

Université Lille 1 - Sciences et technologies

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

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

Aspects moléculaires et cellulaires de biologie

Présentée par

Elisa TOMELLINI

**Etude des effets du NGF et du proNGF sur les cellules
souches de cancer du sein**

Soutenue le 25 Octobre 2013 devant la commission d'examen :

Rapporteurs :

Pr. Olivier COQUERET

Pr. Olivier HERAULT

Examineur :

Dr. Nathalie THERET

Directrice de thèse :

Pr. Xuefen LE BOURHIS

Co-directrice de thèse

Dr. Renata POLAKOWSKA

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au sein des laboratoires INSERM U908 et INSERM U837.

En premier lieu, je tiens à remercier mes directrices de thèse Xuefen Le Bourhis et Renata Polakowska pour m'avoir encadrée, conseillée et fait confiance pour mener ce projet de thèse. Vos points de vue, souvent si différents, ont été très enrichissants.

Je souhaite remercier l'INSERM et la Région Nord-Pas de Calais pour m'avoir accordé une allocation pour les 3 premières années de thèse, mais également l'Université Lille1 pour le poste d'ATER qui m'a permis de réaliser une 4^{ème} année de thèse.

Pour l'honneur qu'ils me font en faisant partie de ce jury, je remercie profondément le Professeur Pierre Formstecher qui a accepté de le présider, le Professeur Olivier Coqueret et le Professeur Olivier Hérault qui ont bien voulu juger ce travail et le Docteur Nathalie Théret qui a accepté de l'examiner.

Un grand merci à tous les membres de mes deux laboratoires d'accueil qui m'ont accompagnée pendant ces années :

Robert Alain, pour avoir toujours répondu à mes nombreuses « j'aurais une question » et pour avoir amené « mon » cytomètre au laboratoire.

Ingrid, Manu et Christophe, pour votre soutien pendant mon année d'enseignement et pour votre gentillesse, toujours très réconfortante.

Eric, pour la bonne humeur communicative et pour l'aide précieuse dans les manips in vivo.

Chann pour tes conseils sur l'article et pour ton enthousiasme californien.

Isabelle, Emilie, Nathalie, Vero et Valérie, votre aide a été fondamentale tout au long de ma thèse. Sans vous le labo aurait du mal à tourner.

Pascaline et Bernadette, deux personnes délicieuses avec qui j'aurais aimé pouvoir travailler plus.

Yasmine, Jérôme, Raja, Pilar et Pauline, merci pour votