-Angulo *et al.*, 2007). In particular, the subtype of basal-like breast cancers, commonly lacking expression of estrogen and progesterone receptors and not overexpressing HER-2, exhibit a more aggressive phenotype and fail to respond to hormonal therapies and HER-2-targeting agents, leaving open the necessity to discover new therapeutic targets (Fornier & Fumoleau, 2012).

Nerve Growth Factor (NGF), the prototypical member of neurotrophin family, has been described to play a role in non-neuronal cells, in particular in several types of cancer cells (Zhu *et al.*, 2002 ; Adriaenssens *et al.*, 2008 ; Warrington & Lewis, 2011). In breast cancer cells, it exerts its biological effects in an autocrine manner (Dolle *et al.*, 2003). It stimulates cell proliferation, invasion and survival through two types of receptors: the tyrosine kinase receptor TrkA and p75^{NTR}, a TNF receptor superfamily member (Descamps *et al.*, 2001 ; Lagadec *et al.*, 2009). More recently, we demonstrated that the expression of NGF precursor (proNGF) is associated with lymph node invasion in breast cancers. In the basal-like MDA-MB-231 cells, proNGF-stimulated invasion involves both TrkA and sortilin, a Vps10p-domain transmembrane receptor and this pro-invasive effect requires both Akt and Src activation (Demont *et al.*, 2012).

Ephrin type-A receptor 2 (EphA2), a 135 kDa tyrosine kinase receptor, has been reported as an important determinant of the oncogenic and invasive capacities of breast cancer cells (Zelinski *et al.*, 2001 ; Brantley-Sieders *et al.*, 2008). Indeed, EphA2 overexpression is associated with a basal-like phenotype and the aggressive behavior of the cells (Zelinski *et al.*, 2001 ; Hochgrafe *et al.*, 2010). Accordingly, Foveau *et al.* (2012) have demonstrated that downregulation of HIC1 (Hypermethylated in cancer 1), a well known tumor suppressor, leads to the overexpression of EphA2 in basal-like breast cancer cells. In normal cells, EphA2 is expressed at the cell surface and binds its ligand ephrin-A1 which

RÉSULTATS

is presented by neighboring cells. The ligand/receptor interaction contributes to the tissue homeostasis (Pasquale, 2008). In cancer cells, EphA2 signaling may be defective (Vaught *et al.*, 2008). Indeed, ephrin-A1-independent activation of EphA2 favors cell invasion and metastasis by MAP-kinase, RhoGTPase and Src activation (Fang *et al.*, 2008 ; Miao *et al.*, 2009 ; Hiramoto-Yamaki *et al.*, 2010). Although the ligand-independent activation of EphA2 is not fully understood, it has been described that EphA2 is frequently transactivated by other tyrosine kinase receptors like HER-2 (Brantley-Sieders *et al.*, 2008 ; Zhuang *et al.*, 2010).

In this study, we depicted the mechanism of action of the pro-invasive effect of proNGF in breast cancer cells by functional proteomics approaches, and we showed that sortilin and TrkA cooperated with EphA2 to induce invasion under proNGF stimulation.

RESULTS

Identification of EphA2 in proNGF-induced TrkA interactome

In order to decipher signaling pathways involved in proNGF-stimulated breast cancer cell invasion, we first established HA-tagged TrkA overexpressing MDA-MB-231 cells. We confirmed that TrkA overexpression was able by itself to increase breast cancer cell invasion as previously described (Lagadec *et al.*, 2009). Moreover, TrkA-overexpressing cells were still responsive to proNGF stimulation (Figure 1). Furthermore, analyses of signaling components showed that proNGF response was dependent of TrkA phosphorylation, PI3-kinase/Akt and Src pathways as previously reported in native cells (Demont *et al.*, 2012) (Supplemental data, Figure S1). A proteomic study was then performed by immunoprecipitation of HA-TrkA with an anti-HA antibody, followed by a mass spectrometry analysis (Table I). As expected, TrkA was undoubtedly identified by MS and MS/MS analyses with 12 different peptides sequenced. Seventeen exclusive proteins showing a differential expression between proNGF and NGF stimulation were identified after 5 or 30 min of proNGF treatment. We showed that sortilin, which is involved in proNGF response (Demont *et al.*, 2012), was identified after 5 min of proNGF. We also identified several proteins implicated in cell migration/invasion. Among them, EphA2 receptor is of particular interest, as it is known to be overexpressed in basal-like breast cancer subtypes and it favors breast cancer cell invasion and metastases formation (Zelinski *et al.*, 2001). Moreover, we identified Src, cortactin and p130 Cas (BCAR1) which are early effectors of EphA2 (Faoro *et al.*, 2010). Proteins such as SHEP1 (SH2D3C), PTP-PEST (PTPN12) and RIL (PDLI4) were also found to be pulled down with TrkA. These proteins are well known to regulate Src and/or p130 Cas-mediated signaling pathways (Chellaiah & Schaller, 2009 ; Zhang *et al.*, 2009 ; Roselli *et al.*, 2010). The other identified proteins (Lasp1, SNAP23, FHL2, HAX1, adducin, MARCKS, gelsolin and integrins $\alpha_3\beta_1$) are downstream targets of Src and p130 Cas, which are associated with cytoskeleton remodeling and cell migration (Matsuoka *et al.*, 2000 ; Grunewald *et al.*, 2006 ; Fadeel & Grzybowska, 2009 ; Kean *et al.*, 2009 ; Mitchell *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2010).

RÉSULTATS

EphA2 is implicated in proNGF-induced invasion by functional interaction with sortilin/TrkA complex

Given the role of EphA2 in basal-like breast cancer cell invasion, we then tried to confirm the potential complex formation between TrkA, sortilin and EphA2 by immunoprecipitation and western blot analysis. Immunoprecipitations were conducted using antibodies against HA, sortilin and EphA2 (Figure 2A, B and C, respectively). In absence of treatment, no complex was observed between these three receptors. Upon proNGF treatment, sortilin and EphA2 were co-immunoprecipitated with TrkA (Figure 2A). These results were confirmed by reverse immunoprecipitation of sortilin (Figure 2B) and EphA2 (Figure 2C). In presence of NGF, sortilin binding to TrkA was only detected after 30 min of treatment (Figure 2A) but EphA2 binding was not observed neither after 5 min nor 30 min of treatment. These results were confirmed by reverse immunoprecipitation of sortilin (Figure 2B) and EphA2 (Figure 2C). Thus, NGF treatment seemed to induce late TrkA/sortilin association but not EphA2 binding. These data suggest that, in presence of NGF, sortilin would act as an endocytic receptor as previously described (Vaegter *et al.*, 2011).

Implication of EphA2 in proNGF pro-invasive effect was then assessed by Boyden chamber assay. As shown in Figure 2D, proNGF-induced MDA-MB-231 cell invasion was completely abolished by siRNA against TrkA or neurotensin treatment as previously described (Demont *et al.*, 2012). EphA2 invalidation by siEphA2 transfection also abolished the proNGF pro-invasive effect. In contrast, NGF-induced cell invasion was only affected by TrkA silencing but not by neurotensin treatment. Moreover, the use of siEphA2 did not affect the NGF-induced invasion. Altogether, these results indicated that proNGF could act through an original receptor complex involving sortilin, TrkA and EphA2 while NGF effect would be only mediated by TrkA.

We then analyzed the impact of a sequential invalidation of each receptor in the formation of this receptor signaling complex. TrkA expression was first silenced by siRNA (Figure 3A). TrkA and EphA2 were co-immunoprecipitated with sortilin upon 5 min of proNGF treatment. On the contrary, siTrkA-treated cells did not exhibit TrkA and EphA2 association with sortilin, indicating that sortilin did not form a complex with EphA2 in absence of TrkA. Interestingly, in cells stably expressing kinase-dead TrkA where TrkA phosphorylation was abolished (Figure 3B), proNGF still induced TrkA association with sortilin and EphA2. These results indicated that TrkA phosphorylation was not necessary

RÉSULTATS

for the formation of TrkA/sortilin/EphA2 complex. The implication of sortilin in the former complex was then assessed by the use of neurotensin which inhibits, by competition, proNGF binding to sortilin (Figure 3C). In presence of neurotensin, TrkA did not pull down neither sortilin nor EphA2. Thus, the proNGF binding to sortilin seemed to be necessary for the formation of TrkA/sortilin/EphA2 complex. Finally, EphA2 implication in the receptor complex association was investigated by using EphA2 siRNA (Figure 3D). Transient silencing of EphA2 completely abolished expression of this protein and consequently no binding of EphA2 to TrkA was observed. Nevertheless, in absence of EphA2, proNGF still induced association between TrkA and sortilin. Thus, TrkA was associated to sortilin under proNGF treatment independently of EphA2.

Altogether, our results underlined that 1) TrkA, sortilin and EphA2 did not form a pre-existing complex; 2) TrkA/EphA2 complex needed, as a prerequisite, the proNGF/sortilin association; 3) TrkA was necessary for the formation of this receptor complex, independently of its phosphorylation status; 4) The inhibition of EphA2 did not alter TrkA/sortilin complex. These findings suggested that proNGF induced sortilin/TrkA association and this former complex then recruited EphA2.

TrkA and EphA2 are differentially implicated in proNGF-induced Akt and Src activation

We previously showed that sortilin is indispensable for the binding of proNGF in MDA-MB-231 cells (Demont *et al.*, 2012). Moreover, both Akt and Src are involved in the pro-invasive effect of proNGF. To decipher the role of TrkA and EphA2 in Akt and Src activation, we treated cells with TrkA inhibitor (K252a), siRNA anti-EphA2, LY294002 (PI3-K inhibitor) or SKI-1 (Src inhibitor). As shown in Figure 4A, proNGF activated both Akt and Src. Inhibition of TrkA phosphorylation by the use of K252a abolished Akt activation but not Src activation. Similar results were obtained by the use of a kinase-dead mutant of TrkA (Figure 4B). This indicated that Akt activation, but not Src activation, was dependent of TrkA phosphorylation. Inhibition of Akt activation with LY294002 did not modify Src phosphorylation. Similarly, inhibition of Src with SKI-1 did not affect Akt phosphorylation. So, proNGF-activated Akt and Src were independent pathways. We then determined the involvement of EphA2 in Akt and Src activation by transient transfection of cells with siEphA2 (Figure 4C). EphA2 down-regulation decreased Src but not Akt phosphorylation induced by proNGF. Collectively, we showed that proNGF activated Akt

RÉSULTATS

through TrkA phosphorylation while it activated Src by EphA2, independently of TrkA phosphorylation.

The effects of NGF were measured in parallel for the comparison (Figure 4D, E and F). NGF increased both Akt and Src phosphorylation, and K252a reversed this activation (Figure 4D). This result was confirmed by the use of a kinase-dead mutant of TrkA (Figure 4E). Src and Akt activations by NGF were not interconnected, like for proNGF (Figure 4D). Contrary to proNGF, NGF effects on Src and Akt were independent of EphA2 (Figure 4F). Silencing of EphA2 only reduced the basal activation of phospho-Akt and phospho-Src, but not the phosphorylation induced by NGF. Indeed, NGF was still able to increase Akt and Src phosphorylation even in EphA2-silenced cells. These results indicated that Akt and Src activations were downstream TrkA in presence of NGF.

Altogether, our data demonstrated that proNGF engaged both TrkA and EphA2 to transduce signaling while NGF signaling was exclusive to TrkA. Moreover, proNGF-induced Src activation required both TrkA and EphA2, but was independent of TrkA phosphorylation. In contrast, proNGF-induced Akt activation was dependent of TrkA phosphorylation but not EphA2. On the contrary, NGF-induced Akt and Src activation needed TrkA and its phosphorylation while EphA2 was not involved in these pathways.

DISCUSSION

During the last decade, compelling data have demonstrated that proNGF is more than just a metabolic precursor of NGF, as it exhibits biological activity by binding simultaneously to sortilin, *via* its pro-domain, and p75^{NTR}, with its mature domain (Feng *et al.*, 2010 ; Teng *et al.*, 2010). This ternary complex is implicated in the induction of neuronal apoptosis (Nykjaer *et al.*, 2004). However, several studies have also reported that proNGF may activate TrkA and its downstream signaling Erk1/2 without requiring a processing into mature NGF (Clewes *et al.*, 2008 ; Masoudi *et al.*, 2009) whereas a controversial study reported that TrkA activation needs intracellular cleavage of proNGF by furin (Boutillier *et al.*, 2008). Nevertheless, none cellular response was clearly associated to proNGF/TrkA axis in these studies. Recently, we described that proNGF induces breast cancer cell invasion through TrkA activation (Demont *et al.*, 2012). Here, we demonstrated, for the first time, that the pro-invasive effect of proNGF was mediated through a functional interaction between sortilin and TrkA. Indeed, proNGF first bound to sortilin which in turn recruited TrkA. In agreement with our findings, it has been reported that the extracellular

RÉSULTATS

domains of sortilin and TrkA can interact (Vaegter *et al.*, 2011) and that proNGF is co-immunoprecipitated with TrkA (Fahnestock *et al.*, 2004). Nevertheless, structural studies are needed to determine molecular insights of this complex. Interestingly, proNGF/sortilin/TrkA association induced TrkA phosphorylation and subsequent Akt activation, but also a TrkA phosphorylation-independent pathway involving EphA2 recruitment and Src activation (Figure 5A). These pathways are actually specific for proNGF signaling, since NGF induced Akt and Src activation, dependently of TrkA phosphorylation, but without requiring either sortilin or EphA2 (Figure 5B). Altogether, our results strengthened the fact that proNGF did not actually mimic NGF and that proNGF could induce breast cancer cell invasion by activating specific signaling pathways.

The discovery of EphA2 implication in proNGF signaling is of particular interest, as EphA2 is known to cooperate with other RTK such as EGFR or HER-2 (Larsen *et al.*, 2007 ; Brantley-Sieders *et al.*, 2008). This ligand-independent signaling is associated to an enhancement of metastatic growth, in particular by increasing invasive capabilities of cancer cells (Miao *et al.*, 2009 ; Hiramoto-Yamaki *et al.*, 2010). However, in these studies, EphA2 transactivation involves Akt and phosphorylation of serine 897 in the intracellular domain of EphA2 (Miao *et al.*, 2009). In our study, the question of EphA2 activation is unsolved but it seems that a different mechanism is required. Indeed, Akt was not necessary for EphA2-activated Src. Using proteomic analysis, we revealed that several Src-associated signaling proteins like cortactin and p130 Cas were pulled-down with TrkA upon proNGF treatment, suggesting that proNGF could activate signaling cascade involving Src/p130 Cas/cortactin complex. This complex is well known to induce cell invasion, in particular in the formation of specific membrane protrusions, called invadopodia, allowing cell migration and extracellular matrix degradation (Guarino, 2010 ; Murphy & Courtneidge, 2011). Moreover, upon EGF stimulation, EphA2 is described to be transactivated and then to be co-localized in cortactin-rich protrusions at the leading edge of migrating cells (Hiramoto-Yamaki *et al.*, 2010). Therefore, EphA2 could be the link between TrkA and Src/p130 Cas/cortactin signaling complex leading to invadopodia formation and by the way it would act as a scaffold protein as suggested by Pasquale (2008).

Numerous studies raise the impact of EphA2 in cancer cell behaviors and the interest of targeting EphA2 in cancer treatment (reviewed by Tandon *et al.*, 2011). For instance, Brantley-Sieders *et al.* (2011) have demonstrated that EphA2 expression in absence of ephrin-A1 is correlated to an increase of metastasis. Furthermore,

RÉSULTATS

EphA2-mediated resistance to trastuzumab in breast cancer cells is due to Src activation (Zhuang *et al.*, 2010). Co-activation of tyrosine kinase receptors has been described to induce resistance to targeted therapies in several cancers including glioblastoma, breast and lung carcinomas (Stommel *et al.*, 2007 ; Xu & Huang, 2010 ; Yamada *et al.*, 2010). Consequently, co-administration of lestaurtinib (CEP-701; inhibitor of TrkA) and pertuzumab (Omnitarg; inhibitor of HER-2) has a synergistic effect on inhibition of prostate tumor cell growth in a preclinical mouse model (Festuccia *et al.*, 2009). It should be interesting to evaluate the anti-tumor efficacy of combined treatment targeting both TrkA and EphA2 in basal-like breast cancers.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. MDA-MB-231 breast cancer cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in Minimal Essential Medium (MEM) (Invitrogen Corporation, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% inactivated FBS (Fetal Bovine Serum) (Lonza, Levallois-Perret, France), 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 40 UI/ml penicillin, 40 µg/ml streptomycin and 50 µg/ml gentamycin, at 37°C in 5% CO₂ - humidified atmosphere.

Before treatment, cells were rinsed twice, left for 24 h in culture medium with 0.1% FBS and then treated with 0.5 nM recombinant human non cleavable proNGF (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) or 16 nM recombinant human beta-NGF (Scil Proteins, Halle, Germany) at times indicated, with or without a pre-incubation for 1 h with specific pharmacological inhibitors K252a (10 nM), LY294002 (15 µM), Src Kinase Inhibitor-1 (SKI-1; 50 nM) (Calbiochem, Nottingham, UK). Neurotensin (1 µM) used for cell treatment was from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). **cDNA constructs and transfection.** The HA-TrkA expression vector (pDisplay-TrkA) was prepared by inserting TrkA cDNA from MDA-MB-231 cells (TrkA variant 1: NM_001012331.1) into the pDisplay vector (Invitrogen) between the restriction enzyme sites SfiI and SacII. Mutated HA-TrkA constructs were generated by replacing tyrosine residue into phenylalanine with the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent technologies, Massy, France) and the following primers:

Tyr490-forward: CGA-GAA-CCC-ACA-ATT-CTT-CAG-TGA-TGC-CTG

Tyr490-reverse: CAG-GCA-TCA-CTG-AAG-AAT-TGT-GGG-TTC-TCG

RÉSULTATS

Tyr670/674/675-forward: GAT-ATC-TTC-AGC-ACC-GAC-TTT-TTC-CGT-GTG-GGA-GGC-CG

Tyr670/674/675-reverse: CGG-CCT-CCC-ACA-CGG-AAA-AAG-TCG-GTG-CTG-AAG-ATA-TC

Cell transfections were done using the Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza) according to the manufacturer's instructions. Cells were selected with 1 mg/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 TrkA was not modified with passages *in vitro* or after as revealed by western blot analysis.

The siRNA sequences used (2 µg for each transfection) were against EphA2 (Invitrogen): GCAAGGAAGUGGUACUGCUGGACUU, compared to control (siGFP) GAUGAACUUCAGGGUCAGCTT. For TrkA, a pool of 3 siRNA sequences (Eurogentec, Angers, France) was used: GAACCUGACUGAGCUCUAC, UGGAGUCUCUCUCCUGGAA and GCUGCAGUGUCAUGGGCAA.

Cell extracts. Subconfluent breast cancer cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed and kept on ice 15 min in a buffer containing 40 mM HEPES pH 7.5, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% glycerol, 10 mM sodium pyrophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1.5 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Cells were then harvested with a rubber scraper, the lysates cleared by centrifugation (6000 x g, 10 min, 4°C), and the supernatants were collected. Protein concentration was determined using the BCA assay (Sigma-Aldrich) and samples were stored at -80°C until analysis.

Immunoprecipitation and western-blotting. For immunoprecipitation studies, cell lysates (1 mg) were pre-cleared with isotypic antibody (5 µg) and protein-G agarose beads (100 µl, 50% slurry in PBS) for 1 h at 4°C on an end-to-end roller (10 rpm). Cell lysates were then incubated (2 h, 4°C, 10 rpm) with primary antibodies (5 µg) and the resulting immune complexes were precipitated with protein-G agarose beads (100 µl, 50% slurry in PBS ; 2 h, 4°C, 10 rpm) and eluted in Laemmli 2X buffer (80 µl, 7 min, 95°C). For all the experiments, protein-G agarose beads were from Millipore (Saint Quentin en Yvelines, France) and isotypic antibodies from R&D Systems (Lille, France).

Whole cell lysates or immunoprecipitated proteins were then separated by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto PVDF membranes (Immobilon, Millipore).

RÉSULTATS

The membranes were blocked with 3% skimmed milk (anti-TrkA), 0.2% casein (anti-sortilin) or 5% bovine serum albumin (all other antibodies) in TBS-0.1% Tween 20 and subsequently immunoblotted with primary antibody for overnight incubation at 4°C. The membranes were probed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, Asnières, France) and reactive proteins were detected using SuperSignal West Pico Substrate (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Chemiluminescence was detected with Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Limited, Aulnay-sous-Bois, France) or with a Fuji LAS-4000 luminescent image analyzer using exposure times at subsaturation levels. The immunoblots were quantified using Fujifilm Multi Gauge software. The antibodies used in this study are: anti-EphA2 (clone 1E3, Abnova, Interchim, Montluçon, France), anti-sortilin (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), anti-TrkA (sc-118, Santa Cruz Biotechnologies, Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France), anti-actin (A2066, Sigma-Aldrich), anti-phosphotyrosine (clone PY20, Millipore), anti-HA (Covance, Eurogentec, Angers, France), anti-phospho-Akt (Ser-473), anti-pan-Akt, anti-phospho-Src (Tyr-416) and anti-Src (Cell Signaling Technologies, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) for western-blot analysis and anti-HA (12CA5, Roche), anti-sortilin (BAF2934, R&D Systems) and anti-EphA2 (clone C-20, Santa Cruz Biotechnologies) for immunoprecipitation.

***In vitro* invasion assay.** Cells were rinsed twice and left for 24 h in culture medium with 0.1% FBS. Invasion assays were done in 12-well Boyden microchambers (BD Biosciences) with 8 µm pore size membranes. The Transwells were first coated with 100 µl of culture medium with 0.1% FBS plus 40 µg of rat tail collagen I (Millipore) for 1 h at 37°C in 5% CO₂. 100,000 cells in 400 µl culture medium with 0.1% FBS were loaded in the upper chamber whereas 1.6 ml culture medium with 0.1% FBS was placed in the lower chamber. Cells were treated with human cleavage-resistant proNGF (0.5 nM) or human β-NGF (16 nM) and incubated for 20 h, with or without a pre-incubation with specific inhibitors. Cells were then fixed in frozen methanol for 10 min. The membranes were rinsed twice with PBS and the upper surfaces of the membranes were scrapped to remove cells. The cells remaining on the down side of the membranes were Hoechst-stained (1 mM; 30 min) and mounted on glass slides with glycerol before counting (5 fields per membrane) through a fluorescence microscope (objective 40X, λ_{excitation}: 345 nm, λ_{emission}: 478 nm, microscope Eclipse Ti; Nikon, Champigny sur Marne, France). Data are reported as mean ± S.D. of three experiments done in triplicate. Statistics

RÉSULTATS

were performed with one-way ANOVA test and Bonferroni's post-test ($p < 0.001$) by using GraphPad Prism 5.01 software.

In gel digestion of proteins for LC-MS/MS analysis. Gel pieces, previously colloidal Coomassie blue-stained, were washed in water, 50% acetonitrile/water and 100% acetonitrile. All washes were 0.1 ml for 20 min per gel band, at 20°C, performed on a Vibrax shaking platform. The proteins were "in gel" reduced with 100 μ l of 10 mM DTT/0.1 M NH_4HCO_3 per gel band on a hot block at 56°C for 1 h, and then alkylated with 100 μ l of 55 mM iodoacetamide/0.1 M NH_4HCO_3 for 45 min at 20°C in darkness. The gel pieces were then washed with 25 mM NH_4HCO_3 and 100% acetonitrile. Once colourless, the gel pieces were dried by Speed-Vac. The gel pieces were then swelled in 25 mM NH_4HCO_3 containing 12.5 μ g/ml of trypsin and shaken at 37°C overnight.

Nano-LC-MS/MS Q-Star analysis. For peptidic digests extracted from the 1-D gel band, nanoLC-nanoESI-MS/MS analyses were performed on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-Star, Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) equipped with a nano-electrospray ion source coupled with a nano high pressure liquid chromatography system (LC Packings Dionex, Voisins Le Bretonneux, France). Peptidic samples resuspended in 5 μ l $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}-95/5-0.1\%$ HCOOH were injected into the mass spectrometer using the Famos auto-sampler (LC Packings Dionex). Samples were desalted and concentrated on a reversed-phase precolumn of 0.3 mm i.d. x 5 mm (Dionex) by solvent A ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}-95/5-0.1\%$ HCOOH) delivered by the Switchos pumping device (LC Packings Dionex) at a flow rate of 10 μ l/min for 3 min. Peptides were separated on a 75 μ m i.d. x 15 cm C18 Pepmap column (Dionex). The flow rate was set at 200 nl/min. Peptides were eluted using a 0% to 35% linear gradient of solvent B ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}-25/75-0.1\%$ HCOOH) in 80 min then a 35% to 100% linear gradient of solvent B in 10 min and finally 100% of solvent B was maintained for 5 min. Coated electrospray needles were obtained from New Objective. The spray voltage was 1.8 kV. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode. Data acquisition was performed in a data-dependent mode consisting of, alternatively, a full-scan MS over the range m/z 300-2000, and a full-scan MS/MS of the ion selected over the range m/z 50-2000 in an exclusion dynamic mode (the most intense ion is selected and excluded for further selection for a duration of 30 sec). MS/MS data were acquired using a mass tolerance of 50 mmu and the collision energy was automatically fixed by the device. For the automated database search of fragment ion spectra, the Analyst QS software and Mascot dll script were used and final

RÉSULTATS

database searching was performed using Mascot software with the Swiss-Prot 50.8 database (366,226 sequences and 132,054,165 residues). Carbamidomethylation (cysteine), oxidation (histidine, tryptophane and methionine) and phosphorylation (serine, threonine and tyrosine) were determined as variable modifications. The peptide mass tolerance was set at 50 ppm and 50 mmu for the fragment mass. One trypsin-missed cleavage was allowed.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the “Ligue Nationale Contre le Cancer” (Equipe labellisée 2009 and the Comité du Nord), the GEFLUC “Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer”, comité de Lille, the INSERM, the French Ministry for Research and Education, the “Génopole de Lille”. The Mass Spectrometry facility was funded by the European Community (FEDER), the Region Nord-Pas de Calais (France), the CNRS, and the University Lille 1. We also thank Nathalie Ziental for her excellent technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTION

CC, AL contributed to experimental design, data acquisition, interpretation, manuscript drafting and critical reading.

MN, HH, LBX contributed to data interpretation, revising manuscript, critical reading and funding rise.

TRA contributed to conception, experimental design, data acquisition and interpretation, manuscript drafting, critical reading and funding rise.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

RÉSULTATS

FIGURE LEGENDS

Figure 1: ProNGF stimulated invasion of MDA-MB-231 cells overexpressing HA-TrkA. Invasion assay was performed on native MDA-MB-231 cells (MOCK) and MDA-MB-231 cells stably overexpressing a HA-tagged TrkA receptor (TrkA +), treated or not with 0.5 nM recombinant human non cleavable proNGF (N.C. proNGF). Untreated MOCK cells represented the control and determined 100% of invasion (white bar). For the statistics, error bars represent S.D. * $p < 0.001$ for proNGF stimulation *versus* no stimulation; § $p < 0.001$ for experimental *versus* control under proNGF stimulation; ¶ $p < 0.001$ for experimental *versus* control without any stimulation.

Figure 2: ProNGF induced TrkA association with sortilin and EphA2. A, B and C. HA-TrkA MDA-MB-231 cells were treated with 0.5 nM N.C. proNGF or 16 nM NGF (5 and 30 min). Sortilin, EphA2 and HA-TrkA were immunoblotted in crude lysates and eluates of immunoprecipitations anti-HA (A), anti-sortilin (B) and anti-EphA2 (C). D. ProNGF pro-invasive effect was dependent of EphA2. Invasion assay was performed on HA-TrkA MDA-MB-231 cells transfected with the siRNA against TrkA (siTrkA), EphA2 (siEphA2) or control siRNA (siCTRL), or treated with 1 μ M neurotensin. Cells were treated or not with 0.5 nM N.C. proNGF or 16 nM NGF. Untreated siGFP-transfected cells represented the control and determined 100% of invasion (white bar). For the statistics, error bars represent SD. * $p < 0.001$ for proNGF or NGF stimulation *versus* no stimulation; § $p < 0.001$ for experimental *versus* control under proNGF stimulation. siRNA efficiency was assessed by Western-blotting.

Figure 3: Functional association of sortilin/TrkA/EphA2 under proNGF stimulation. A. Sortilin interacted with EphA2 *via* TrkA. HA-TrkA MDA-MB-231 cells were transfected with siTrkA and then treated with N.C. proNGF. Sortilin was immunoprecipitated and EphA2 and HA-TrkA were immunoblotted. B. TrkA phosphorylation was not necessary for the interaction with sortilin and EphA2. MDA-MB-231 cells overexpressing HA-TrkA or kinase-dead HA-TrkA were treated with N.C. proNGF. Sortilin and EphA2 recruitment was determined after immunoprecipitation anti-HA. Mutagenesis efficiency was checked with anti-phospho-tyrosine antibody. C. ProNGF binding on sortilin was necessary for TrkA association with sortilin and EphA2. HA-TrkA MDA-MB-231 cells were treated

RÉSULTATS

with N.C. proNGF in presence or not of 1 μ M neurotensin. HA-TrkA was immunoprecipitated with anti-HA antibody and sortilin and EphA2 were immunoblotted. D. EphA2 was not required for sortilin/TrkA association. HA-TrkA MDA-MB-231 cells were transfected with siEphA2 and then treated with N.C. proNGF (30 min). Sortilin and EphA2 recruitment was determined after immunoprecipitation anti-HA.

Figure 4: ProNGF activated Akt and Src through TrkA and EphA2, respectively. A and D. HA-TrkA MDA-MB-231 cells were treated with N.C. proNGF (A) or NGF (D) (30 min) in presence or not of 10 nM K252a, 15 μ M LY294002 and 50 nM SKI-1. Phosphorylation of Akt and Src was determined by using phospho-specific antibodies. Equiloading was checked with Akt and Src antibodies. B and E. MDA-MB-231 cells overexpressing HA-TrkA and kinase-dead HA-TrkA were treated with N.C. proNGF (B) or NGF (E) (5 and 30 min). Phosphorylation of Akt and Src was assessed by Western-blot. C and F. Akt and Src phosphorylation was determined in crude lysates from MDA-MB-231 cells transfected with siEphA2 and treated 30 min with N.C. proNGF (C) or NGF (F).

Figure 5: Schematic representation of proNGF and NGF signaling leading to breast cancer cell invasion. A. ProNGF induced sortilin/TrkA association and this former complex then recruited EphA2. The downstream activation of Src required both TrkA and EphA2, but was independent of TrkA phosphorylation whereas Akt activation required only TrkA and its phosphorylation. B. NGF bound only to TrkA, leading to its phosphorylation and subsequent Src and Akt activations.

Table I: Identification of several putative TrkA-interacting proteins under proNGF stimulation. HA-TrkA MDA-MB-231 cells were treated or not with N.C. proNGF (0.5 nM) and NGF (16 nM) for 5 and 30 minutes. HA-TrkA was immunoprecipitated from cell lysates (10 mg) with an anti-HA antibody. Bound proteins were separated by SDS-PAGE. Samples were prepared and analyzed by mass spectrometry as described in Materials and Methods. In the table, are listed TrkA and the 17 exclusive proteins co-immunoprecipitated with HA-TrkA under proNGF stimulation. Other information are summarized such as Uniprot ID, the number and the sequence of the different peptides allowing the protein identification, with the observed and theoretical m/z ratios, the delta mass, the expected value and the Mascot score. Underlined amino-acids (C and M) are oxidized residues.

RÉSULTATS

Figure S1: ProNGF induced invasion of HA-TrkA MDA-MB-231 cells through TrkA, Src and Akt activation. Invasion assay was performed on HA-TrkA MDA-MB-231 cells, treated with specific pharmacological inhibitors K252a, LY294002 and SKI-1 in presence of 0.5 nM recombinant human non cleavable proNGF (N.C. proNGF). Breast cancer cells stably overexpressing mutated forms of TrkA (Y490F and kinase-dead) were also used in these assays. Untreated cells represented the control and determined 100% of invasion (white bar). For the statistics, error bars represent S.D. * $p < 0.001$ for proNGF stimulation *versus* no stimulation; § $p < 0.001$ for experimental *versus* control under proNGF stimulation. siRNA efficiency was assessed by Western-blotting.

RÉSULTATS

REFERENCES

- Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, Mougél A, Page A, Romon R et al.** (2008). Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* **68**: 346-351.
- Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN.** (2010). Emerging targeted therapies for breast cancer. *J Clin Oncol* **28**: 3366-3379.
- Boutillier J, Ceni C, Pagdala PC, Forgie A, Neet KE, Barker PA.** (2008). Proneurotrophins require endocytosis and intracellular proteolysis to induce TrkA activation. *J Biol Chem* **283**: 12709-12716.
- Brantley-Sieders DM, Zhuang G, Hicks D, Fang WB, Hwang Y, Cates JM et al.** (2008). The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *J Clin Invest* **118**: 64-78.
- Brantley-Sieders DM, Jiang A, Sarma K, Badu-Nkansah A, Walter DL, Shyr Y et al.** (2011). Eph/ephrin profiling in human breast cancer reveals significant associations between expression level and clinical outcome. *PLoS One* **6**: e24426.
- Chellaiah MA, Schaller MD.** (2009). Activation of Src kinase by protein-tyrosine phosphatase-PEST in osteoclasts: comparative analysis of the effects of bisphosphonate and protein-tyrosine phosphatase inhibitor on Src activation in vitro. *J Cell Physiol* **220**: 382-393.
- Clewes O, Fahey MS, Tyler SJ, Watson JJ, Seok H, Catania C et al.** (2008). Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin. *J Neurochem* **107**: 1124-1135.
- Demont Y, Corbet C, Page A, Ataman-Onal Y, Choquet-Kastylevsky G, Fliniaux I et al.** (2012). Pro-nerve Growth Factor Induces Autocrine Stimulation of Breast Cancer Cell Invasion through Tropomyosin-related Kinase A (TrkA) and Sortilin Protein. *J Biol Chem* **287**: 1923-1931.
- Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V et al.** (2001). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* **276**: 17864-17870.
- Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V, Hondermarck H.** (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* **22**: 5592-5601.
- Drabsch Y, ten Dijke P.** (2011). TGF-beta signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**: 97-108.

RÉSULTATS

Fadeel B, Grzybowska E. (2009). HAX-1: a multifunctional protein with emerging roles in human disease. *Biochim Biophys Acta* **1790**: 1139-1148.

Fahnestock M, Yu G, Michalski B, Mathew S, Colquhoun A, Ross GM et al. (2004). The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *J Neurochem* **89**: 581-592.

Fang WB, Ireton RC, Zhuang G, Takahashi T, Reynolds A, Chen J. (2008). Overexpression of EPHA2 receptor destabilizes adherens junctions via a RhoA-dependent mechanism. *J Cell Sci* **121**: 358-368.

Faoro L, Singleton PA, Cervantes GM, Lennon FE, Choong NW, Kanteti R et al. (2010). EphA2 mutation in lung squamous cell carcinoma promotes increased cell survival, cell invasion, focal adhesions, and mammalian target of rapamycin activation. *J Biol Chem* **285**: 18575-18585.

Feng D, Kim T, Ozkan E, Light M, Torkin R, Teng KK et al. (2010). Molecular and structural insight into proNGF engagement of p75NTR and sortilin. *J Mol Biol* **396**: 967-984.

Festuccia C, Gravina GL, Muzi P, Millimaggi D, Dolo V, Vicentini C et al. (2009). Her2 crosstalks with TrkA in a subset of prostate cancer cells: rationale for a guided dual treatment. *Prostate* **69**: 337-345.

Fornier M, Fumoleau P. (2012). The paradox of triple negative breast cancer: novel approaches to treatment. *Breast J* **18**: 41-51.

Foveau B, Boulay G, Pinte S, Van Rechem C, Rood BR, Leprince D. (2012). Receptor Tyrosine Kinase EphA2 Is a Direct Target-Gene of Hic1 (Hypermethylated in Cancer 1). *J Biol Chem*.

Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. (2007). Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* **608**: 1-22.

Grunewald TG, Kammerer U, Schulze E, Schindler D, Honig A, Zimmer M et al. (2006). Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells. *Exp Cell Res* **312**: 974-982.

Guarino M. (2010). Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* **223**: 14-26.

Hiramoto-Yamaki N, Takeuchi S, Ueda S, Harada K, Fujimoto S, Negishi M et al. (2010). Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism. *J Cell Biol* **190**: 461-477.

Hochgrafe F, Zhang L, O'Toole SA, Browne BC, Pinese M, Porta Cubas A et al. (2010). Tyrosine phosphorylation profiling reveals the signaling network characteristics of Basal breast cancer cells. *Cancer Res* **70**: 9391-9401.

RÉSULTATS

Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P et al. (2006). Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* **116**: 1561-1570.

Kean MJ, Williams KC, Skalski M, Myers D, Burtnik A, Foster D et al. (2009). VAMP3, syntaxin-13 and SNAP23 are involved in secretion of matrix metalloproteinases, degradation of the extracellular matrix and cell invasion. *J Cell Sci* **122**: 4089-4098.

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.

Larsen AB, Pedersen MW, Stockhausen MT, Grandal MV, van Deurs B, Poulsen HS. (2007). Activation of the EGFR gene target EphA2 inhibits epidermal growth factor-induced cancer cell motility. *Mol Cancer Res* **5**: 283-293.

Masoudi R, Ioannou MS, Coughlin MD, Pagadala P, Neet KE, Clewes O et al. (2009). Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors. *J Biol Chem* **284**: 18424-18433.

Matsuoka Y, Li X, Bennett V. (2000). Adducin: structure, function and regulation. *Cell Mol Life Sci* **57**: 884-895.

Miao H, Li DQ, Mukherjee A, Guo H, Petty A, Cutter J et al. (2009). EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer Cell* **16**: 9-20.

Mitchell K, Svenson KB, Longmate WM, Gkirtzimanaki K, Sadej R, Wang X et al. (2010). Suppression of integrin alpha3beta1 in breast cancer cells reduces cyclooxygenase-2 gene expression and inhibits tumorigenesis, invasion, and cross-talk to endothelial cells. *Cancer Res* **70**: 6359-6367.

Murphy DA, Courtneidge SA. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 413-426.

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.

Pasquale EB. (2008). Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* **133**: 38-52.

Roselli S, Wallez Y, Wang L, Vervoort V, Pasquale EB. (2010). The SH2 domain protein Shep1 regulates the in vivo signaling function of the scaffolding protein Cas. *Cell Signal* **22**: 1745-1752.

Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R et al. (2007). Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* **318**: 287-290.

RÉSULTATS

Tandon M, Vemula SV, Mittal SK. (2011). Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* **15**: 31-51.

Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL. (2010). Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev Neurobiol* **70**: 350-359.

Vaegter CB, Jansen P, Fjorback AW, Glerup S, Skeldal S, Kjolby M et al. (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat Neurosci* **14**: 54-61.

Vaught D, Brantley-Sieders DM, Chen J. (2008). Eph receptors in breast cancer: roles in tumor promotion and tumor suppression. *Breast Cancer Res* **10**: 217.

Warrington RJ, Lewis KE. (2011). Natural antibodies against nerve growth factor inhibit in vitro prostate cancer cell metastasis. *Cancer Immunol Immunother* **60**: 187-195.

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* **5**: 591-602.

Xu AM, Huang PH. (2010). Receptor tyrosine kinase coactivation networks in cancer. *Cancer Res* **70**: 3857-3860.

Yamada T, Matsumoto K, Wang W, Li Q, Nishioka Y, Sekido Y et al. (2010). Hepatocyte growth factor reduces susceptibility to an irreversible epidermal growth factor receptor inhibitor in EGFR-T790M mutant lung cancer. *Clin Cancer Res* **16**: 174-183.

Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, Irizarry AR, Kinch MS. (2001). EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res* **61**: 2301-2306.

Zhang W, Jiang B, Guo Z, Sardet C, Zou B, Lam CS et al. (2010). Four-and-a-half LIM protein 2 promotes invasive potential and epithelial-mesenchymal transition in colon cancer. *Carcinogenesis* **31**: 1220-1229.

Zhang Y, Tu Y, Zhao J, Chen K, Wu C. (2009). Reversion-induced LIM interaction with Src reveals a novel Src inactivation cycle. *J Cell Biol* **184**: 785-792.

Zhu Z, Kleeff J, Kayed H, Wang L, Korc M, Buchler MW et al. (2002). Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog* **35**: 138-147.

Zhuang G, Brantley-Sieders DM, Vaught D, Yu J, Xie L, Wells S et al. (2010). Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer Res* **70**: 299-308.

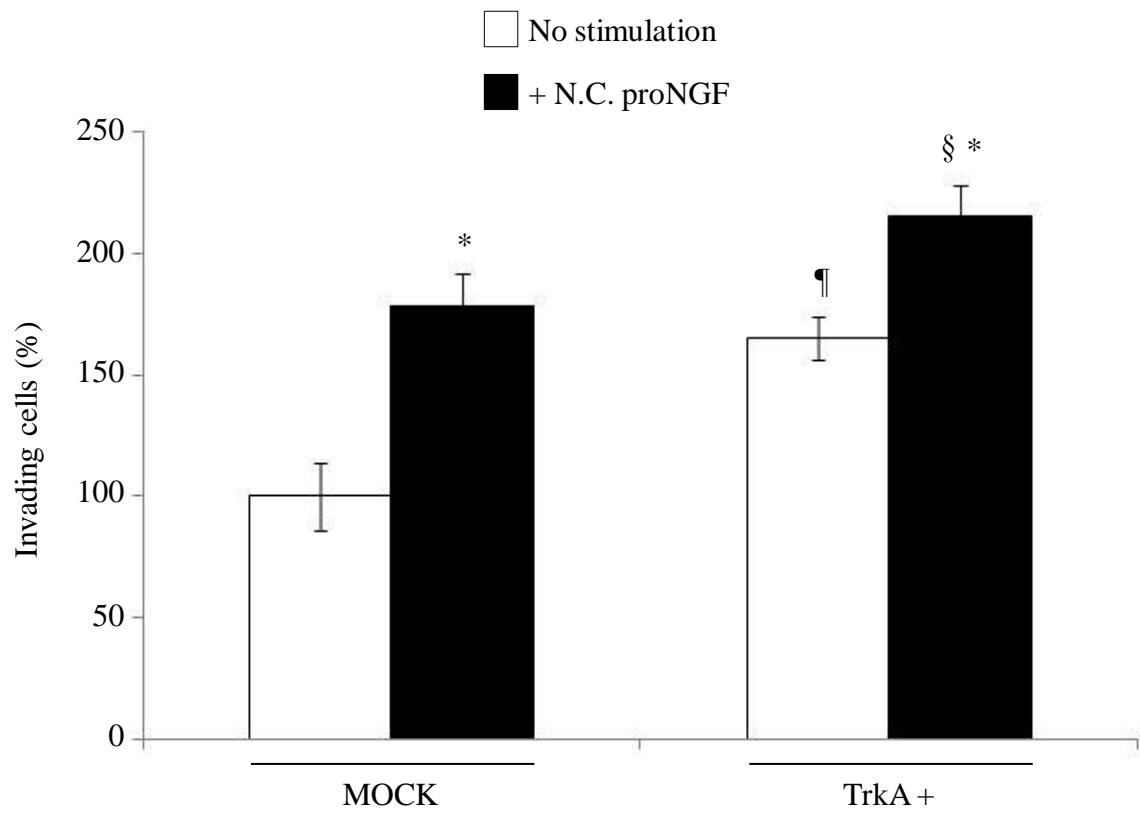
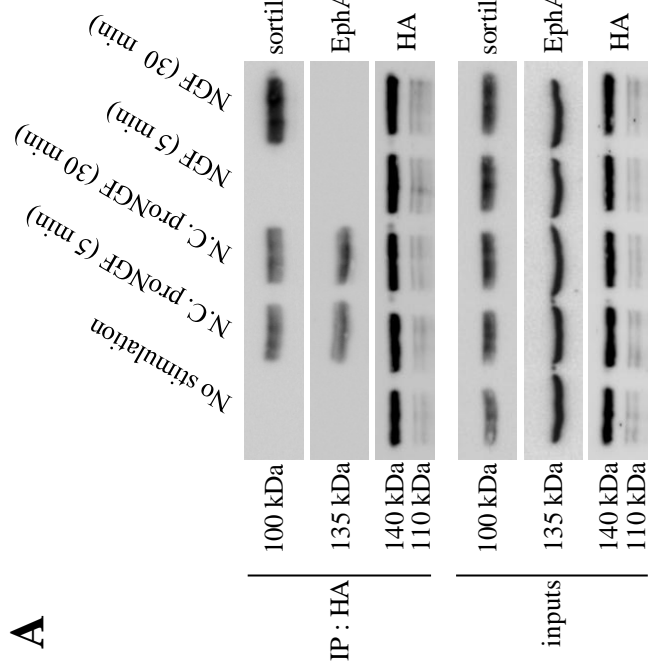
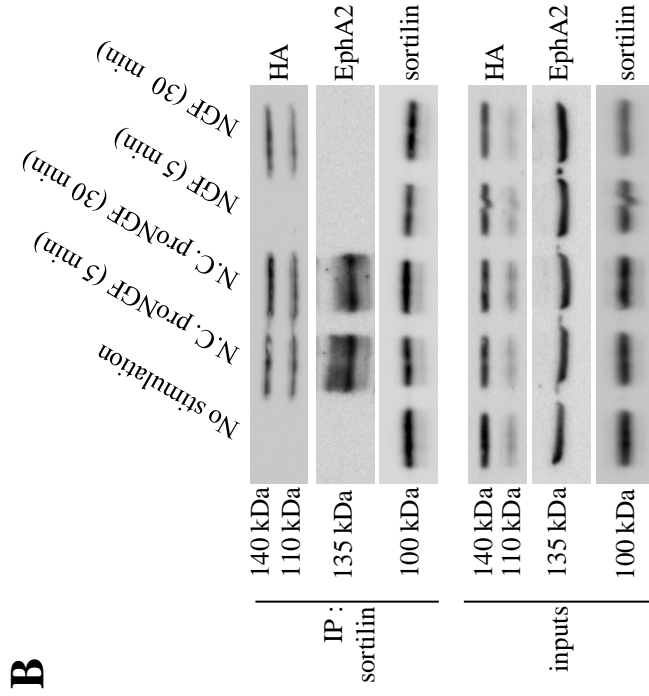
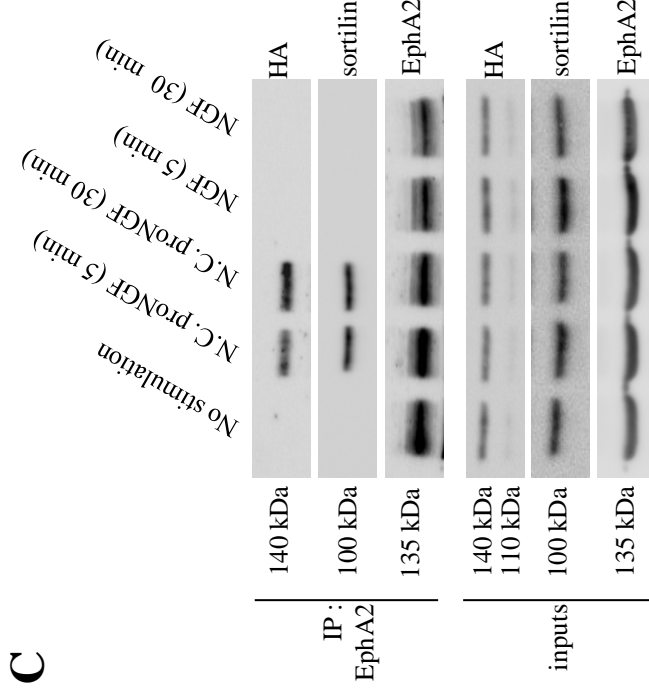
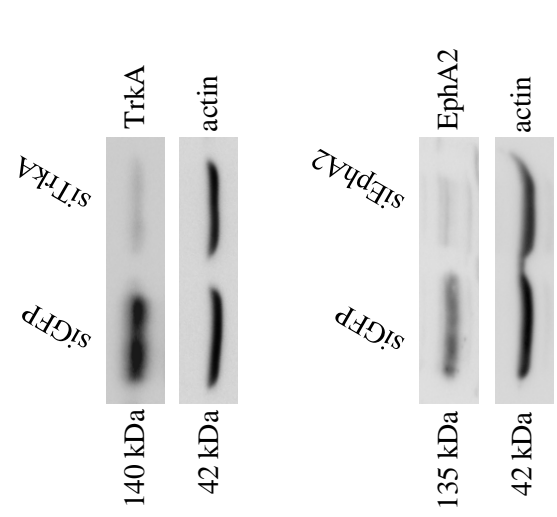
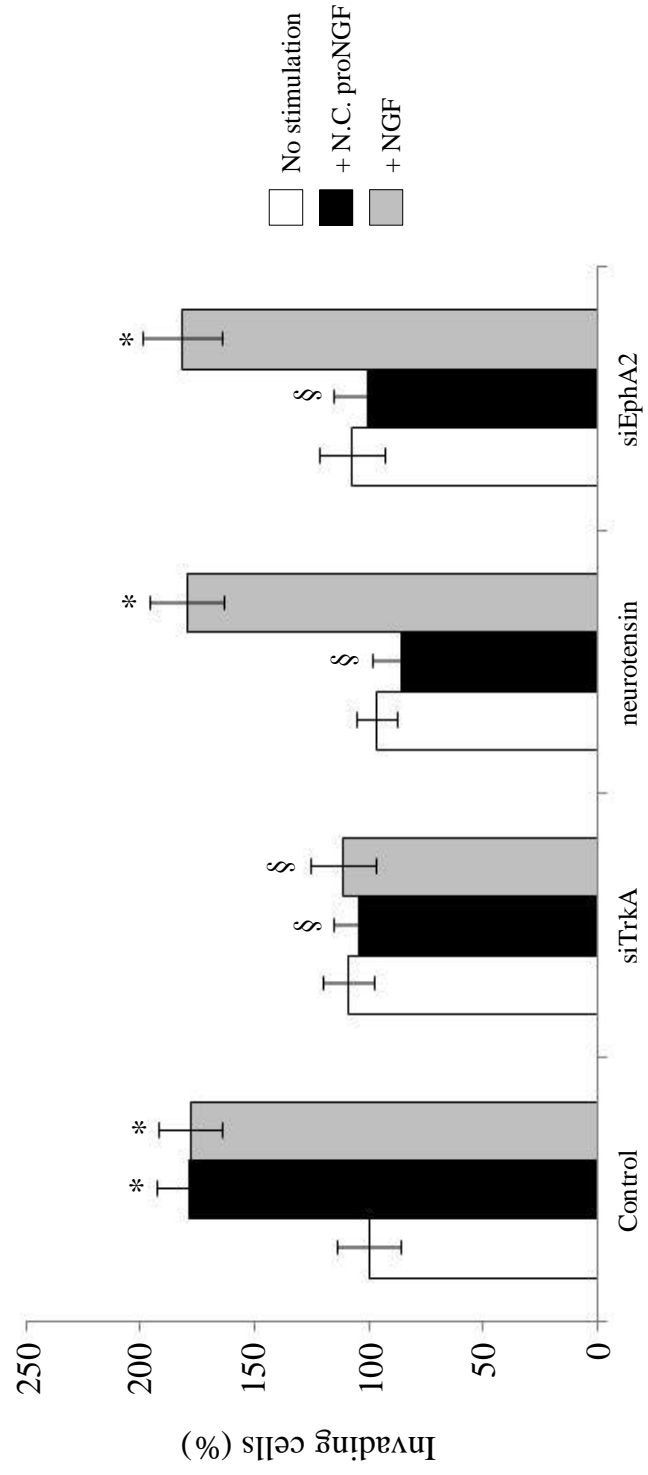


Figure 1

A**B****C****D**

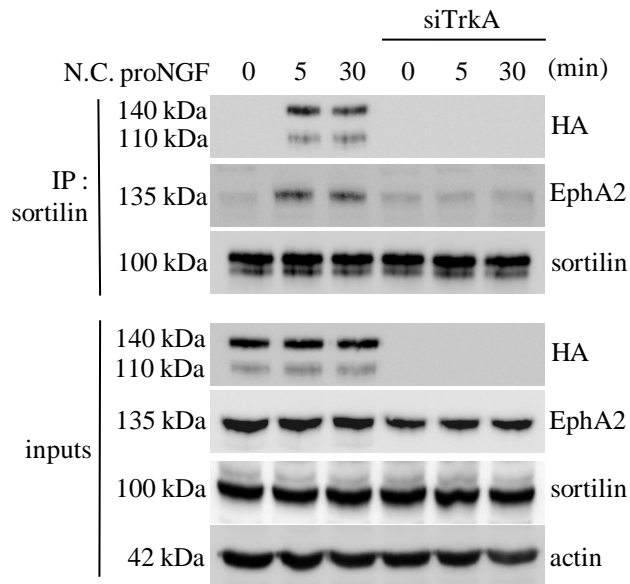
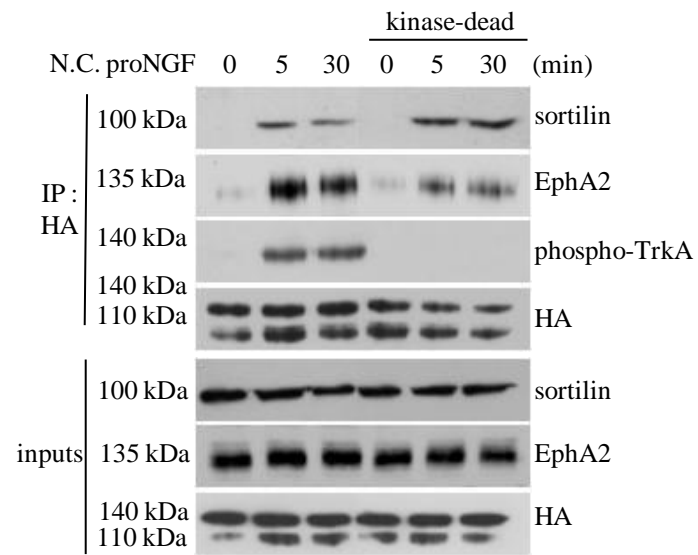
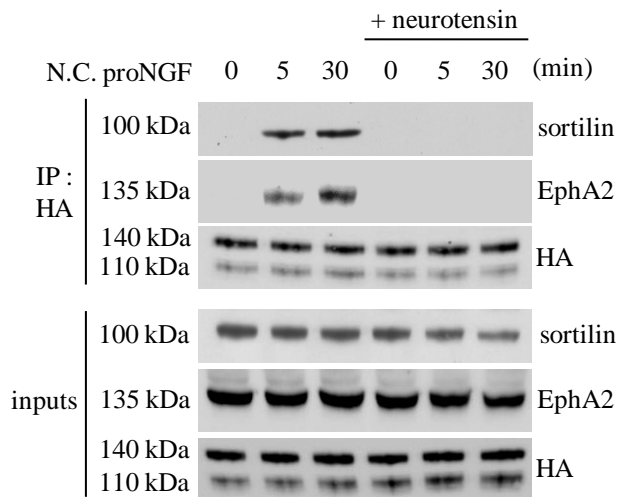
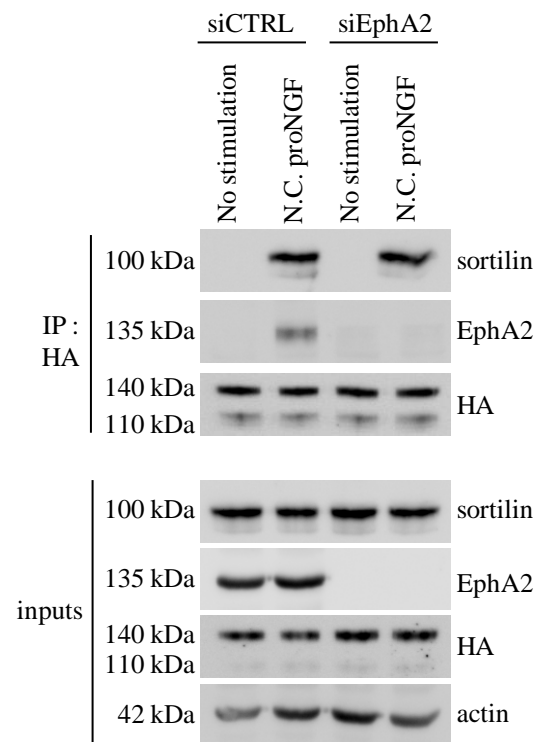
A**B****C****D**

Figure 3

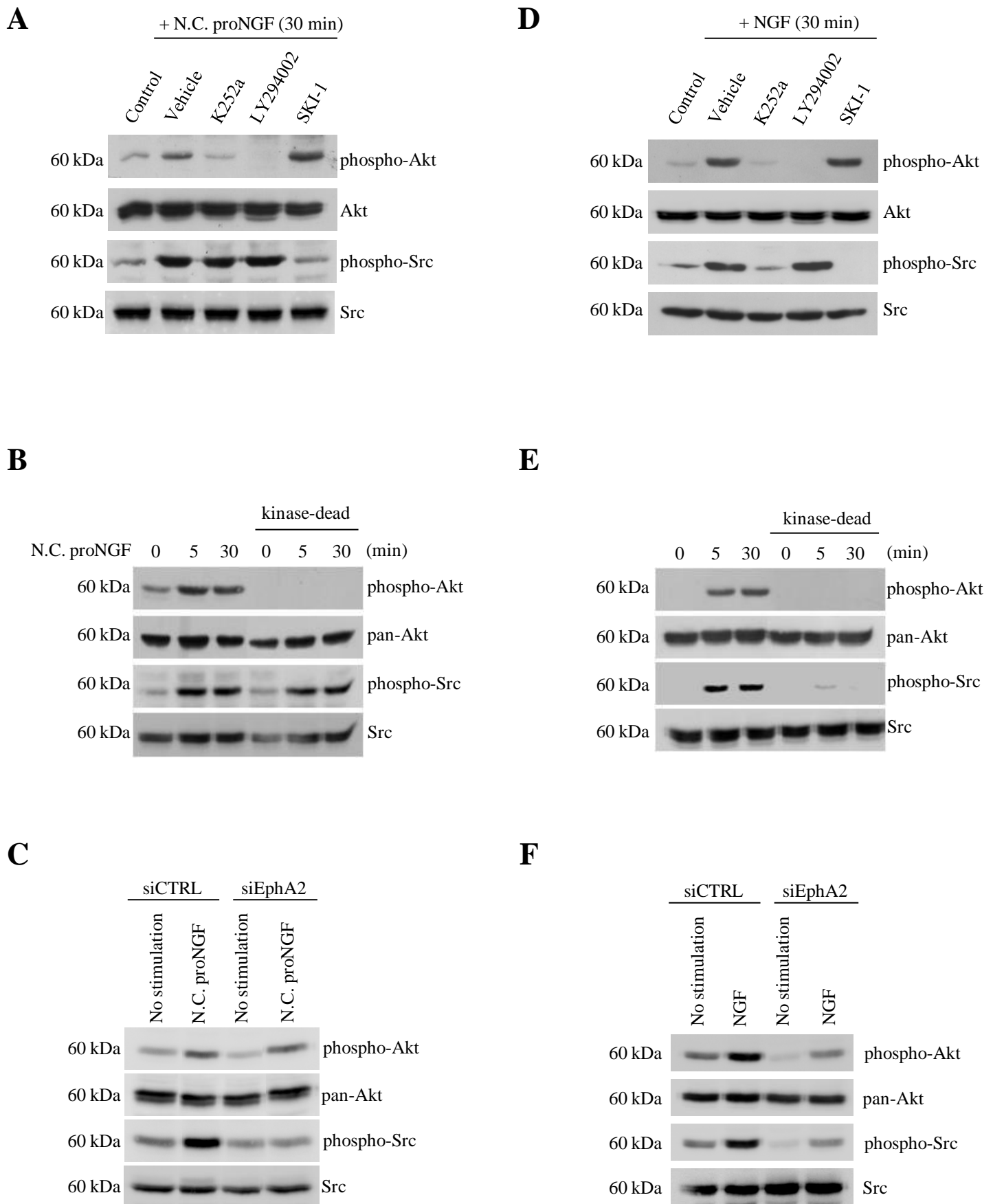


Figure 4

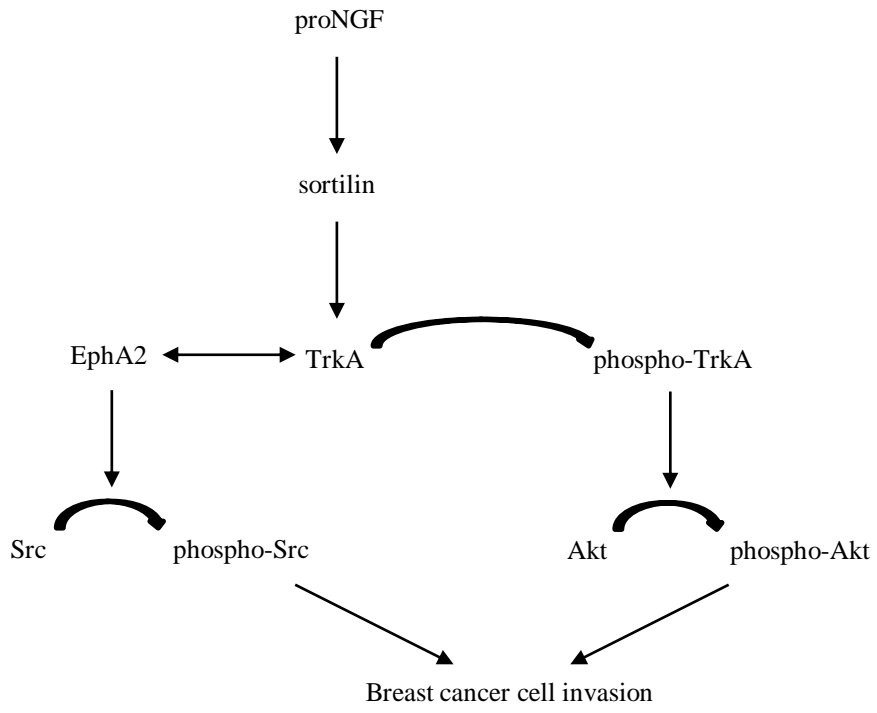
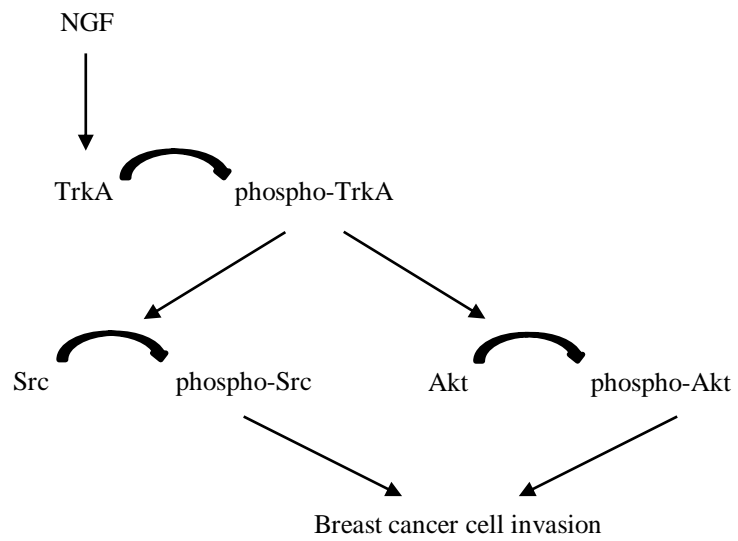
A**B**

Figure 5

| Protein name | Time of treatment (min) | Uniprot ID | Number of peptides | Peptide sequences | m/z observed | m/z theoretical | Delta mass ppm | Expected value | Mascot score |
|---|-------------------------|------------|--------------------|---|--------------|-----------------|----------------|----------------|--------------|
| High affinity nerve growth factor receptor | 30 | P04629 | 12 | IGDFGMSR | 881.4331 | 881.4065 | 30.10 | 0.0038 | 377 |
| | | | | WELGEGAFGK | 1092.5195 | 1092.5240 | -4.11 | 0.0032 | |
| | | | | NCLVGQGLVVK | 1185.6105 | 1185.6540 | -36.72 | 0.00014 | |
| | | | | DIYSTDYR | 1194.4873 | 1194.5193 | -26.82 | 0.071 | |
| | | | | ACPPEVYAIMR | 1305.5678 | 1305.6209 | -40.71 | 0.00065 | |
| | | | | WMPPEILYR | 1306.5771 | 1306.6380 | -46.62 | 0.38 | |
| | | | | FVAPDAFHFTPR | 1403.7278 | 1403.6986 | 20.80 | 0.0067 | |
| | | | | WEEEGGGVPEQK | 1456.7274 | 1456.6834 | 30.20 | 0.00014 | |
| | | | | VFLAECNLLPEQDK | 1811.8261 | 1811.8876 | -33.94 | 0.0038 | |
| | | | | EAELLTMLQHQHIVR | 1816.9107 | 1816.9618 | -28.13 | 0.00029 | |
| | | | | EAELLTMLQHQHIVR | 1832.8890 | 1832.9567 | -36.90 | 0.0048 | |
| | | | | GLEQAGWILTELEQSATVMK | 2203.2601 | 2203.1194 | 63.80 | 1.6e-007 | |
| GLEQAGWILTELEQSATVMK | 2219.2517 | 2219.1144 | 61.90 | 5.2e-005 | | | | | |
| TVQGLSLQELVLSGNPLHCSCALR | 2651.4055 | 2651.3523 | 20.10 | 0.00086 | | | | | |
| Sortilin | 5 | Q99523 | 1 | IYFGLGGR | 968.5173 | 968.5080 | 9.62 | 0.039 | 31 |
| Ephrin type-A receptor 2 | 30 | P29317 | 2 | FADIVSILDK | 1119.6008 | 1119.6176 | -14.98 | 0.0013 | 45 |
| | | | | TVSEWLESIK | 1190.5899 | 1190.6183 | -23.83 | 0.19 | |
| Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src | 5 | P12931 | 1 | AANILVGENLVCK | 1399.7604 | 1399.7493 | 7.92 | 0.00017 | 54 |
| Src substrate cortactin | 30 | Q14247 | 2 | VDQSAVGFYQGK | 1426.7274 | 1426.6729 | 38.20 | 0.0026 | 104 |
| | | | | YGLFPANYVELR | 1440.8043 | 1440.7401 | 44.50 | 1.3e-007 | |
| Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1 | 30 | P56945 | 2 | LVFIGDTLSR | 1119.5875 | 1119.6288 | -36.88 | 0.026 | 33 |
| | | | | ATAPGPEGGGTLHPNPTDK | 1815.7731 | 1815.8752 | -56.20 | 1.1 | |
| Synaptosomal-associated protein 23 | 30 | O00161 | 1 | ILGLAIESQDAGIK | 1426.8689 | 1426.8031 | 46.10 | 2.3e-007 | 76 |
| SH2 domain-containing protein 3C | 5 | Q8N5H7 | 2 | TEGTK | 534.2602 | 534.2649 | -8.78 | 0.061 | 52 |
| | | | | LDLLER | 757.4806 | 757.4334 | 62.40 | 0.0029 | |
| Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12 | 30 | Q05209 | 1 | TLLLEFQNESR | 1348.6391 | 1348.6987 | -44.14 | 0.00024 | 55 |
| LIM and SH3 domain protein 1 | 30 | Q14847 | 1 | GFSVVADTPELQR | 1417.7480 | 1417.7202 | 19.60 | 5e-005 | 60 |
| Four and a half LIM domains protein 2 | 30 | Q14192 | 7 | C ^S LSLVGR | 890.4654 | 890.4644 | 1.17 | 6.4e-005 | 223 |
| | | | | YISFEER | 942.4620 | 942.4447 | 18.40 | 0.0028 | |
| | | | | NSLVDPKPF ^A AK | 1188.6043 | 1188.6503 | -38.65 | 0.25 | |
| | | | | C ^A GCTNPISGLGGTK | 1491.7756 | 1491.6810 | 63.40 | 0.13 | |
| | | | | GSSWHET ^C FIC ^H R | 1675.6849 | 1675.6984 | -8.05 | 0.00038 | |
| | | | | DDFAYCLN ^C FC ^D LYAK | 2073.8142 | 2073.8271 | -6.19 | 7.2e-005 | |
| EDQLL ^C TDC ^S YSEYSSK | 2110.9031 | 2110.8459 | 27.10 | 0.13 | | | | | |
| PDZ and LIM domain protein 4 | 30 | P50479 | 3 | GYFFLDER | 1045.4706 | 1045.4869 | -15.62 | 0.0019 | 48 |
| | | | | DFSAPLTISR | 1105.5389 | 1105.5768 | -34.21 | 0.22 | |
| | | | | VKPPEGYDVVAVY ^P NAK | 1844.8488 | 1844.9672 | -64.22 | 1.9 | |
| HCLS1-associated protein X-1 | 30 | O00165 | 1 | IFGGVLESDAR | 1162.5964 | 1162.5982 | -1.62 | 0.0078 | 38 |
| Alpha-adducin | 30 | P35611 | 1 | INLQGDIVDR | 1141.5651 | 1141.6091 | -38.55 | 0.00094 | 49 |
| Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate | 30 | P29966 | 3 | LSGF ^S FK | 784.4588 | 784.4119 | 59.70 | 0.02 | 98 |
| | | | | GEPAAAAPEAGASPVEK | 1621.8007 | 1621.7947 | 3.67 | 0.15 | |
| | | | | EAPAEGEAAEPGSP ^T AEEGEAASAAS ^T SSPK | 2914.3679 | 2914.2951 | 25.00 | 2.7e-007 | |
| Gelsolin | 5 | P06396 | 1 | AGALNSNDAFVLK | 1318.6327 | 1318.6881 | -42.04 | 0.0054 | 41 |
| Integrin beta-1 | 30 | P05556 | 2 | IGFGSFVEK | 982.5279 | 982.5124 | 15.80 | 1.9e-005 | 101 |
| | | | | LLVFSTDAGFH ^F AGDGK | 1780.8293 | 1780.8785 | -27.62 | 4.2e-005 | |
| Integrin alpha-3 | 30 | P26006 | 4 | YLLLAGAPR | 972.6132 | 972.5756 | 38.60 | 0.062 | 70 |
| | | | | TVEDVGSPLK | 1043.5802 | 1043.5499 | 29.00 | 0.013 | |
| | | | | LELLMDNLR | 1228.6267 | 1228.6849 | -47.39 | 0.017 | |
| | | | | LELLMDNLR | 1244.6217 | 1244.6798 | -46.73 | 0.0056 | |
| | | | | EAGNPGSLFGYSVALHR | 1773.8210 | 1773.8798 | -33.14 | 0.17 | |

Table I

Corbet *et al*

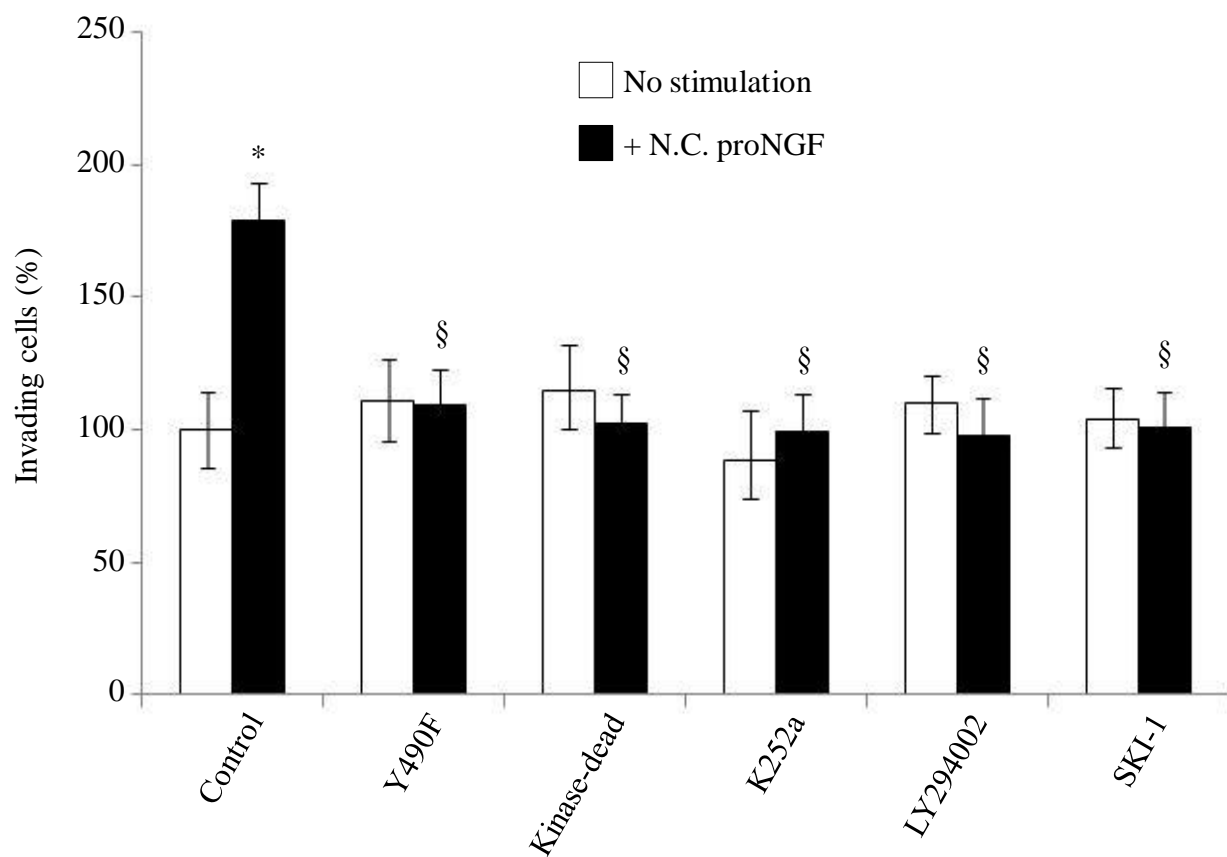


Figure S1

DISCUSSION

DISCUSSION

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence l'intervention du proNGF dans le cancer du sein. En particulier, nous avons montré que le proNGF est produit et sécrété par les cellules cancéreuses de sein et qu'il induit l'invasion de ces mêmes cellules. De plus, cet effet fait intervenir une signalisation intracellulaire différente de celle activée par le NGF qui est également capable d'induire l'invasion cellulaire. En effet, le proNGF nécessite la formation d'un complexe ternaire sortiline/TrkA/EphA2. Ainsi, nous discuterons de l'expression du proNGF dans le cancer du sein et de son implication probable dans le processus métastatique. Dans un deuxième temps, nous analyserons la signalisation intracellulaire originale induite par le proNGF dans les cellules cancéreuses mammaires. Enfin, nous traiterons de l'impact des résultats obtenus sur les stratégies thérapeutiques ciblant le récepteur TrkA dans les cancers.

I. LE PRONGF DANS LE CANCER DU SEIN

A. Production et sécrétion du proNGF

La sécrétion des proneurotrophines, et du proNGF en particulier, a déjà été montrée dans des cellules du système nerveux (Lee *et al.*, 2001 ; Hasan *et al.*, 2003 ; Srinivasan *et al.*, 2004 ; Bruno & Cuello, 2006 ; Domeniconi *et al.*, 2007). De façon intéressante, la sécrétion des proneurotrophines a aussi été reportée dans des contextes tumoraux. Ainsi, le proBDNF est sécrété par les cellules cancéreuses lymphatiques (Fauchais *et al.*, 2008). De même, le proBDNF est retrouvé de façon plus importante dans le sang de rats ayant développé un cancer du foie (Yang *et al.*, 2005). Dans le cancer du sein, la production et la sécrétion du NGF a été démontrée par les travaux précédents de notre laboratoire (Dolle *et al.*, 2003). Néanmoins, le fait que le proNGF soit maturé par des enzymes intracellulaires (proconvertases, furine) (Bresnahan *et al.*, 1990 ; Seidah *et al.*, 1996) ne nous permettait pas de préjuger de sa propre sécrétion. Aussi, nous avons montré, par immunomarquage avec des anticorps dirigés contre le propeptide, que l'expression du proNGF dans le cytoplasme des cellules cancéreuses de sein est perdue lors de l'utilisation d'un inducteur de sécrétion comme l'ionomycine. De plus, l'analyse des milieux conditionnés par les cellules cancéreuses, par Western blot et spectrométrie de masse, montre la présence de proNGF.

L'ensemble de nos données indique donc, pour la première fois, que le proNGF est produit et sécrété par les cellules cancéreuses mammaires.

DISCUSSION

B. Effet pro-invasif du proNGF

De nombreuses études montrent que les proneurotrophines produites et sécrétées sont capables d'avoir une activité biologique propre, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Lee *et al.*, 2001 ; Harrington *et al.*, 2004 ; Nykjaer *et al.*, 2004 ; Teng *et al.*, 2005). Nos résultats ont également mis en évidence un rôle biologique pour le proNGF dans le cancer du sein. En effet, le proNGF induit l'invasion des cellules cancéreuses *in vitro*. Cet effet est propre au proNGF puisque l'utilisation de mutants non clivables de proNGF, incapables de générer du NGF mature, de même que l'ajout d'un inhibiteur de furine, conduit aux mêmes effets que le proNGF non muté. Nos résultats suggèrent également l'existence d'une boucle autocrine de stimulation, comme cela a déjà été montré pour le NGF (Dolle *et al.*, 2003), puisque l'inhibition de l'expression du proNGF par siRNA diminue les capacités invasives des cellules cancéreuses de sein. Cette hypothèse reste à confirmer puisque le siRNA utilisé dans cette étude inhibe l'expression du NGF mature qui induit également l'invasion cellulaire. L'utilisation d'anticorps bloquants anti-proNGF, dirigés contre le propeptide, permettrait d'apporter la preuve de ce concept.

Nos résultats montrent que le NGF mature induit également l'invasion cellulaire. Néanmoins, le proNGF apparaît comme un inducteur de l'invasion cellulaire plus puissant que le NGF puisque l'effet maximal observé est obtenu avec une concentration beaucoup plus faible (0,5 nM) que pour le NGF mature (entre 8 et 16 nM). Ces observations apportent une preuve supplémentaire que ce n'est pas la production de NGF mature qui est à l'origine de l'effet du proNGF. Nos données sont en accord avec les résultats obtenus dans d'autres cancers. En effet, dans les mélanomes, le proNGF est capable d'induire la migration cellulaire à une concentration 20 fois plus faible que le NGF (Truzzi *et al.*, 2008). Enfin, dans le cancer de la prostate, le proNGF a également été reporté pour avoir un effet sur la migration/invasion cellulaire (Djakiew *et al.*, 1993 ; Delsite & Djakiew, 1999).

Nos résultats montrent ainsi que le proNGF, en plus d'être sécrété par les cellules cancéreuses de sein, a une activité biologique propre puisqu'il induit l'invasion de ces mêmes cellules.

DISCUSSION

C. ProNGF et processus métastatique

Le cancer du sein est associé, dans 50 à 75% des cas, à l'apparition de métastases à distance, à l'origine de la mort des patientes. Par conséquent, la compréhension des mécanismes impliqués dans le processus métastatique de ce cancer est un enjeu majeur (Rabbani & Mazar, 2007). Dans notre étude, l'analyse immunohistochimique de l'expression du proNGF dans des biopsies mammaires indique que le proNGF est surexprimé dans les cellules cancéreuses malignes par rapport aux cellules normales et aux pathologies bénignes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour le NGF mature (Dolle *et al.*, 2003 ; Adriaenssens *et al.*, 2008). De plus, une corrélation entre l'expression du proNGF et l'invasion des ganglions lymphatiques est retrouvée dans les carcinomes ductaux invasifs. L'ensemble de ces données semble refléter, *in vivo*, l'effet pro-invasif du proNGF observé *in vitro*. Ainsi, il apparaît que l'expression du proNGF est associée à la capacité des cellules à quitter l'épithélium mammaire, en digérant la lame basale et en envahissant le tissu conjonctif environnant.

L'ensemble des résultats obtenus soulève la question de la pertinence du proNGF en tant que marqueur pronostique dans le cancer du sein. Le proNGF est déjà suggéré comme un marqueur dans certaines pathologies. En effet, son expression est augmentée dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Fahnestock *et al.*, 2001 ; Peng *et al.*, 2004) et deux sous-peptides de son propeptide sont générés dans les sérums de patients ayant une polyarthrite rhumatoïde (Dicou, 2008).

Des travaux précédents de notre laboratoire ont montré que le NGF est surexprimé par les cellules cancéreuses mammaires en comparaison aux cellules normales, indiquant qu'il pourrait constituer un marqueur du cancer du sein (Dolle *et al.*, 2003 ; Adriaenssens *et al.*, 2008). Comme dans ces travaux, nous montrons ici que le proNGF est surexprimé dans des biopsies tumorales par rapport aux biopsies normales. En revanche, on pourra remarquer que dans les précédents travaux du laboratoire, l'anticorps anti-NGF utilisé ne permettait pas de distinguer le NGF par rapport au proNGF. Dans notre étude, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre le propeptide du proNGF permettant, de fait, d'exclure toute immunoréactivité due au NGF. De façon intéressante, nous avons observé une corrélation entre la métastase vers les nœuds lymphatiques et l'expression du proNGF alors que les travaux précédents de notre laboratoire avec un anticorps anti-NGF n'ont pas mis en évidence une telle corrélation. La détection de l'expression du proNGF dans les tumeurs

DISCUSSION

mammaires pourrait donc permettre d'évaluer le risque d'apparition de métastases lymphatiques.

II. SIGNALISATION DU PRONGF DANS LES CELLULES DE CANCER DU SEIN

A. Implication de la sortiline et TrkA

L'activité biologique du proNGF est associée à une signalisation induite par la formation d'un complexe sortiline/p75^{NTR} (Nykjaer *et al.*, 2004 ; Rogers *et al.*, 2010). Ainsi, le proNGF interagit avec la sortiline *via* son pro-domaine et dans le même temps avec p75^{NTR}, par sa partie mature. Néanmoins, des formes mutées de proNGF, incapables de générer du NGF mature, ont été décrites comme pouvant induire l'activation du récepteur TrkA et de sa signalisation sous-jacente, comme la voie des MAPK (Clewes *et al.*, 2008 ; Masoudi *et al.*, 2009). Une autre étude montre cependant qu'un clivage intracellulaire du proNGF par la furine serait nécessaire pour générer du NGF mature qui pourrait alors activer TrkA et sa signalisation (Boutilier *et al.*, 2008). Par ailleurs, le proNGF a été co-immunoprécipité avec le récepteur TrkA, dans les cellules PC12, suggérant une éventuelle fixation du proNGF sur ce récepteur (Fahnestock *et al.*, 2004). Enfin, une étude récente a montré une interaction entre les domaines extracellulaires de la sortiline et des récepteurs Trk, nécessaire pour le transport antérograde axonal des récepteurs et leur signalisation (Vaegter *et al.*, 2011). L'ensemble de ces données suggère donc une signalisation possible engageant le proNGF et le récepteur TrkA mais les mécanismes d'action mis en jeu sont très incertains.

Dans notre étude, nous montrons que l'invasion des cellules cancéreuses de sein, induite par le proNGF, est dépendante de l'expression de la sortiline et de TrkA, mais pas de p75^{NTR}. Ainsi, dans ces cellules, la formation d'un complexe sortiline/p75^{NTR} ne semble pas requise pour induire la signalisation du proNGF. De façon intéressante, le proNGF est capable d'activer le récepteur TrkA, *via* la phosphorylation de son domaine kinase et du résidu Y⁴⁹⁰. Cette activation est absolument nécessaire pour l'effet pro-invasif du proNGF puisque le traitement au K252a, ou l'expression de formes mutées de TrkA, abolit totalement cet effet. Nous montrons également, grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de furine et de formes non clivables de proNGF, que la phosphorylation de TrkA ne nécessite pas de clivage intracellulaire du proNGF en NGF mature. En revanche, la liaison du

DISCUSSION

proNGF sur la sortiline est un pré-requis pour induire cette activation puisque la neurotensine, un autre ligand de la sortiline, ajoutée en excès, inhibe les effets du proNGF. Ceci suggère que la neurotensine agirait soit en entrant en compétition avec le proNGF pour se lier sur le même épitope du domaine extracellulaire (dans le domaine β -propeller) de la sortiline, soit en inhibant sa liaison simplement par encombrement stérique.

Des études de co-immunoprécipitation nous ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, la formation d'un complexe sortiline/TrkA, sous l'effet du proNGF, dans les cellules cancéreuses de sein. Ainsi, deux hypothèses sont envisageables pour cette association : 1) le proNGF se fixe simultanément sur la sortiline et sur TrkA comme cela a été démontré pour le complexe sortiline/p75^{NTR} (Feng *et al.*, 2010), 2) le proNGF se fixe sur la sortiline qui interagit alors avec TrkA pour induire un changement de conformation et une activation de son domaine intracellulaire. En comparaison, le NGF est également capable d'induire la formation d'un complexe sortiline/TrkA mais seulement après 30 min de stimulation. De plus, ce complexe ne semble pas nécessaire pour l'effet pro-invasif du NGF puisque l'inhibition de l'expression de la sortiline, par siRNA, n'affecte pas cet effet. Cette interaction pourrait plutôt intervenir lors du trafic intracellulaire du récepteur TrkA comme cela a déjà été décrit dans les neurones (Vaegter *et al.*, 2011).

L'ensemble de nos données démontre que le proNGF induit la formation d'un complexe original sortiline/TrkA conduisant à l'activation du récepteur TrkA et à l'invasion des cellules cancéreuses de sein.

B. Recrutement spécifique d'EphA2 par le proNGF

Grâce à une analyse protéomique de l'interactome de TrkA, nous avons identifié le récepteur tyrosine kinase EphA2. Le recrutement de ce récepteur sur TrkA est spécifique au proNGF et participe à l'induction de l'invasion cellulaire. Le récepteur EphA2 est connu pour être surexprimé dans les cancers du sein où il favorise la croissance et la migration/invasion des cellules *in vitro* et le développement tumoral *in vivo* (Zelinski *et al.*, 2001). Cette surexpression est accompagnée d'une inhibition de l'expression de son ligand, l'éphrine-A1. Ainsi, dans les cellules cancéreuses de sein, EphA2 est capable de coopérer avec d'autres RTK comme l'EGFR ou HER-2 (Larsen *et al.*, 2007 ; Brantley-Sieders *et al.*, 2008). Ceci conduit à une activation d'EphA2 et de sa signalisation, indépendante de son ligand.

DISCUSSION

Dans notre étude, le recrutement d'EphA2 nécessite, comme pré-requis, la formation du complexe sortiline/TrkA puisque l'inhibition d'un des récepteurs empêche l'association du deuxième avec EphA2. Nous avons également montré que la phosphorylation du récepteur TrkA n'est pas nécessaire pour le recrutement d'EphA2. Ceci suggère que le complexe sortiline/TrkA peut à la fois permettre une signalisation dépendante de la phosphorylation de TrkA mais également une voie indépendante de cette phosphorylation, avec le recrutement d'EphA2. La coopération entre les différents récepteurs nécessite cependant des études complémentaires. Ainsi, une analyse de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) permettrait de savoir quel récepteur (sortiline ou TrkA) interagit physiquement avec EphA2. De plus, une étude a montré que le récepteur EphA2 pouvait être transactivé par l'EGFR, *via* la phosphorylation, par Akt, du résidu S⁸⁹⁷ de son domaine intracellulaire (Miao *et al.*, 2009). Néanmoins, il semblerait que dans notre modèle cellulaire, un mécanisme différent soit mis en place car un traitement avec l'inhibiteur de PI3-K, le LY294002, inhibe la phosphorylation d'Akt mais n'empêche pas la phosphorylation de Src qui est dépendante d'EphA2.

Au vu des résultats obtenus, le proNGF induit l'invasion des cellules cancéreuses de sein par l'intermédiaire d'un complexe ternaire sortiline/TrkA/EphA2.

C. Signalisation dépendante de la phosphorylation de TrkA

Nous avons montré que, dans les cellules cancéreuses de sein, le proNGF active les voies PI3-K/Akt et Src alors qu'il ne module pas la phosphorylation des protéines Erk1/2. De même, ces voies sont responsables de l'effet pro-invasif du proNGF puisque leur inhibition spécifique abolit l'invasion des cellules MDA-MB-231. Ces résultats sont différents de ceux obtenus dans d'autres modèles cellulaires où les formes non clivables du proNGF étaient capables d'induire la phosphorylation de TrkA et des MAPK (Clewes *et al.*, 2008 ; Masoudi *et al.*, 2009). Des travaux précédents du laboratoire ont également montré qu'un inhibiteur de la voie des MAPK pouvait inhiber l'invasion cellulaire induite par la surexpression de TrkA (Lagadec *et al.*, 2009). Il semble donc que les mécanismes mis en jeu par le proNGF pour activer sa signalisation, dans le cancer du sein, soient différents de ceux précédemment décrits dans la littérature. Ainsi, nous montrons que la voie PI3-K/Akt est dépendante de la phosphorylation de TrkA alors que la phosphorylation de Src passe

DISCUSSION

par EphA2. En comparaison, le NGF est également capable d'activer ces deux voies mais elles sont toutes les deux en aval de la phosphorylation de TrkA.

La phosphorylation de TrkA (sur les sites Y⁴⁹⁰ et le domaine kinase) est absolument nécessaire à l'effet pro-invasif du proNGF puisque son inhibition, par expression de récepteurs mutés ou par traitement au K252a, abolit totalement cet effet. Ces résultats confirment les données précédemment obtenues au laboratoire qui démontraient que l'utilisation de K252a réduisait la croissance tumorale et la formation de métastases dans un modèle murin de xénogreffes, de même que l'invasion cellulaire *in vitro* induite par la surexpression de TrkA (Adriaenssens *et al.*, 2008 ; Lagadec *et al.*, 2009). Néanmoins, au vu des données que j'ai pu obtenir, il ne nous est pas possible de dire si ces effets étaient dus à l'inhibition de la signalisation induite par le NGF ou par le proNGF.

La voie PI3-K/Akt, activée par le proNGF, est très largement décrite pour intervenir dans les processus de migration/invasion (Dillon & Muller, 2010). L'implication du résidu Y⁴⁹⁰ de TrkA dans l'activation de cette voie a été reportée dans les neurones. En effet, comme nous l'avons vu précédemment (§II.B.3.c), la PI3-K peut être activée suite à la phosphorylation du résidu Y⁴⁹⁰, grâce au recrutement des protéines Shc, Grb2 et Gab1 (Holgado-Madruga *et al.*, 1997 ; Korhonen *et al.*, 1999). Cette voie conduit à de nombreux effets biologiques dont la migration/invasion. Dans notre étude, l'implication de la protéine Akt est néanmoins démontrée de façon indirecte puisque seul le LY294002, un inhibiteur de la PI3-K, a été utilisé. Un inhibiteur spécifique d'Akt devrait par conséquent être ajouté aux tests. En effet, la PI3-K est capable d'agir dans les processus de migration/invasion sans faire intervenir Akt (Cain & Ridley, 2009). Elle peut, par exemple, réguler la formation des protrusions membranaires en modulant l'activité des petites GTPases Rho, Rac et Cdc42. Cependant, des travaux précédents du laboratoire ont montré que l'inhibition spécifique d'Akt permettait d'abolir l'effet pro-invasif dû à la surexpression de TrkA (Lagadec *et al.*, 2009), laissant penser que l'axe PI3-K/Akt est effectivement impliqué dans l'effet du proNGF.

D. Signalisation indépendante de la phosphorylation de TrkA

La formation du complexe ternaire sortiline/TrkA/EphA2 dans les cellules cancéreuses mammaires conduit à l'activation de la voie Src. Cette signalisation est indépendante de la phosphorylation de TrkA mais nécessite l'expression d'EphA2. Plusieurs études ont

DISCUSSION

permis d'identifier Src comme une cible thérapeutique dans de nombreux cancers et ont conduit au développement d'inhibiteurs de Src, comme le dasatinib et le bosutinib (voir §I.B.4.b). Dans le cancer du sein, le sous-type « basal-like », représentant certaines tumeurs « triple-négatives » en clinique, a été identifié comme le plus sensible aux agents ciblant Src (Finn *et al.*, 2007). Des biomarqueurs potentiels de la sensibilité au dasatinib ont été identifiés dans le cancer du sein et sont actuellement en cours de validation. Ceci concerne la cavéoline, EphA2, IGFBP-2, VEGFR2 et le collagène de type IV (Strauss *et al.*, 2009).

Par ailleurs, outre EphA2 et Src, l'analyse protéomique de l'interactome de TrkA a permis d'identifier différentes protéines ayant un rôle direct ou indirect avec la signalisation d'EphA2 et/ou de Src. En particulier, plusieurs protéines sont connues pour intervenir dans la signalisation des RTK et pour moduler la migration/invasion cellulaire. Parmi elles, la protéine SHEP-1 (*SH2 domain-containing Eph receptor-binding protein 1*) est recrutée et phosphorylée par EphA2 (Dail *et al.*, 2004) et peut interagir avec p130 Cas (*p130 Crk-associated substrate*). Cette interaction est nécessaire pour la phosphorylation de p130 Cas par Src et pour l'induction de l'invasion cellulaire, *via* le recrutement des protéines DOCK180 (*Dedicator of cytokinesis 180*), Crk et C3G (Roselli *et al.*, 2010). La protéine p130 Cas est un substrat connu de la phosphatase PTP-PEST (PTPN12, *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12*) qui peut réguler son activité (Garton *et al.*, 1996). De façon intéressante, dans les ostéoclastes, cette phosphatase peut activer Src (sur le résidu Y⁴¹⁶) en déphosphorylant le résidu Y⁷⁵⁷ inhibiteur, conduisant du même coup à une augmentation de la phosphorylation de la cortactine (Chellaiah & Schaller, 2009). De plus, dans un carcinome pulmonaire, l'activation constitutive d'EphA2 est corrélée à une augmentation de la phosphorylation de Src, cortactine et p130 Cas et à une induction de l'invasion cellulaire (Faoro *et al.*, 2010). Ainsi, l'activation de la cortactine conduit à la formation de structures membranaires particulières, les invadopodes, qui permettent la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion des cellules cancéreuses (Murphy & Courtneidge, 2011). La protéine LASP1 (*LIM and SH3 domain protein 1*), liée au cytosquelette d'actine, est également un substrat de Src et favorise la migration cellulaire (Traenka *et al.*, 2010). Les protéines HAX-1 (*HCLS1-associated protein X-1*) et FHL-2 (*Four and a half LIM domains protein 2*) peuvent interagir avec la protéine de signalisation Grb7 qui est associée au complexe Src/FAK (*Focal Adhesion Kinase*) (Siamakpour-Reihani *et al.*, 2009 ; Siamakpour-Reihani *et al.*, 2011). Ces deux protéines sont décrites pour favoriser la migration/invasion cellulaire. Enfin le complexe d'intégrines $\alpha 3 \beta 1$ a été

DISCUSSION

décrit pour induire la migration des cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 (Mitchell *et al.*, 2010).

En comparaison, le NGF induit également l'activation de la protéine Src mais cette fois-ci dépendamment de la phosphorylation de TrkA. Dans ce cas-là, le recrutement des protéines p130 Cas, cortactine ou encore SHEP-1 n'est pas observé. Par conséquent, on peut supposer que la protéine Src ne reconnaît pas les mêmes substrats selon qu'elle est activée par TrkA ou par EphA2. Dans le cas du NGF, Src pourrait activer la protéine STAT3 connue pour être un effecteur de TrkA (Ng *et al.*, 2006) et pouvant conduire également à l'invasion cellulaire (Mukhopadhyay *et al.*, 2010).

Ainsi, le proNGF induit les voies de signalisation de la PI3-K/Akt et de Src, nécessaires, de façon concomitante, pour l'invasion cellulaire. Néanmoins, bien que l'expression de TrkA soit requise pour les deux voies, sa phosphorylation régule uniquement la voie PI3-K/Akt.

PERSPECTIVES

I. RÔLE DU PRONGF *IN VIVO* DANS LE CANCER DU SEIN

Les travaux précédents du laboratoire, sur des xénogreffes de cellules cancéreuses mammaires, en souris SCID, ont montré que l'utilisation d'anticorps ou de siRNA, ciblant à la fois le NGF et le proNGF, conduit à la formation de tumeurs plus petites, moins vascularisées et moins métastatiques (Adriaenssens *et al.*, 2008). De même, l'utilisation de K252a ne permet pas de discriminer les effets associés au NGF et au proNGF puisque nous avons montré que la phosphorylation de TrkA était nécessaire dans les deux cas. Nous pourrions envisager d'utiliser des anticorps neutralisants spécifiques du proNGF pour évaluer leur effet sur le développement de xénogreffes de cellules cancéreuses mammaires en souris SCID. De même, nous avons montré que le proNGF est sécrété par les cellules cancéreuses, supposant une éventuelle action paracrine sur les autres types cellulaires du microenvironnement de la tumeur. En effet, le proNGF a été décrit pour induire la survie et la prolifération des myofibroblastes hépatiques, contrairement au NGF qui a une activité pro-apoptotique (Kendall *et al.*, 2009). De même, la sous-population de macrophages M2 (pro-tumoraux) exprime la sortiline, contrairement aux macrophages M1 (anti-tumoraux) (Tzachanis *et al.*, 2002), supposant un éventuel rôle du proNGF sécrété sur le recrutement de ces cellules. De la même manière, la sortiline est surexprimée par les cellules endothéliales circulantes (CEC) de patients présentant un cancer métastatique par rapport à des individus sains (Smirnov *et al.*, 2006). Ces cellules sont nécessaires pour la néovascularisation de la tumeur ; on peut donc s'interroger sur l'éventuelle implication de l'axe proNGF/sortiline dans le recrutement des CEC par les cellules cancéreuses de sein. Des co-cultures de cellules cancéreuses mammaires et des différents types cellulaires précédemment cités nous permettraient d'apporter des éléments de réponse à ces hypothèses.

Enfin, d'un point de vue clinicopathologique, il serait intéressant d'évaluer l'expression du proNGF, de TrkA et d'EphA2 dans un panel de biopsies cancéreuses mammaires pour établir une éventuelle corrélation entre la co-expression de ces protéines et les paramètres clinicopathologiques de la tumeur (stade, type histologique, grade, expression des récepteurs stéroïdiens, etc.). De même, cette analyse pourrait être étendue aux cancers de la prostate ou les mélanomes où le proNGF, TrkA et EphA2 sont décrits respectivement pour induire l'invasion (Djakiew *et al.*, 1993 ; Delsite & Djakiew, 1999 ; Festuccia *et al.*, 2007 ; Truzzi *et al.*, 2008 ; Taddei *et al.*, 2011 ; Udayakumar *et al.*, 2011).

II. SIGNALISATION DU PRONGF

Plusieurs études ont montré que les effets du proNGF étaient étroitement liés au ratio d'expression entre les récepteurs sortiline, TrkA et p75^{NTR} (Clewes *et al.*, 2008 ; Masoudi *et al.*, 2009). Dans notre étude, la signalisation du proNGF est régulée par la formation d'un complexe sortiline/TrkA alors que p75^{NTR} n'est pas nécessaire. Cependant, de façon surprenante, l'effet du proNGF est maximal à une dose de 0,5 nM puis redevient nul à partir de 2 nM. Cet effet-cloche pourrait s'expliquer soit par une désensibilisation du récepteur, soit par le déplacement vers un autre complexe protéique. En effet, Boutilier et ses collaborateurs ont montré que le proNGF non clivable se fixait sur p75^{NTR} à partir de 2 nM (Boutilier *et al.*, 2008). Ainsi, à des doses élevées (≥ 2 nM), le proNGF favoriserait la formation d'un complexe sortiline/p75^{NTR} ne permettant pas d'induire l'invasion cellulaire alors qu'à des doses plus faibles (< 2 nM), le complexe sortiline/TrkA serait privilégié et l'invasion pourrait être induite. Cette hypothèse pourrait être confirmée en invalidant l'expression de p75^{NTR} par siRNA dans des cellules MDA-MB-231 surexprimant TrkA et traitées ensuite avec 2 nM de proNGF non clivable. De même, il est possible que le proNGF, à des doses plus élevées, induise une boucle de rétrocontrôle négatif faisant intervenir p75^{NTR} et la phosphatase PTEN comme cela a été décrit pour le récepteur TrkB (Song *et al.*, 2010). Par conséquent, les cellules cancéreuses de sein pourraient réguler la signalisation du proNGF et le phénotype associé en contrôlant le ratio proNGF/NGF (dépendant de l'activité des protéases et de la biodisponibilité de la proneurotrophine) mais également en modulant l'expression des différents récepteurs à la surface cellulaire.

Les résultats de nos études ont été obtenus dans la lignée cancéreuse de sein MDA-MB-231. Cette lignée ne surexprime pas le récepteur HER-2 qui peut coopérer à la fois avec TrkA (Tagliabue *et al.*, 2000) et EphA2 (Brantley-Sieders *et al.*, 2008). Nous pourrions envisager de déterminer les effets du proNGF sur des lignées cancéreuses de sein surexprimant HER-2 (SKBR-3, BT-474) pour voir si la présence de ce récepteur n'affecte pas la réponse au proNGF, en favorisant la formation de complexes HER-2/TrkA ou HER-2/EphA2, voire un complexe ternaire HER-2/TrkA/EphA2. Ceci nous donnerait également des informations supplémentaires sur les sous-types de cancers du sein potentiellement sensibles à des thérapies ciblant la signalisation du proNGF.

Enfin, nos résultats augurent un éventuel mécanisme commun aux autres proneurotrophines. Notre laboratoire a montré que les neurotrophines BDNF et NT-4/5,

PERSPECTIVES

sont surexprimées dans les cellules cancéreuses mammaires par rapport aux cellules normales (Vanhecke *et al.*, 2011). La proNT-4/5 ne se lie pas à la sortiline et, jusqu'à présent, aucun effet propre ne lui a été attribué ce qui laisse supposer qu'elle n'a pas d'autre effet que de générer la NT-4/5 mature. En revanche, on peut imaginer que, comme pour le proNGF, le proBDNF puisse jouer un rôle dans le cancer du sein. En effet, le proBDNF peut se lier à la sortiline (Yang *et al.*, 2011), et le récepteur TrkB a été décrit comme pouvant interagir avec les récepteurs EphA (Fitzgerald *et al.*, 2008). Ces données supposent un éventuel effet du proBDNF sur les cellules cancéreuses de sein en utilisant une signalisation similaire à celle du proNGF. Enfin, la proNT-3, quant à elle, peut lier la sortiline pour induire la mort cellulaire (Yano *et al.*, 2009 ; Tauris *et al.*, 2011) mais à l'heure actuelle, aucune étude n'a démontré son implication dans les cancers. Le récepteur TrkC est décrit comme un récepteur à dépendance et sa surexpression, dans les tumeurs mammaires, favorise le développement tumoral en activant les voies PI3-K/Akt et MAPK (Tauszig-Delamasure *et al.*, 2007 ; Jin *et al.*, 2010). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre l'implication des autres proneurotrophines dans le cancer du sein.

III. PRONGF ET RÉSISTANCES THÉRAPEUTIQUES ?

Dans notre étude, le proNGF active l'invasion des cellules cancéreuses de sein, en induisant notamment la phosphorylation de TrkA. Ces données sont très importantes d'un point de vue clinique car nous avons vu précédemment (§II.D.3) que des stratégies thérapeutiques ciblent cette phosphorylation. C'est le cas du lestaurtinib (CEP-701) utilisé en clinique dans les cancers de la prostate pour inhiber l'activité pro-tumorale de TrkA.

Nos résultats suggèrent que le récepteur EphA2 pourrait engager une voie de résistance, impliquant l'activation de Src, lors d'un traitement avec le lestaurtinib. Ainsi, à court-terme, comme nous le voyons dans nos tests d'invasion *in vitro*, dès qu'un des effecteurs des voies de signalisation induites par le proNGF est inhibé, l'effet pro-invasif est aboli. En revanche, à long terme, si la voie dépendante de phospho-TrkA est inhibée (avec le lestaurtinib), la cellule cancéreuse pourrait amplifier la deuxième voie EphA2/Src, indépendante de la phosphorylation de TrkA, pour rétablir le phénotype pro-tumoral. Ces mécanismes sont fréquemment rencontrés dans les cellules cancéreuses exprimant plusieurs RTK à la fois, pour résister aux thérapies ciblées (Stommel *et al.*, 2007 ; Xu & Huang, 2010). Parmi ces mécanismes, le récepteur EphA2 a déjà été décrit pour intervenir

PERSPECTIVES

dans la résistance au trastuzumab (Zhuang *et al.*, 2010). De même, la voie Src est activée à la fois dans les résistances *de novo* et acquises au trastuzumab (Zhang *et al.*, 2011). Cette hypothèse peut être testée en établissant des populations de cellules cancéreuses de sein résistantes au K252a, en présence ou non d'un traitement au proNGF non clivable. Nous pourrions ainsi regarder si la phosphorylation de Src est augmentée dans la population résistante au K252a traitée au proNGF et étudier les capacités pro-tumorales *in vivo* de ces populations.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse a permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'intervention du proNGF dans le cancer du sein. Ainsi, le proNGF est exprimé par les cellules cancéreuses de sein et il induit l'invasion de ces mêmes cellules. Par ailleurs, le proNGF étant sécrété par les cellules cancéreuses, il paraît maintenant primordial d'établir son rôle sur le microenvironnement tumoral et, de manière générale, sur le développement tumoral *in vivo*. De plus, la découverte d'un complexe ternaire sortiline/TrkA/EphA2 remet en question la signalisation du proNGF mais aussi celle du récepteur TrkA. En effet, jusqu'à présent, l'axe NGF/TrkA était considéré comme jouant un rôle majeur dans le développement tumoral du cancer du sein. Par conséquent, de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être pensées, comme la co-administration du lestaurtinib avec des anticorps monoclonaux anti-EphA2 ou avec le dasatinib qui inhibe à la fois Src et EphA2. Ces combinaisons thérapeutiques pourraient avoir un intérêt majeur dans le cancer de la prostate où le récepteur TrkA favorise le développement tumoral et est la cible du lestaurtinib. Dans ce cancer, le proNGF est également produit et sécrété par les cellules et de nombreuses études ont montré le rôle d'EphA2 dans le développement tumoral.

Mes travaux ouvrent ainsi de nouvelles perspectives sur la compréhension des processus cellulaires induits par le récepteur TrkA dans le cancer du sein et dans d'autres cancers mais laissent entrevoir également une modulation des thérapies ciblant la signalisation du récepteur TrkA.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Acconcia F, Sigismund S, Polo S.** (2009). Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp Cell Res* **315**: 1610-1618.
- Adams GP, Weiner LM.** (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **23**: 1147-1157.
- 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.
- Aggarwal BB.** (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**: 745-756.
- Aguilar RC, Wendland B.** (2005). Endocytosis of membrane receptors: two pathways are better than one. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2679-2680.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF.** (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3983-3988.
- Alderson RF, Curtis R, Alterman AL, Lindsay RM, DiStefano PS.** (2000). Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro. *Brain Res* **871**: 210-222.
- Allemand H, Seradour B, Weill A, Ricordeau P.** (2008). [Decline in breast cancer incidence in 2005 and 2006 in France: a paradoxical trend]. *Bull Cancer* **95**: 11-15.
- Allen J, Khwaja F, Byers S, Djakiew D.** (2005). The p75^{NTR} mediates a bifurcated signal transduction cascade through the NF kappa B and JNK pathways to inhibit cell survival. *Exp Cell Res* **304**: 69-80.
- Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN.** (2010). Emerging targeted therapies for breast cancer. *J Clin Oncol* **28**: 3366-3379.
- Ancot F, Foveau B, Lefebvre J, Leroy C, Tulasne D.** (2009). Proteolytic cleavages give receptor tyrosine kinases the gift of ubiquity. *Oncogene* **28**: 2185-2195.
- Angeletti RH, Bradshaw RA.** (1971). Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 2417-2420.
- Anido J, Matar P, Albanell J, Guzman M, Rojo F, Arribas J et al.** (2003). ZD1839, a specific epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, induces the formation of inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 heterodimers and prevents heregulin signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **9**: 1274-1283.
- Arai K, Takano S, Teratani T, Ito Y, Yamada T, Nozawa R.** (2008). S100A8 and S100A9 overexpression is associated with poor pathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast. *Curr Cancer Drug Targets* **8**: 243-252.

BIBLIOGRAPHIE

- 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, Perez P.** (2000). TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* **20**: 5908-5916.
- Arevalo JC, Yano H, Teng KK, Chao MV.** (2004). A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *EMBO J* **23**: 2358-2368.
- Arevalo JC, Pereira DB, Yano H, Teng KK, Chao MV.** (2006a). Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **281**: 1001-1007.
- Arevalo JC, Waite J, Rajagopal R, Beyna M, Chen ZY, Lee FS et al.** (2006b). Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron* **50**: 549-559.
- Arevalo JC, Wu SH.** (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* **63**: 1523-1537.
- Arnold A, Papanikolaou A.** (2005). Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* **23**: 4215-4224.
- Arrighi N, Bodei S, Zani D, Simeone C, Cunico SC, Missale C et al.** (2010). Nerve growth factor signaling in prostate health and disease. *Growth Factors* **28**: 191-201.
- Barde YA, Edgar D, 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, 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, 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, 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.

BIBLIOGRAPHIE

- Barok M, Tanner M, Koninki K, Isola J.** (2011). Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in trastuzumab-resistant breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res* **13**: R46.
- Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J.** (1998). Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* **58**: 2825-2831.
- 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.
- Baselga J, Swain SM.** (2010). CLEOPATRA: a phase III evaluation of pertuzumab and trastuzumab for HER2-positive metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* **10**: 489-491.
- Beattie EC, Howe CL, Wilde A, Brodsky FM, Mobley WC.** (2000). NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *J Neurosci* **20**: 7325-7333.
- Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM et al.** (2002). ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* **36**: 375-386.
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A.** (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* **7**: 857-866.
- 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.
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA.** (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J* **18**: 616-622.
- Bierl MA, Jones EE, Crutcher KA, Isaacson LG.** (2005). 'Mature' nerve growth factor is a minor species in most peripheral tissues. *Neurosci Lett* **380**: 133-137.
- Bilderback TR, Grigsby RJ, 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, 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, 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.

BIBLIOGRAPHIE

- Bjornsti MA, Houghton PJ.** (2004). The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**: 335-348.
- Bloch A, Blumenstein L, Ahmadian MR.** (2004). Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci* **20**: 2321-2335.
- Bloch A, Blochl R.** (2007). A cell-biological model of p75NTR signaling. *J Neurochem* **102**: 289-305.
- Bloom AP, Jimenez-Andrade JM, Taylor RN, Castaneda-Corral G, Kaczmarska MJ, Freeman KT et al.** (2011). Breast cancer-induced bone remodeling, skeletal pain, and sprouting of sensory nerve fibers. *J Pain* **12**: 698-711.
- Bodmer D, Ascano M, Kuruvilla R.** (2011). Isoform-specific dephosphorylation of dynamin1 by calcineurin couples neurotrophin receptor endocytosis to axonal growth. *Neuron* **70**: 1085-1099.
- Bonnet D, Dick JE.** (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**: 730-737.
- Bosco EE, Knudsen ES.** (2007). RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis and treatment. *Cell Cycle* **6**: 667-671.
- Bose CK.** (2005). Role of nerve growth factor and FSH receptor in epithelial ovarian cancer. *Reprod Biomed Online* **11**: 194-197.
- Boutillier J, Ceni C, Pagdala PC, Forgie A, Neet KE, Barker PA.** (2008). Proneurotrophins require endocytosis and intracellular proteolysis to induce TrkA activation. *J Biol Chem* **283**: 12709-12716.
- Bradshaw RA, Murray-Rust J, Ibanez CF, McDonald NQ, Lapatto R, Blundell TL.** (1994). Nerve growth factor: structure/function relationships. *Protein Sci* **3**: 1901-1913.
- Brantley-Sieders DM, Zhuang G, Hicks D, Fang WB, Hwang Y, Cates JM et al.** (2008). The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *J Clin Invest* **118**: 64-78.
- Brennan C, Rivas-Plata K, Landis SC.** (1999). The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons in vivo. *Nat Neurosci* **2**: 699-705.
- Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, 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.

BIBLIOGRAPHIE

- Breuza L, Garcia M, Delgrossi MH, 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.
- Brummer T, Schmitz-Peiffer C, Daly RJ.** (2010). Docking proteins. *FEBS J* **277**: 4356-4369.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS et al.** (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868.
- Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV et al.** (2002). 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* **156**: 817-828.
- Bruno MA, Cuello AC.** (2006). Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6735-6740.
- Burriss HA, 3rd, Tibbitts J, Holden SN, Sliwkowski MX, Lewis Phillips GD.** (2011). Trastuzumab Emtansine (T-DM1): A Novel Agent for Targeting HER2(+) Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*.
- Burstein HJ, Elias AD, Rugo HS, Cobleigh MA, Wolff AC, Eisenberg PD et al.** (2008). Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *J Clin Oncol* **26**: 1810-1816.
- Butowt R, 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.
- Butti MG, Bongarzone I, Ferraresi G, Mondellini P, Borrello MG, Pierotti MA.** (1995). A sequence analysis of the genomic regions involved in the rearrangements between TPM3 and NTRK1 genes producing TRK oncogenes in papillary thyroid carcinomas. *Genomics* **28**: 15-24.
- Cabrera N, Diaz-Rodriguez E, Becker E, Martin-Zanca D, Pandiella A.** (1996). TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment. *J Cell Biol* **132**: 427-436.
- Cain RJ, Ridley AJ.** (2009). Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biol Cell* **101**: 13-29.
- Campbell LL, Polyak K.** (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* **6**: 2332-2338.

BIBLIOGRAPHIE

- Campane M, Bondarenko I, Brincat S, Hotko Y, Munster PN, Chmielowska E et al.** (2011). Phase II study of single-agent bosutinib, a Src/Abl tyrosine kinase inhibitor, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer pretreated with chemotherapy. *Ann Oncol*.
- Campos X, Munoz Y, Selman A, Yazigi R, Moyano L, Weinstein-Oppenheimer C et al.** (2007). Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **104**: 168-175.
- Canuel M, Bhattacharyya N, Balbis A, Yuan L, Morales CR.** (2009). Sortilin and prosaposin localize to detergent-resistant membrane microdomains. *Exp Cell Res* **315**: 240-247.
- Carmeliet P.** (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**: 653-660.
- Casaccia-Bonnet P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV.** (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* **383**: 716-719.
- 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 E, Mulkerin D, Rothenberg M, Holen KD, Lockhart AC, Thomas J et al.** (2008). A phase I trial of CEP-701 + gemcitabine in patients with advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Invest New Drugs* **26**: 241-247.
- Chang CF, Westbrook R, Ma J, Cao D.** (2007). Transforming growth factor-beta signaling in breast cancer. *Front Biosci* **12**: 4393-4401.
- Chang MS, Arevalo JC, Chao MV.** (2004). Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J Neurosci Res* **78**: 186-192.
- 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.
- Chao MV, Hempstead BL.** (1995). p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* **18**: 321-326.
- Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS.** (2008). Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology* **75**: 75-84.
- Chellaiah MA, Schaller MD.** (2009). Activation of Src kinase by protein-tyrosine phosphatase-PEST in osteoclasts: comparative analysis of the effects of bisphosphonate and protein-tyrosine phosphatase inhibitor on Src activation in vitro. *J Cell Physiol* **220**: 382-393.

BIBLIOGRAPHIE

- Chen ZY, Ieraci A, Tanowitz M, Lee FS.** (2005a). A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors. *Mol Biol Cell* **16**: 5761-5772.
- Chen ZY, Ieraci A, Teng H, Dall H, Meng CX, Herrera DG et al.** (2005b). Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J Neurosci* **25**: 6156-6166.
- Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM et al.** (2008). Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med* **205**: 2235-2249.
- Cheung ZH, Ip NY.** (2009). Endophilin B1: Guarding the gate to destruction. *Commun Integr Biol* **2**: 130-132.
- Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, Cantarella G, Bianchi A, Bernardini R.** (2001). Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res* **61**: 3002-3008.
- Clary DO, Reichardt LF.** (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11133-11137.
- Clevers H.** (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* **17**: 313-319.
- Clewes O, Fahey MS, Tyler SJ, Watson JJ, Seok H, Catania C et al.** (2008). Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin. *J Neurochem* **107**: 1124-1135.
- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V.** (1954). A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**: 1014-1018.
- 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.
- Corbit KC, Foster DA, Rosner MR.** (1999). Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* **19**: 4209-4218.
- 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, Bartlett PF.** (2004). The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog Brain Res* **146**: 41-62.

BIBLIOGRAPHIE

- Covaceuszach S, Capsoni S, Ugolini G, Spirito F, Vignone D, Cattaneo A.** (2009). Development of a non invasive NGF-based therapy for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **6**: 158-170.
- D'Onofrio M, Paoletti F, Arisi I, Brandi R, Malerba F, Fasulo L et al.** (2011). NGF and proNGF regulate functionally distinct mRNAs in PC12 cells: an early gene expression profiling. *PLoS One* **6**: e20839.
- Dail M, Kalo MS, Seddon JA, Cote JF, Vuori K, Pasquale EB.** (2004). SHEP1 function in cell migration is impaired by a single amino acid mutation that disrupts association with the scaffolding protein cas but not with Ras GTPases. *J Biol Chem* **279**: 41892-41902.
- Dancey J.** (2010). mTOR signaling and drug development in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **7**: 209-219.
- Dang C, Zhang Y, Ma Q, 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.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y et al.** (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**: 231-241.
- Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Nesland JM, Skrede M, Risberg B et al.** (2003). Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**: 2248-2259.
- Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Ann Florenes V, Nielsen S, Nesland JM.** (2004). Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* **83**: 119-128.
- de Pablo Y, Perez-Garcia MJ, Georgieva MV, Sanchis D, Lindqvist N, Soler RM et al.** (2008). Tyr-701 is a new regulatory site for neurotrophin receptor TrkA trafficking and function. *J Neurochem* **104**: 124-139.
- de Visser KE, Eichten A, Coussens LM.** (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* **6**: 24-37.
- Dean-Colomb W, Esteva FJ.** (2008). Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. *Eur J Cancer* **44**: 2806-2812.
- Delcroix JD, Valletta JS, Wu C, Hunt SJ, Kowal AS, Mobley WC.** (2003). NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* **39**: 69-84.
- Delsite R, Djakiew D.** (1999). Characterization of nerve growth factor precursor protein expression by human prostate stromal cells: a role in selective neurotrophin stimulation of prostate epithelial cell growth. *Prostate* **41**: 39-48.

BIBLIOGRAPHIE

- Descamps S, Lebourhis X, Delehedde M, Boilly B, Hondermarck H.** (1998). Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J Biol Chem* **273**: 16659-16662.
- 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.
- Diaz-Rodriguez E, Cabrera N, Esparis-Ogando A, Montero JC, Pandiella A.** (1999). Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *Eur J Neurosci* **11**: 1421-1430.
- Dicou E.** (2008). High levels of the proNGF peptides LIP1 and LIP2 in the serum and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients: evidence for two new cytokines. *J Neuroimmunol* **194**: 143-146.
- Dillon RL, Muller WJ.** (2010). Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res* **70**: 4260-4264.
- Ding Q, Ying Z, Gomez-Pinilla F.** (2011). Exercise influences hippocampal plasticity by modulating brain-derived neurotrophic factor processing. *Neuroscience* **192**: 773-780.
- Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B et al.** (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res* **71**: 2455-2465.
- Djakiew D.** (1992). Role of nerve growth factor-like protein in the paracrine regulation of prostate growth. *J Androl* **13**: 476-487.
- Djakiew D, Pflug BR, Delsite R, Onoda M, Lynch JH, Arand G et al.** (1993). Chemotaxis and chemokinesis of human prostate tumor cell lines in response to human prostate stromal cell secretory proteins containing a nerve growth factor-like protein. *Cancer Res* **53**: 1416-1420.
- Dolle JP, Rezvan A, Allen FD, Lazarovici P, Lelkes PI.** (2005). 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, Hondermarck H.** (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* **22**: 5592-5601.
- Domeniconi M, Hempstead BL, Chao MV.** (2007). Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death. *Mol Cell Neurosci* **34**: 271-279.

BIBLIOGRAPHIE

- Dubus P, Parrens M, El-Mokhtari Y, Ferrer J, Groppi A, Merlio JP.** (2000). Identification of novel trkA variants with deletions in leucine-rich motifs of the extracellular domain. *J Neuroimmunol* **107**: 42-49.
- El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Dolle L, Descamps S, 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.
- Elenbaas B, Weinberg RA.** (2001). Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* **264**: 169-184.
- Epa WR, Markovska K, Barrett GL.** (2004). The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation. *J Neurochem* **89**: 344-353.
- Eposito 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.
- Evans SF, Irmady K, Ostrow K, Kim T, Nykjaer A, Saftig P et al.** (2011). Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation. *J Biol Chem* **286**: 29556-29567.
- Eveleth DD, Bradshaw RA.** (1992). Nerve growth factor nonresponsive pheochromocytoma cells: altered internalization results in signaling dysfunction. *J Cell Biol* **117**: 291-299.
- Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD.** (2001). The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci* **18**: 210-220.
- Fahnestock M, Yu G, Michalski B, Mathew S, Colquhoun A, Ross GM et al.** (2004). The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *J Neurochem* **89**: 581-592.
- Faoro L, Singleton PA, Cervantes GM, Lennon FE, Choong NW, Kanteti R et al.** (2010). EphA2 mutation in lung squamous cell carcinoma promotes increased cell survival, cell invasion, focal adhesions, and mammalian target of rapamycin activation. *J Biol Chem* **285**: 18575-18585.
- Fauchais AL, Lalloue F, Lise MC, Boumediene A, Preud'homme JL, Vidal E et al.** (2008). Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol* **181**: 3027-3038.
- Faux C, Hawadle M, Nixon J, Wallace A, Lee S, Murray S et al.** (2007). PTPsigma binds and dephosphorylates neurotrophin receptors and can suppress NGF-dependent neurite outgrowth from sensory neurons. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1689-1700.

BIBLIOGRAPHIE

- Fayard E, Xue G, Parcellier A, Bozulic L, Hemmings BA.** (2010). Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr Top Microbiol Immunol* **346**: 31-56.
- Feng D, Kim T, Ozkan E, Light M, Torkin R, Teng KK et al.** (2010). Molecular and structural insight into proNGF engagement of p75NTR and sortilin. *J Mol Biol* **396**: 967-984.
- Ferrandina G, Scambia G, Bardelli F, Benedetti Panici P, Mancuso S, Messori A.** (1997). Relationship between cathepsin-D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patients: a meta-analysis. *Br J Cancer* **76**: 661-666.
- 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.
- Festuccia C, Gravina GL, Muzi P, Millimaggi D, Dolo V, Vicentini C et al.** (2009). Her2 crosstalks with TrkA in a subset of prostate cancer cells: rationale for a guided dual treatment. *Prostate* **69**: 337-345.
- Finger C, Escher C, Schneider D.** (2009). The single transmembrane domains of human receptor tyrosine kinases encode self-interactions. *Sci Signal* **2**: ra56.
- Finn RS, Dering J, Ginther C, Wilson CA, Glaspy P, Tchekmedyian N et al.** (2007). Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro. *Breast Cancer Res Treat* **105**: 319-326.
- Finn RS, Bengala C, Ibrahim N, Roche H, Sparano J, Strauss LC et al.** (2011). Dasatinib as a Single Agent in Triple-Negative Breast Cancer: Results of an Open-Label Phase 2 Study. *Clin Cancer Res* **17**: 6905-6913.
- Fitzgerald M, Buckley A, Lukehurst SS, Dunlop SA, Beazley LD, Rodger J.** (2008). Neurite responses to ephrin-A5 modulated by BDNF: evidence for TrkB-EphA interactions. *Biochem Biophys Res Commun* **374**: 625-630.
- Fleishman SJ, Schlessinger J, Ben-Tal N.** (2002). A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15937-15940.
- Foehr ED, Lin X, O'Mahony A, Gelezianus R, Bradshaw RA, 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.
- Fornier MN, Morris PG, Abbruzzi A, D'Andrea G, Gilewski T, Bromberg J et al.** (2011). A phase I study of dasatinib and weekly paclitaxel for metastatic breast cancer. *Ann Oncol*.
- Friedman WJ, Greene LA.** (1999). Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res* **253**: 131-142.

BIBLIOGRAPHIE

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

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

Garton AJ, Flint AJ, Tonks NK. (1996). Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Mol Cell Biol* **16**: 6408-6418.

Gatzinsky KP, Haugland RP, Thrasivoulou C, Orike N, Budi-Santoso AW, Cowen T. (2001). p75 and TrkA receptors are both required for uptake of NGF in adult sympathetic neurons: use of a novel fluorescent NGF conjugate. *Brain Res* **920**: 226-238.

Geetha T, Wooten MW. (2003). Association of the atypical protein kinase C-interacting protein p62/ZIP with nerve growth factor receptor TrkA regulates receptor trafficking and Erk5 signaling. *J Biol Chem* **278**: 4730-4739.

Geetha T, Jiang J, Wooten MW. (2005). Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* **20**: 301-312.

Geetha T, Seibenhener ML, Chen L, Madura K, Wooten MW. (2008). p62 serves as a shuttling factor for TrkA interaction with the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **374**: 33-37.

Geetha T, Wooten MW. (2008). TrkA receptor endolysosomal degradation is both ubiquitin and proteasome dependent. *Traffic* **9**: 1146-1156.

Gent J, van Kerkhof P, Roza M, Bu G, Strous GJ. (2002). Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for ubiquitin system-dependent endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9858-9863.

George DJ, Dionne CA, Jani J, Angeles T, Murakata C, Lamb J et al. (1999). Sustained in vivo regression of Dunning H rat prostate cancers treated with combinations of androgen ablation and Trk tyrosine kinase inhibitors, CEP-751 (KT-6587) or CEP-701 (KT-5555). *Cancer Res* **59**: 2395-2401.

Georgieva MV, de Pablo Y, Sanchis D, Comella JX, Llovera M. (2011). Ubiquitination of TrkA by Nedd4-2 regulates receptor lysosomal targeting and mediates receptor signaling. *J Neurochem* **117**: 479-493.

Goldsmith BA, Koizumi S. (1997). Transient association of the phosphotyrosine phosphatase SHP-2 with TrkA is induced by nerve growth factor. *J Neurochem* **69**: 1014-1019.

Gong Y, Cao P, Yu HJ, Jiang T. (2008). Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex. *Nature* **454**: 789-793.

Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. (2007). Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* **608**: 1-22.

BIBLIOGRAPHIE

- Goretzki PE, Wahl RA, Becker R, Koller C, Branscheid D, Grussendorf M et al.** (1987). Nerve growth factor (NGF) sensitizes human medullary thyroid carcinoma (hMTC) cells for cytostatic therapy in vitro. *Surgery* **102**: 1035-1042.
- Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ et al.** (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res* **65**: 5278-5283.
- Gotoh N.** (2008). Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins. *Cancer Sci* **99**: 1319-1325.
- Greco A, Miranda C, Pierotti MA.** (2010). Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* **321**: 44-49.
- Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, Valletta JS et al.** (1996). Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci* **16**: 7950-7964.
- Guertin DA, Sabatini DM.** (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* **12**: 9-22.
- Hahn WC, Weinberg RA.** (2002). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* **347**: 1593-1603.
- Hallbook F, Ibanez CF, Persson H.** (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary. *Neuron* **6**: 845-858.
- Hanahan D, Weinberg RA.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.
- Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Morl K et al.** (2004). Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6226-6230.
- Hasan W, Pedchenko T, Krizsan-Agbas D, Baum L, Smith PG.** (2003). Sympathetic neurons synthesize and secrete pro-nerve growth factor protein. *J Neurobiol* **57**: 38-53.
- Hauburger A, Kliemannel M, Madsen P, Rudolph R, Schwarz E.** (2007). Oxidative folding of nerve growth factor can be mediated by the pro-peptide of neurotrophin-3. *FEBS Lett* **581**: 4159-4164.
- He XL, Garcia KC.** (2004). Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* **304**: 870-875.
- Head J, Johnston SR.** (2004). New targets for therapy in breast cancer: farnesyltransferase inhibitors. *Breast Cancer Res* **6**: 262-268.

BIBLIOGRAPHIE

- Heerssen HM, Pazyra MF, Segal RA.** (2004). Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons. *Nat Neurosci* **7**: 596-604.
- Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV.** (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* **350**: 678-683.
- Hempstead BL, Rabin SJ, Kaplan L, Reid S, Parada LF, Kaplan DR.** (1992). Overexpression of the trk tyrosine kinase rapidly accelerates nerve growth factor-induced differentiation. *Neuron* **9**: 883-896.
- Hermey G, Sjogaard SS, Petersen CM, Nykjaer A, Gliemann J.** (2006). Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members. *Biochem J* **395**: 285-293.
- Hermey G.** (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cell Mol Life Sci* **66**: 2677-2689.
- Herrup K, Shooter EM.** (1973). Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 3884-3888.
- Heymach JV, Jr., Shooter EM.** (1995). The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected mammalian cells. *J Biol Chem* **270**: 12297-12304.
- Higuchi H, Yamashita T, Yoshikawa H, Tohyama M.** (2003). PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts. *EMBO J* **22**: 1790-1800.
- Hisata S, Sakisaka T, Baba T, Yamada T, Aoki K, Matsuda M et al.** (2007). Rap1-PDZ-GEF1 interacts with a neurotrophin receptor at late endosomes, leading to sustained activation of Rap1 and ERK and neurite outgrowth. *J Cell Biol* **178**: 843-860.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA.** (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* **344**: 339-341.
- Holden PH, Asopa V, Robertson AG, Clarke AR, Tyler S, Bennett GS et al.** (1997). Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor. *Nat Biotechnol* **15**: 668-672.
- Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emlet DR, Dieterich R, Wong AJ.** (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12419-12424.
- Holland PM, Miller R, Jones J, Douangpanya H, Piasecki J, Roudier M et al.** (2010). Combined therapy with the RANKL inhibitor RANK-Fc and rhApo2L/TRAIL/dulanermin reduces bone lesions and skeletal tumor burden in a model of breast cancer skeletal metastasis. *Cancer Biol Ther* **9**: 539-550.

BIBLIOGRAPHIE

- Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC.** (2001). NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* **32**: 801-814.
- Huang CS, Zhou J, Feng AK, Lynch CC, Klumperman J, DeArmond SJ et al.** (1999). Nerve growth factor signaling in caveolae-like domains at the plasma membrane. *J Biol Chem* **274**: 36707-36714.
- Huang EJ, Reichardt LF.** (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* **72**: 609-642.
- Huang PH, Mukasa A, Bonavia R, Flynn RA, Brewer ZE, Cavenee WK et al.** (2007). Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12867-12872.
- Huang X, Gao L, Wang S, McManaman JL, Thor AD, Yang X et al.** (2010). Heterotrimerization of the growth factor receptors erbB2, erbB3, and insulin-like growth factor-1 receptor in breast cancer cells resistant to herceptin. *Cancer Res* **70**: 1204-1214.
- Hung AY, Sheng M.** (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* **277**: 5699-5702.
- Hunter T.** (1997). Oncoprotein networks. *Cell* **88**: 333-346.
- Iacarusso MF, Galli S, Marti M, Villalta JI, Estrin DA, Jares-Erijman EA et al.** (2011). Structural Model for p75(NTR)-TrkA Intracellular Domain Interaction: A Combined FRET and Bioinformatics Study. *J Mol Biol* **414**: 681-698.
- 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.
- Iyengar P, Espina V, Williams TW, Lin Y, Berry D, Jelicks LA et al.** (2005). Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest* **115**: 1163-1176.
- Iyer R, Evans AE, Qi X, Ho R, Minturn JE, Zhao H et al.** (2010). Lestaurtinib enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in murine xenograft models of neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **16**: 1478-1485.
- Jadhav T, Geetha T, Jiang J, Wooten MW.** (2008). Identification of a consensus site for TRAF6/p62 polyubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* **371**: 521-524.
- Jin W, Kim GM, Kim MS, Lim MH, Yun C, Jeong J et al.** (2010). TrkC plays an essential role in breast tumor growth and metastasis. *Carcinogenesis* **31**: 1939-1947.
- 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.

BIBLIOGRAPHIE

- Jones KR, Reichardt LF.** (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8060-8064.
- Joyce JA.** (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **7**: 513-520.
- Joyce JA, Pollard JW.** (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* **9**: 239-252.
- Jullien J, Guili V, Reichardt LF, Rudkin BB.** (2002). Molecular kinetics of nerve growth factor receptor trafficking and activation. *J Biol Chem* **277**: 38700-38708.
- Jullien J, Guili V, Derrington EA, Darlix JL, Reichardt LF, Rudkin BB.** (2003). Trafficking of TrkA-green fluorescent protein chimerae during nerve growth factor-induced differentiation. *J Biol Chem* **278**: 8706-8716.
- Jung EJ, Kim CW.** (2010). Caveolin-1 inhibits TrkA-induced cell death by influencing on TrkA modification associated with tyrosine-490 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **402**: 736-741.
- Jung KM, Tan S, Landman N, Petrova K, Murray S, Lewis R et al.** (2003). Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J Biol Chem* **278**: 42161-42169.
- Kahle P, Barker PA, Shooter EM, Hertel C.** (1994). p75 nerve growth factor receptor modulates p140trkA kinase activity, but not ligand internalization, in PC12 cells. *J Neurosci Res* **38**: 599-606.
- Kanning KC, Hudson M, Amieux PS, Wiley JC, Bothwell M, 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.
- Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE.** (2001). Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* **276**: 18169-18177.
- Kendall TJ, Henedige S, Aucott RL, Hartland SN, Vernon MA, Benyon RC et al.** (2009). p75 Neurotrophin receptor signaling regulates hepatic myofibroblast proliferation and apoptosis in recovery from rodent liver fibrosis. *Hepatology* **49**: 901-910.
- Kendrick JE, Estes JM, Straughn JM, Jr., Alvarez RD, Buchsbaum DJ.** (2007). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its therapeutic potential in breast and gynecologic cancers. *Gynecol Oncol* **106**: 614-621.
- Khwaja F, Tabassum A, Allen J, 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 T, Hempstead BL.** (2009). NRH2 is a trafficking switch to regulate sortilin localization and permit proneurotrophin-induced cell death. *EMBO J* **28**: 1612-1623.

BIBLIOGRAPHIE

- Kim UH, Fink D, Jr., Kim HS, Park DJ, Contreras ML, Guroff G et al.** (1991). Nerve growth factor stimulates phosphorylation of phospholipase C-gamma in PC12 cells. *J Biol Chem* **266**: 1359-1362.
- Kleer CG, Bloushtain-Qimron N, Chen YH, Carrasco D, Hu M, Yao J et al.** (2008). Epithelial and stromal cathepsin K and CXCL14 expression in breast tumor progression. *Clin Cancer Res* **14**: 5357-5367.
- Klein R, Parada LF, Coulier F, 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, 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.
- Klein R, Lamballe F, Bryant S, Barbacid M.** (1992). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* **8**: 947-956.
- Kleinsmith LJ, Pierce GB, Jr.** (1964). Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res* **24**: 1544-1551.
- Kliemann M, Rattenholl A, Golbik R, Balbach J, Lilie H, Rudolph R et al.** (2004). The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS Lett* **566**: 207-212.
- Kliemann M, Golbik R, Rudolph R, Schwarz E, Lilie H.** (2007). The pro-peptide of proNGF: structure formation and intramolecular association with NGF. *Protein Sci* **16**: 411-419.
- Knudson AG.** (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* **1**: 157-162.
- Kogner P, Barbany G, Dominici C, Castello MA, Raschella G, Persson H.** (1993). Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res* **53**: 2044-2050.
- Kommaddi RP, Thomas R, Ceni C, Daigneault K, Barker PA.** (2011). Trk-dependent ADAM17 activation facilitates neurotrophin survival signaling. *FASEB J* **25**: 2061-2070.
- Kondo T, Setoguchi T, 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.
- Kong H, Boulter J, Weber JL, Lai C, Chao MV.** (2001). An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci* **21**: 176-185.

BIBLIOGRAPHIE

- Korhonen JM, Said FA, Wong AJ, Kaplan DR.** (1999). Gab1 mediates neurite outgrowth, DNA synthesis, and survival in PC12 cells. *J Biol Chem* **274**: 37307-37314.
- Kouniavsky G, Zeiger MA.** (2010). Thyroid tumorigenesis and molecular markers in thyroid cancer. *Curr Opin Oncol* **22**: 23-29.
- 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.
- Kuruvilla R, Zweifel LS, Glebova NO, Lonze BE, Valdez G, Ye H et al.** (2004). A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell* **118**: 243-255.
- Lachance C, Belliveau DJ, 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.
- Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G.** (2006). p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer* **13**: 293-325.
- Lad SP, Peterson DA, Bradshaw RA, 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.
- Lae M, Freneaux P, Sastre-Garau X, Chouchane O, Sigal-Zafrani B, Vincent-Salomon A.** (2009). Secretory breast carcinomas with ETV6-NTRK3 fusion gene belong to the basal-like carcinoma spectrum. *Mod Pathol* **22**: 291-298.
- 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.
- Lamballe F, Klein R, 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.
- 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.
- Larsen AB, Pedersen MW, Stockhausen MT, Grandal MV, van Deurs B, Poulsen HS.** (2007). Activation of the EGFR gene target EphA2 inhibits epidermal growth factor-induced cancer cell motility. *Mol Cancer Res* **5**: 283-293.

BIBLIOGRAPHIE

- Latz E, Verma A, Visintin A, Gong M, Sirois CM, Klein DC et al.** (2007). Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* **8**: 772-779.
- Le Bourhis X, Toillon RA, Boilly B, Hondermarck H.** (2000). Autocrine and paracrine growth inhibitors of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **60**: 251-258.
- Lebrun-Julien F, Bertrand MJ, De Backer O, Stellwagen D, Morales CR, Di Polo A et al.** (2010). ProNGF induces TNFalpha-dependent death of retinal ganglion cells through a p75NTR non-cell-autonomous signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 3817-3822.
- Lee EY, Muller WJ.** (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a003236.
- Lee FS, Chao MV.** (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3555-3560.
- Lee FS, Rajagopal R, Chao MV.** (2002a). Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**: 11-17.
- Lee FS, Rajagopal R, Kim AH, Chang PC, Chao MV.** (2002b). Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *J Biol Chem* **277**: 9096-9102.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL.** (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**: 1945-1948.
- Lemmon MA, Schlessinger J.** (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**: 1117-1134.
- Levis M, Ravandi F, Wang ES, Baer MR, Perl A, Coutre S et al.** (2011). Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. *Blood* **117**: 3294-3301.
- Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E et al.** (2008). Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res* **68**: 9280-9290.
- Li C, Macdonald JI, Hryciw T, Meakin SO.** (2010a). Nerve growth factor activation of the TrkA receptor induces cell death, by macropinocytosis, in medulloblastoma Daoy cells. *J Neurochem* **112**: 882-899.
- Li T, Christos PJ, Sparano JA, Hershman DL, Hoschander S, O'Brien K et al.** (2009a). Phase II trial of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib plus fulvestrant in hormone receptor-positive metastatic breast cancer: New York Cancer Consortium Trial P6205. *Ann Oncol* **20**: 642-647.

BIBLIOGRAPHIE

- Li W, Shi L, You Y, Gong Y, Yin B, Yuan J et al.** (2010b). Downstream of tyrosine kinase/docking protein 6, as a novel substrate of tropomyosin-related kinase C receptor, is involved in neurotrophin 3-mediated neurite outgrowth in mouse cortex neurons. *BMC Biol* **8**: 86.
- Li Y, Zhang T, Schwartz SJ, Sun D.** (2009b). New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential. *Drug Resist Updat* **12**: 17-27.
- Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF.** (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* **16**: 4999-5005.
- Lin BZ, Pilch PF, Kandrор KV.** (1997). Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem* **272**: 24145-24147.
- Lin DC, Quevedo C, Brewer NE, Bell A, Testa JR, Grimes ML et al.** (2006). APPL1 associates with TrkA and GIPC1 and is required for nerve growth factor-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol* **26**: 8928-8941.
- Liu J, Lamb D, Chou MM, Liu YJ, Li G.** (2007). Nerve growth factor-mediated neurite outgrowth via regulation of Rab5. *Mol Biol Cell* **18**: 1375-1384.
- Lock LS, Royal I, Naujokas MA, Park M.** (2000). Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals Grb2-dependent and -independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* **275**: 31536-31545.
- Loeb DM, Maragos J, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF, Greene LA.** (1991). The trk proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF-nonresponsive PC12 cell lines. *Cell* **66**: 961-966.
- Loeb DM, Greene LA.** (1993). Transfection with trk restores "slow" NGF binding, efficient NGF uptake, and multiple NGF responses to NGF-nonresponsive PC12 cell mutants. *J Neurosci* **13**: 2919-2929.
- Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K et al.** (2004). Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* **47**: 6658-6661.
- Lu B, Pang PT, Woo NH.** (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* **6**: 603-614.
- Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M.** (2001). Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* **93**: 1852-1857.

BIBLIOGRAPHIE

- Ma WY, Murata E, Ueda K, Kuroda Y, Cao MH, Abe M *et al.*** (2010). A synthetic cell-penetrating peptide antagonizing TrkA function suppresses neuropathic pain in mice. *J Pharmacol Sci* **114**: 79-84.
- MacDonald JI, Meakin SO.** (1996). Deletions in the extracellular domain of rat trkA lead to an altered differentiative phenotype in neurotrophin responsive cells. *Mol Cell Neurosci* **7**: 371-390.
- MacPhee IJ, Barker PA.** (1997). Brain-derived neurotrophic factor binding to the p75 neurotrophin receptor reduces TrkA signaling while increasing serine phosphorylation in the TrkA intracellular domain. *J Biol Chem* **272**: 23547-23551.
- Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, 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.
- 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.
- Makkerh JP, Ceni C, Auld DS, Vaillancourt F, Dorval G, Barker PA.** (2005). p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep* **6**: 936-941.
- Malin D, Chen F, Schiller C, Koblinski J, Cryns VL.** (2011). Enhanced Metastasis Suppression by Targeting TRAIL Receptor 2 in a Murine Model of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **17**: 5005-5015.
- Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, Bronte V.** (2008). Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev* **222**: 162-179.
- Marsh HN, Dubreuil CI, Quevedo C, Lee A, Majdan M, Walsh GS *et al.*** (2003). SHP-1 negatively regulates neuronal survival by functioning as a TrkA phosphatase. *J Cell Biol* **163**: 999-1010.
- Marshall CJ.** (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-185.
- Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M.** (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* **319**: 743-748.
- Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T, Barbacid M.** (1989). Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol* **9**: 24-33.
- Martin LA, Head JE, Pancholi S, Salter J, Quinn E, Detre S *et al.*** (2007). The farnesyltransferase inhibitor R115777 (tipifarnib) in combination with tamoxifen acts synergistically to inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation and cell cycle progression in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **6**: 2458-2467.

BIBLIOGRAPHIE

- Martin S, Navarro V, Vincent JP, Mazella J.** (2002). Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* **123**: 1135-1143.
- Masoudi R, Ioannou MS, Coughlin MD, Pagadala P, Neet KE, Clewes O et al.** (2009). Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors. *J Biol Chem* **284**: 18424-18433.
- Matrone C, Marolda R, Ciafre S, Ciotti MT, Mercanti D, Calissano P.** (2009). Tyrosine kinase nerve growth factor receptor switches from prosurvival to proapoptotic activity via Abeta-mediated phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 11358-11363.
- Maurer G, Tarkowski B, Baccharini M.** (2011). Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene* **30**: 3477-3488.
- Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia-Closas M.** (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol* **4**: 174-191.
- 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.
- Mayer EL, Krop IE.** (2010). Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies. *Clin Cancer Res* **16**: 3526-3532.
- Mayer EL, Baurain JF, Sparano J, Strauss L, Campone M, Fumoleau P et al.** (2011). A Phase 2 Trial of Dasatinib in Patients with Advanced HER2-Positive and/or Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **17**: 6897-6904.
- Mazella J, Zsurger N, Navarro V, Chabry J, Kaghad M, Caput D et al.** (1998). The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **273**: 26273-26276.
- Mazella J.** (2001). Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* **13**: 1-6.
- Mazzoni IE, Said FA, Aloyz R, Miller FD, Kaplan D.** (1999). Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J Neurosci* **19**: 9716-9727.
- McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL.** (1991). New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* **354**: 411-414.
- McDonald NQ, Hendrickson WA.** (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* **73**: 421-424.
- Meakin SO, MacDonald JI, Gryz EA, Kubu CJ, Verdi JM.** (1999). The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA. A model for discriminating proliferation and differentiation. *J Biol Chem* **274**: 9861-9870.

BIBLIOGRAPHIE

- Melck D, De Petrocellis L, Orlando P, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M et al.** (2000). Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology* **141**: 118-126.
- Mercurio AM, Lipscomb EA, Bachelder RE.** (2005). Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**: 283-290.
- Miao H, Li DQ, Mukherjee A, Guo H, Petty A, Cutter J et al.** (2009). EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer Cell* **16**: 9-20.
- Mijatovic T, Gailly P, Mathieu V, De Neve N, Yeaton P, Kiss R et al.** (2007). Neurotensin is a versatile modulator of in vitro human pancreatic ductal adenocarcinoma cell (PDAC) migration. *Cell Oncol* **29**: 315-326.
- Miknyoczki SJ, Chang H, Klein-Szanto A, Dionne CA, Ruggeri BA.** (1999). The Trk tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits significant antitumor efficacy in preclinical xenograft models of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **5**: 2205-2212.
- 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.
- Minturn JE, Evans AE, Villablanca JG, Yanik GA, Park JR, Shusterman S et al.** (2011). Phase I trial of lestaurtinib for children with refractory neuroblastoma: a new approaches to neuroblastoma therapy consortium study. *Cancer Chemother Pharmacol* **68**: 1057-1065.
- Miranda C, Greco A, Miele C, Pierotti MA, Van Obberghen E.** (2001). IRS-1 and IRS-2 are recruited by TrkA receptor and oncogenic TRK-T1. *J Cell Physiol* **186**: 35-46.
- Mitchell K, Svenson KB, Longmate WM, Gkirtzimanaki K, Sadej R, Wang X et al.** (2010). Suppression of integrin alpha3beta1 in breast cancer cells reduces cyclooxygenase-2 gene expression and inhibits tumorigenesis, invasion, and cross-talk to endothelial cells. *Cancer Res* **70**: 6359-6367.
- Mitra G.** (1991). Mutational analysis of conserved residues in the tyrosine kinase domain of the human trk oncogene. *Oncogene* **6**: 2237-2241.
- 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.

BIBLIOGRAPHIE

- Moises T, Wuller S, Saxena S, Senderek J, Weis J, Kruttgen A.** (2009). Proteasomal inhibition alters the trafficking of the neurotrophin receptor TrkA. *Biochem Biophys Res Commun* **387**: 360-364.
- Montano X.** (2009). Repression of SHP-1 expression by p53 leads to trkA tyrosine phosphorylation and suppression of breast cancer cell proliferation. *Oncogene* **28**: 3787-3800.
- 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.
- Moriki T, Maruyama H, Maruyama IN.** (2001). Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol* **311**: 1011-1026.
- Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL.** (2001). Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **61**: 8887-8895.
- 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.
- Mukhopadhyay UK, Mooney P, Jia L, Eves R, Raptis L, Mak AS.** (2010). Double game: Src-Stat3 versus p53-PTEN in cellular migration and invasion. *Mol Cell Biol* **30**: 4980-4995.
- 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.
- Murphy DA, Courtneidge SA.** (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 413-426.
- Murray SS, Perez P, Lee R, Hempstead BL, Chao MV.** (2004). A novel p75 neurotrophin receptor-related protein, NRH2, regulates nerve growth factor binding to the TrkA receptor. *J Neurosci* **24**: 2742-2749.
- Muthuswamy SK.** (2011). Trastuzumab resistance: all roads lead to SRC. *Nat Med* **17**: 416-418.
- Naderi A, 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.

BIBLIOGRAPHIE

- Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV, Jr., Yang J, Hempstead BL, Lu B.** (2009). Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1267-1272.
- Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA et al.** (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* **6**: 117-127.
- Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J et al.** (2005). Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* **65**: 473-482.
- Nakagawara A, Arima M, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM.** (1992). Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res* **52**: 1364-1368.
- Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM.** (1993). Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* **328**: 847-854.
- Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM.** (1994). Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* **14**: 759-767.
- Nakagawara A, Brodeur GM.** (1997). Role of neurotrophins and their receptors in human neuroblastomas: a primary culture study. *Eur J Cancer* **33**: 2050-2053.
- Nalbandian A, 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.
- Ng YP, Cheung ZH, Ip NY.** (2006). STAT3 as a downstream mediator of Trk signaling and functions. *J Biol Chem* **281**: 15636-15644.
- 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.
- Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS.** (2003). Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* **10**: 1-21.
- 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.
- Norris RE, Minturn JE, Brodeur GM, Maris JM, Adamson PC.** (2011). Preclinical evaluation of lestaurtinib (CEP-701) in combination with retinoids for neuroblastoma. *Cancer Chemother Pharmacol* **68**: 1469-1475.

BIBLIOGRAPHIE

- 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, Petersen CM.** (2005). p75^{NTR}--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* **15**: 49-57.
- Obermeier A, Halfter H, Wiesmuller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A.** (1993a). Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *EMBO J* **12**: 933-941.
- Obermeier A, Lammers R, Wiesmuller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A.** (1993b). Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J Biol Chem* **268**: 22963-22966.
- Odegaard E, Staff AC, Abeler VM, Kopolovic J, Onsrud M, Lazarovici P *et al.*** (2007). The activated nerve growth factor receptor p-TrkA is selectively expressed in advanced-stage ovarian carcinoma. *Hum Pathol* **38**: 140-146.
- Ohmichi M, Decker SJ, Saltiel AR.** (1992). Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by nerve growth factor involves indirect coupling of the trk proto-oncogene with src homology 2 domains. *Neuron* **9**: 769-777.
- Ohmichi M, Pang L, Ribon V, Saltiel AR.** (1993). Divergence of signaling pathways for insulin in PC-12 pheochromocytoma cells. *Endocrinology* **133**: 46-56.
- Ohrt T, Mancini A, Tamura T, Niedenthal R.** (2004). c-Cbl binds to tyrosine-phosphorylated neurotrophin receptor p75 and induces its ubiquitination. *Cell Signal* **16**: 1291-1298.
- Okada Y, Eibl G, Guha S, Duffy JP, Reber HA, Hines OJ.** (2004). Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells. *Clin Exp Metastasis* **21**: 285-292.
- Ong SH, Guy GR, Hadari YR, Laks S, Gotoh N, Schlessinger J *et al.*** (2000). FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol Cell Biol* **20**: 979-989.
- 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, Tripathy D.** (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* **9**: 361-377.
- Paez Pereda M, Missale C, Grubler Y, Arzt E, Schaaf L, Stalla GK.** (2000). Nerve growth factor and retinoic acid inhibit proliferation and invasion in thyroid tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* **167**: 99-106.
- Paiardini A, Caputo V.** (2008). Insights into the interaction of sortilin with proneurotrophins: a computational approach. *Neuropeptides* **42**: 205-214.

BIBLIOGRAPHIE

- Pandey PR, Saidou J, Watabe K.** (2010). Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. *Front Biosci* **15**: 226-236.
- 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.
- Paoletti F, Covaceuszach S, Konarev PV, Gonfloni S, Malerba F, Schwarz E et al.** (2009). Intrinsic structural disorder of mouse proNGF. *Proteins* **75**: 990-1009.
- Paoletti F, Malerba F, Kelly G, Noinville S, Lamba D, Cattaneo A et al.** (2011). Conformational Plasticity of proNGF. *PLoS One* **6**: e22615.
- Papatsoris AG, Liolitsa D, Deliveliotis C.** (2007). Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **16**: 303-309.
- Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, 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.
- Pedraza CE, Podlesniy P, Vidal N, Arevalo JC, Lee R, Hempstead B et al.** (2005). Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *Am J Pathol* **166**: 533-543.
- Peiro S, Comella JX, Enrich C, Martin-Zanca D, Rocamora N.** (2000). PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation. *J Biol Chem* **275**: 37846-37852.
- Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M.** (2004). Increased proNGF levels in subjects with mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**: 641-649.
- 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.
- 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.
- Philippidou P, Valdez G, Akmentin W, Bowers WJ, Federoff HJ, Halegoua S.** (2011). Trk retrograde signaling requires persistent, Pincher-directed endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 852-857.
- Pierotti MA, Greco A.** (2006). Oncogenic rearrangements of the NTRK1/NGF receptor. *Cancer Lett* **232**: 90-98.
- Piiper A, Dikic I, Lutz MP, Leser J, Kronenberger B, Elez R et al.** (2002). Cyclic AMP induces transactivation of the receptors for epidermal growth factor and nerve growth

BIBLIOGRAPHIE

factor, thereby modulating activation of MAP kinase, Akt, and neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem* **277**: 43623-43630.

Pike LJ. (2005). Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta* **1746**: 260-273.

Plo I, Bono F, Bezombes C, Alam A, Bruno A, Laurent G. (2004). Nerve growth factor-induced protein kinase C stimulation contributes to TrkA-dependent inhibition of p75 neurotrophin receptor sphingolipid signaling. *J Neurosci Res* **77**: 465-474.

Polyak K, Hahn WC. (2006). Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* **12**: 296-300.

Polyak K, Kalluri R. (2010). The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a003244.

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.

Powell JC, Twomey C, Jain R, 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, 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.

Qian Y, Takeuchi S, Chen SJ, Dugu L, Tsuji G, Xie L et al. (2010). Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and their high-affinity receptors are overexpressed in extramammary Paget's disease. *J Cutan Pathol* **37**: 1150-1154.

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

Rabbani SA, Mazar AP. (2007). Evaluating distant metastases in breast cancer: from biology to outcomes. *Cancer Metastasis Rev* **26**: 663-674.

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

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

Rahman M, Davis SR, Pumphrey JG, Bao J, Nau MM, Meltzer PS et al. (2009a). TRAIL induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells with a mesenchymal phenotype. *Breast Cancer Res Treat* **113**: 217-230.

BIBLIOGRAPHIE

- Rahman M, Pumphrey JG, Lipkowitz S.** (2009b). The TRAIL to targeted therapy of breast cancer. *Adv Cancer Res* **103**: 43-73.
- Rajagopal R, Chen ZY, Lee FS, Chao MV.** (2004). Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *J Neurosci* **24**: 6650-6658.
- Rajagopal R, Chao MV.** (2006). A role for Fyn in Trk receptor transactivation by G-protein-coupled receptor signaling. *Mol Cell Neurosci* **33**: 36-46.
- Rankin SL, Guy CS, Mearow KM.** (2005). TrkA NGF receptor plays a role in the modulation of p75NTR expression. *Neurosci Lett* **383**: 305-310.
- Rankin SL, Guy CS, Rahimtula M, Mearow KM.** (2008). Neurotrophin-induced upregulation of p75NTR via a protein kinase C-delta-dependent mechanism. *Brain Res* **1217**: 10-24.
- Rattenholl A, Lilie H, Grossmann A, Stern A, Schwarz E, Rudolph R.** (2001a). The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from Escherichia coli inclusion bodies. *Eur J Biochem* **268**: 3296-3303.
- Rattenholl A, Ruoppolo M, Flagiello A, Monti M, Vinci F, Marino G et al.** (2001b). Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *J Mol Biol* **305**: 523-533.
- Reis-Filho JS, Tutt AN.** (2008). Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* **52**: 108-118.
- Reynolds AJ, Bartlett SE, Hendry IA.** (1998). Signalling events regulating the retrograde axonal transport of 125I-beta nerve growth factor in vivo. *Brain Res* **798**: 67-74.
- Reynolds AJ, Hendry IA.** (1999). A technique for 125I-labelling of neurotrophins and the use of retrograde axonal transport as a bioassay. *Brain Res Brain Res Protoc* **3**: 308-312.
- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD.** (1999). Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* **286**: 2358-2361.
- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, 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, 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.
- Rogers ML, Bailey S, Matusica D, Nicholson I, Muyderman H, Pagadala PC et al.** (2010). ProNGF mediates death of Natural Killer cells through activation of the p75NTR-sortilin complex. *J Neuroimmunol* **226**: 93-103.

BIBLIOGRAPHIE

- Romon R, Adriaenssens E, Lagadec C, Germain E, Hondermarck H, Le Bourhis X.** (2010). Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. *Mol Cancer* **9**: 157.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE et al.** (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **353**: 1673-1684.
- Rosario M, Franke R, Bednarski C, Birchmeier W.** (2007). The neurite outgrowth multiadapter RhoGAP, NOMA-GAP, regulates neurite extension through SHP2 and Cdc42. *J Cell Biol* **178**: 503-516.
- Roselli S, Wallez Y, Wang L, Vervoort V, Pasquale EB.** (2010). The SH2 domain protein Shep1 regulates the in vivo signaling function of the scaffolding protein Cas. *Cell Signal* **22**: 1745-1752.
- 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.
- Roux PP, Barker PA.** (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* **67**: 203-233.
- Rusanescu G, Yang W, Bai A, Neel BG, Feig LA.** (2005). Tyrosine phosphatase SHP-2 is a mediator of activity-dependent neuronal excitotoxicity. *EMBO J* **24**: 305-314.
- Russell JP, Powell DJ, Cunnane M, Greco A, Portella G, Santoro M et al.** (2000). The TRK-T1 fusion protein induces neoplastic transformation of thyroid epithelium. *Oncogene* **19**: 5729-5735.
- Ryden M, Hempstead B, 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.
- Sakamoto Y, Kitajima Y, Edakuni G, Sasatomi E, Mori M, Kitahara K et al.** (2001). Expression of Trk tyrosine kinase receptor is a biologic marker for cell proliferation and perineural invasion of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep* **8**: 477-484.
- Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastronardi C et al.** (2006). Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 2396-2403.
- 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.
- Samuels IS, Seibenhener ML, Neidigh KB, Wooten MW.** (2001). Nerve growth factor stimulates the interaction of ZIP/p62 with atypical protein kinase C and targets endosomal

BIBLIOGRAPHIE

localization: evidence for regulation of nerve growth factor-induced differentiation. *J Cell Biochem* **82**: 452-466.

Santos FP, Kantarjian HM, Jain N, Manshour T, Thomas DA, Garcia-Manero G et al. (2010). Phase 2 study of CEP-701, an orally available JAK2 inhibitor, in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *Blood* **115**: 1131-1136.

Saxena S, Howe CL, Cosgaya JM, Steiner P, Hirling H, Chan JR et al. (2005). Differential endocytic sorting of p75NTR and TrkA in response to NGF: a role for late endosomes in TrkA trafficking. *Mol Cell Neurosci* **28**: 571-587.

Schittenhelm MM, Shiraga S, Schroeder A, Corbin AS, Griffith D, Lee FY et al. (2006). Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. *Cancer Res* **66**: 473-481.

Schlessinger J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**: 211-225.

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

Schweigreiter R. (2006). The dual nature of neurotrophins. *Bioessays* **28**: 583-594.

Segal RA, Greenberg ME. (1996). Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* **19**: 463-489.

Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B et al. (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* **314 (Pt 3)**: 951-960.

Serup Andersen O, Boisguerin P, Glerup S, Skeldal S, Volkmer R, Willnow TE et al. (2010). Identification of a linear epitope in sortilin that partakes in pro-neurotrophin binding. *J Biol Chem* **285**: 12210-12222.

Shabbir M, Stuart R. (2010). Lestaurtinib, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor: from bench to bedside. *Expert Opin Investig Drugs* **19**: 427-436.

Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* **138**: 822-829.

Shao Y, Akmentin W, Toledo-Aral JJ, Rosenbaum J, Valdez G, Cabot JB et al. (2002). Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes. *J Cell Biol* **157**: 679-691.

Shen J, Maruyama IN. (2011). Nerve growth factor receptor TrkA exists as a preformed, yet inactive, dimer in living cells. *FEBS Lett* **585**: 295-299.

BIBLIOGRAPHIE

- Shi GX, Jin L, Andres DA.** (2010). Src-dependent TrkA transactivation is required for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38-mediated Rit activation and neuronal differentiation. *Mol Biol Cell* **21**: 1597-1608.
- Shi L, Yue J, You Y, Yin B, Gong Y, Xu C et al.** (2006). Dok5 is substrate of TrkB and TrkC receptors and involved in neurotrophin induced MAPK activation. *Cell Signal* **18**: 1995-2003.
- Shi Y, Mantuano E, Inoue G, Campana WM, Gonias SL.** (2009). Ligand binding to LRP1 transactivates Trk receptors by a Src family kinase-dependent pathway. *Sci Signal* **2**: ra18.
- Shintani T, Maeda N, Noda M.** (2001). Receptor-like protein tyrosine phosphatase gamma (RPTPgamma), but not PTPzeta/RPTPbeta, inhibits nerve-growth-factor-induced neurite outgrowth in PC12D cells. *Dev Neurosci* **23**: 55-69.
- Shintani T, Noda M.** (2008). Protein tyrosine phosphatase receptor type Z dephosphorylates TrkA receptors and attenuates NGF-dependent neurite outgrowth of PC12 cells. *J Biochem* **144**: 259-266.
- Shipitsin M, Polyak K.** (2008). The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Invest* **88**: 459-463.
- Shonukan O, Bagayogo I, McCrea P, Chao M, Hempstead B.** (2003). Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin. *Oncogene* **22**: 3616-3623.
- Siamakpour-Reihani S, Argiros HJ, Wilmeth LJ, Haas LL, Peterson TA, Johnson DL et al.** (2009). The cell migration protein Grb7 associates with transcriptional regulator FHL2 in a Grb7 phosphorylation-dependent manner. *J Mol Recognit* **22**: 9-17.
- Siamakpour-Reihani S, Peterson TA, Bradford AM, Argiros HJ, Haas LL, Lor SN et al.** (2011). Grb7 binds to Hax-1 and undergoes an intramolecular domain association that offers a model for Grb7 regulation. *J Mol Recognit* **24**: 314-321.
- Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C, Transidico P et al.** (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2760-2765.
- Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G.** (2008). Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* **181**: 4666-4675.
- Skeldal S, Matusica D, Nykjaer A, Coulson EJ.** (2011). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75(NTR). *Bioessays* **33**: 614-625.

BIBLIOGRAPHIE

- Smirnov DA, Foulk BW, Doyle GV, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM.** (2006). Global gene expression profiling of circulating endothelial cells in patients with metastatic carcinomas. *Cancer Res* **66**: 2918-2922.
- Sobottka B, Reinhardt D, Brockhaus M, Jacobsen H, Metzger F.** (2008). ProNGF inhibits NGF-mediated TrkA activation in PC12 cells. *J Neurochem* **107**: 1294-1303.
- 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.
- Somai S, Gompel A, Rostene W, Forgez P.** (2002). Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **295**: 482-488.
- Song EJ, Hong HM, Yoo YS.** (2009). Proteasome inhibition induces neurite outgrowth through posttranslational modification of TrkA receptor. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 539-545.
- Song EJ, Yoo YS.** (2011). Nerve growth factor-induced neurite outgrowth is potentiated by stabilization of TrkA receptors. *BMB Rep* **44**: 182-186.
- Song W, Volosin M, Cragolini AB, Hempstead BL, Friedman WJ.** (2010). ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons. *J Neurosci* **30**: 15608-15615.
- 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.
- Sparano JA, Moulder S, Kazi A, Coppola D, Negassa A, Vahdat L et al.** (2009). Phase II trial of tipifarnib plus neoadjuvant doxorubicin-cyclophosphamide in patients with clinical stage IIB-IIIC breast cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 2942-2948.
- Spinnler K, Frohlich T, Arnold GJ, Kunz L, Mayerhofer A.** (2011). Human tryptase cleaves pro-nerve growth factor (pro-NGF): hints of local, mast cell-dependent regulation of NGF/pro-NGF action. *J Biol Chem* **286**: 31707-31713.
- Srinivasan B, Roque CH, Hempstead BL, Al-Ubaidi MR, Roque RS.** (2004). Microglia-derived pronerve growth factor promotes photoreceptor cell death via p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* **279**: 41839-41845.
- Stan RV.** (2005). Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta* **1746**: 334-348.

BIBLIOGRAPHIE

- Stendahl M, Kronblad A, Ryden L, Emdin S, Bengtsson NO, 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.
- Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA, Kaplan DR.** (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* **12**: 691-705.
- Sternlicht MD.** (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* **8**: 201.
- Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, Werb Z.** (2006). Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* **74**: 365-381.
- Stoica G, Lungu G, Kim HT, Wong PK.** (2008). Up-regulation of pro-nerve growth factor, neurotrophin receptor p75, and sortilin is associated with retrovirus-induced spongiform encephalomyelopathy. *Brain Res* **1208**: 204-216.
- Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R et al.** (2007). Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* **318**: 287-290.
- Strauss R, Sova P, Liu Y, Li ZY, Tuve S, Pritchard D et al.** (2009). Epithelial phenotype confers resistance of ovarian cancer cells to oncolytic adenoviruses. *Cancer Res* **69**: 5115-5125.
- Suter U, Heymach JV, Jr., Shooter EM.** (1991). Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *EMBO J* **10**: 2395-2400.
- Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Desantis G, Tessitore A, Vetuschchi 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, Gulino A, Mackay AR.** (2005a). TrkAIII. A novel hypoxia-regulated alternative TrkA splice variant of potential physiological and pathological importance. *Cell Cycle* **4**: 8-9.
- Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Gulino A, Mackay AR.** (2005b). Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. *Future Oncol* **1**: 689-698.
- 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.
- Taddei ML, Parri M, Angelucci A, Bianchini F, Marconi C, Giannoni E et al.** (2011). EphA2 induces metastatic growth regulating amoeboid motility and clonogenic potential in prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Res* **9**: 149-160.

BIBLIOGRAPHIE

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

Takahashi Y, Shimokawa N, Esmaeili-Mahani S, Morita A, Masuda H, Iwasaki T et al. (2011). Ligand-induced downregulation of TrkA is partly regulated through ubiquitination by Cbl. *FEBS Lett* **585**: 1741-1747.

Tao RH, Maruyama IN. (2008). All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. *J Cell Sci* **121**: 3207-3217.

Tapley P, Lamballe F, Barbacid M. (1992). K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* **7**: 371-381.

Tauris J, Gustafsen C, Christensen EI, Jansen P, Nykjaer A, Nyengaard JR et al. (2011). Proneurotrophin-3 may induce Sortilin-dependent death in inner ear neurons. *Eur J Neurosci* **33**: 622-631.

Tauszig-Delamasure S, Yu LY, Cabrera JR, Bouzas-Rodriguez J, Mermut-Bouvier C, Guix C et al. (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13361-13366.

Taylor A, Gifondorwa D, Robinson M, Strupe J, Prevet D, Johnson J et al. (2011). Motoneuron programmed cell death in response to proBDNF. *Dev Neurobiol.*

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.

Thomas SM, DeMarco M, D'Arcangelo G, Halegoua S, Brugge JS. (1992). Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell* **68**: 1031-1040.

Thress K, Macintyre T, Wang H, Whitston D, Liu ZY, Hoffmann E et al. (2009). Identification and preclinical characterization of AZ-23, a novel, selective, and orally bioavailable inhibitor of the Trk kinase pathway. *Mol Cancer Ther* **8**: 1818-1827.

Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D, Roskelley CD, Melnyk N, Mathers JA et al. (2002). Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell* **2**: 367-376.

Tognon CE, Somasiri AM, Evdokimova VE, Trigo G, Uy EE, Melnyk N et al. (2011). ETV6-NTRK3-mediated breast epithelial cell transformation is blocked by targeting the IGF1R signaling pathway. *Cancer Res* **71**: 1060-1070.

Toillon RA, Lagadec C, Page A, Chopin V, Sautiere PE, Ricort JM et al. (2007). Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1239-1247.

BIBLIOGRAPHIE

- Traenka C, Remke M, Korshunov A, Bender S, Hielscher T, Northcott PA et al.** (2010). Role of LIM and SH3 protein 1 (LASP1) in the metastatic dissemination of medulloblastoma. *Cancer Res* **70**: 8003-8014.
- Troppmair J, Bruder JT, App H, Cai H, Liptak L, Szeberenyi J et al.** (1992). Ras controls coupling of growth factor receptors and protein kinase C in the membrane to Raf-1 and B-Raf protein serine kinases in the cytosol. *Oncogene* **7**: 1867-1873.
- 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.
- Twiss JL, Wada HG, Fok KS, Chan SD, Verity AN, Baxter GT et al.** (1998). Duration and magnitude of nerve growth factor signaling depend on the ratio of p75LNTR to TrkA. *J Neurosci Res* **51**: 442-453.
- Tzachanis D, Berezovskaya A, Nadler LM, Boussiotis VA.** (2002). Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood* **99**: 1465-1473.
- Udayakumar D, Zhang G, Ji Z, Njauw CN, Mroz P, Tsao H.** (2011). EphA2 is a critical oncogene in melanoma. *Oncogene* **30**: 4921-4929.
- Ultsch MH, Wiesmann C, Simmons LC, Henrich J, Yang M, Reilly D et al.** (1999). Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J Mol Biol* **290**: 149-159.
- Underwood CK, Reid K, May LM, Bartlett PF, Coulson EJ.** (2008). Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase. *Mol Cell Neurosci* **37**: 346-358.
- Urdiales JL, Becker E, Andrieu M, Thomas A, Jullien J, van Grunsven LA et al.** (1998). Cell cycle phase-specific surface expression of nerve growth factor receptors TrkA and p75(NTR). *J Neurosci* **18**: 6767-6775.
- Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Shelton DL, Parada LF, Presta LG.** (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J* **14**: 2795-2805.
- Urrea S, Escudero CA, Ramos P, Lisbona F, Allende E, Covarrubias P et al.** (2007). TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal gamma-secretase-mediated release of the p75 intracellular domain. *J Biol Chem* **282**: 7606-7615.
- Vaegter CB, Jansen P, Fjorback AW, Glerup S, Skeldal S, Kjolby M et al.** (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat Neurosci* **14**: 54-61.

BIBLIOGRAPHIE

- Valdez G, Akmentin W, Philippidou P, Kuruvilla R, Ginty DD, Halegoua S.** (2005). Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors. *J Neurosci* **25**: 5236-5247.
- Valdez G, Philippidou P, Rosenbaum J, Akmentin W, Shao Y, Halegoua S.** (2007). Trk-signaling endosomes are generated by Rac-dependent macroendocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12270-12275.
- Van Kanegan MJ, Strack S.** (2009). The protein phosphatase 2A regulatory subunits B β and B δ mediate sustained TrkA neurotrophin receptor autophosphorylation and neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* **29**: 662-674.
- Vandermoere F, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Lemoine J, 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**: 5482-5491.
- 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* **17**: 1741-1752.
- Vargo-Gogola T, Rosen JM.** (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer* **7**: 659-672.
- Varsano T, Dong MQ, Niesman I, Gacula H, Lou X, Ma T et al.** (2006). GIPC is recruited by APPL to peripheral TrkA endosomes and regulates TrkA trafficking and signaling. *Mol Cell Biol* **26**: 8942-8952.
- Vaught D, Brantley-Sieders DM, Chen J.** (2008). Eph receptors in breast cancer: roles in tumor promotion and tumor suppression. *Breast Cancer Res* **10**: 217.
- 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.
- Vetter ML, Martin-Zanca D, Parada LF, Bishop JM, Kaplan DR.** (1991). Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5650-5654.
- 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.
- Volosin M, Song W, Almeida RD, Kaplan DR, Hempstead BL, Friedman WJ.** (2006). Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J Neurosci* **26**: 7756-7766.

BIBLIOGRAPHIE

- Volosin M, Trotter C, Cragolini A, Kenchappa RS, Light M, Hempstead BL et al.** (2008). Induction of proneurotrophins and activation of p75^{NTR}-mediated apoptosis via neurotrophin receptor-interacting factor in hippocampal neurons after seizures. *J Neurosci* **28**: 9870-9879.
- von Schack D, Casademunt E, Schweigreiter R, Meyer M, Bibel M, Dechant G.** (2001). Complete ablation of the neurotrophin receptor p75^{NTR} causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nat Neurosci* **4**: 977-978.
- Vona-Davis L, Rose DP.** (2007). Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer* **14**: 189-206.
- Waldhauer I, Steinle A.** (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* **27**: 5932-5943.
- Walsh T, King MC.** (2007). Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell* **11**: 103-105.
- Wan J, Cheung AY, Fu WY, Wu C, Zhang M, Mobley WC et al.** (2008). Endophilin B1 as a novel regulator of nerve growth factor/ TrkA trafficking and neurite outgrowth. *J Neurosci* **28**: 9002-9012.
- Wang LH, Chan JL, 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 YJ, Valadares D, Sun Y, Wang X, Zhong JH, Liu XH et al.** (2010). Effects of proNGF on neuronal viability, neurite growth and amyloid-beta metabolism. *Neurotox Res* **17**: 257-267.
- Warrington RJ, Lewis KE.** (2011). Natural antibodies against nerve growth factor inhibit in vitro prostate cancer cell metastasis. *Cancer Immunol Immunother* **60**: 187-195.
- Watson FL, Porcionatto MA, Bhattacharyya A, Stiles CD, Segal RA.** (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J Neurobiol* **39**: 323-336.
- Watson FL, Heerssen HM, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin MZ, Segal RA.** (2001). Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci* **4**: 981-988.
- 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.

BIBLIOGRAPHIE

- Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H, Garcia KC.** (2007). Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* **53**: 25-38.
- Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ.** (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* **5**: 591-602.
- Weiss GJ, Hidalgo M, Borad MJ, Laheru D, Tibes R, Ramanathan RK et al.** (2011). Phase I study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of PHA-848125AC, a dual tropomyosin receptor kinase A and cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs*.
- 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.
- West AE, Griffith EC, Greenberg ME.** (2002). Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat Rev Neurosci* **3**: 921-931.
- 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.
- Wiesmann C, Ultsch MH, Bass SH, de Vos AM.** (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* **401**: 184-188.
- Wiesmann C, de Vos AM.** (2001). Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci* **58**: 748-759.
- Wiezorek J, Holland P, Graves J.** (2010). Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. *Clin Cancer Res* **16**: 1701-1708.
- Wiley HS, Burke PM.** (2001). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* **2**: 12-18.
- Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, 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.
- Willnow TE, Petersen CM, Nykjaer A.** (2008). VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nat Rev Neurosci* **9**: 899-909.
- Wohrle FU, Daly RJ, Brummer T.** (2009). Function, regulation and pathological roles of the Gab/DOS docking proteins. *Cell Commun Signal* **7**: 22.
- Wolf G, Trub T, Ottinger E, Groninga L, Lynch A, White MF et al.** (1995). PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities. *J Biol Chem* **270**: 27407-27410.

BIBLIOGRAPHIE

- Wood ER, Truesdale AT, McDonald OB, Yuan D, Hassell A, Dickerson SH et al.** (2004). A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res* **64**: 6652-6659.
- Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, Diaz-Meco MT, Barker PA, Moscat J.** (2001). The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J Biol Chem* **276**: 7709-7712.
- Wooten MW, Geetha T, Seibenhener ML, Babu JR, Diaz-Meco MT, Moscat J.** (2005). The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-kappaB activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *J Biol Chem* **280**: 35625-35629.
- Wooten MW, Geetha T, Babu JR, Seibenhener ML, Peng J, Cox N et al.** (2008). Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* **283**: 6783-6789.
- Wright JH, Druceckes P, Bartoe J, Zhao Z, Shen SH, Krebs EG.** (1997). A role for the SHP-2 tyrosine phosphatase in nerve growth-induced PC12 cell differentiation. *Mol Biol Cell* **8**: 1575-1585.
- Wu C, Lai CF, Mobley WC.** (2001). Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J Neurosci* **21**: 5406-5416.
- Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER et al.** (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* **64**: 7022-7029.
- Wynne S, Djakiew D.** (2010). NSAID inhibition of prostate cancer cell migration is mediated by Nag-1 Induction via the p38 MAPK-p75(NTR) pathway. *Mol Cancer Res* **8**: 1656-1664.
- Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA, Greenberg ME.** (1998). Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* **18**: 1946-1955.
- Xu AM, Huang PH.** (2010). Receptor tyrosine kinase coactivation networks in cancer. *Cancer Res* **70**: 3857-3860.
- Xu J, Chen Y, Olopade OI.** (2010). MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer* **1**: 629-640.
- Xu L, Yin S, Banerjee S, Sarkar F, Reddy KB.** (2011a). Enhanced anticancer effect of the combination of cisplatin and TRAIL in triple-negative breast tumor cells. *Mol Cancer Ther* **10**: 550-557.
- Xu ZQ, Sun Y, Li HY, Lim Y, Zhong JH, Zhou XF.** (2011b). Endogenous proBDNF is a negative regulator of migration of cerebellar granule cells in neonatal mice. *Eur J Neurosci* **33**: 1376-1384.

BIBLIOGRAPHIE

- Yamada M, Ohnishi H, Sano S, Nakatani A, Ikeuchi T, Hatanaka H.** (1997). Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J Biol Chem* **272**: 30334-30339.
- Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K et al.** (2009). Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci* **12**: 113-115.
- Yang M, Lim Y, Li X, Zhong JH, Zhou XF.** (2011). Precursor of brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) forms a complex with Huntingtin-associated protein-1 (HAP1) and sortilin that modulates proBDNF trafficking, degradation, and processing. *J Biol Chem* **286**: 16272-16284.
- Yang ZF, Ho DW, Lam CT, Luk JM, Lum CT, Yu WC et al.** (2005). Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **65**: 219-225.
- Yano H, Lee FS, Kong H, Chuang J, Arevalo J, Perez P et al.** (2001). Association of Trk neurotrophin receptors with components of the cytoplasmic dynein motor. *J Neurosci* **21**: RC125.
- Yano H, Torkin R, Martin LA, Chao MV, Teng KK.** (2009). Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: evidence for retrograde-directed cell killing. *J Neurosci* **29**: 14790-14802.
- Ye H, Kuruvilla R, Zweifel LS, Ginty DD.** (2003). Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron* **39**: 57-68.
- Yerushalmi R, Hayes MM, Gelmon KA.** (2009). Breast carcinoma--rare types: review of the literature. *Ann Oncol* **20**: 1763-1770.
- Yin S, Xu L, Bandyopadhyay S, Sethi S, Reddy KB.** (2011). Cisplatin and TRAIL enhance breast cancer stem cell death. *Int J Oncol*.
- Yoon SO, Casaccia-Bonofil P, Carter B, Chao MV.** (1998). Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* **18**: 3273-3281.
- York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW et al.** (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* **392**: 622-626.
- York RD, Molliver DC, Grewal SS, Stenberg PE, McCleskey EW, Stork PJ.** (2000). Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol* **20**: 8069-8083.

BIBLIOGRAPHIE

Yoshida T, Zhang Y, Rivera Rosado LA, Zhang B. (2009). Repeated treatment with subtoxic doses of TRAIL induces resistance to apoptosis through its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Mol Cancer Res* **7**: 1835-1844.

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.

Yu T, Calvo L, Anta B, Lopez-Benito S, Southon E, Chao MV et al. (2011). Regulation of trafficking of activated TrkA is critical for NGF-mediated functions. *Traffic* **12**: 521-534.

Zampieri N, Xu CF, Neubert TA, Chao MV. (2005). Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains. *J Biol Chem* **280**: 14563-14571.

Zapf-Colby A, Olefsky JM. (1998). Nerve growth factor processing and trafficking events following TrkA-mediated endocytosis. *Endocrinology* **139**: 3232-3240.

Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, Irizarry AR, Kinch MS. (2001). EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res* **61**: 2301-2306.

Zhang D, Dhillon H, Prasad MR, Markesbery WR. (1998). Regional levels of brain phospholipase Cgamma in Alzheimer's disease. *Brain Res* **811**: 161-165.

Zhang J, Yang PL, Gray NS. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* **9**: 28-39.

Zhang S, Huang WC, Li P, Guo H, Poh SB, Brady SW et al. (2011). Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med* **17**: 461-469.

Zhang Y, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA. (2000). Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci* **20**: 5671-5678.

Zheng WH, Kar S, Quirion R. (2002). FKHRL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *J Neurochem* **80**: 1049-1061.

Zhou J, Chehab R, Tkalcevic J, Naylor MJ, Harris J, Wilson TJ et al. (2005). Elf5 is essential for early embryogenesis and mammary gland development during pregnancy and lactation. *Embo J* **24**: 635-644.

Zhu Z, Kleeff J, Kaye H, Wang L, Korc M, Buchler MW et al. (2002). Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog* **35**: 138-147.

BIBLIOGRAPHIE

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.

Zhuang G, Brantley-Sieders DM, Vaught D, Yu J, Xie L, Wells S *et al.* (2010). Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer Res* **70**: 299-308.

Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD. (2005). Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci* **6**: 615-625.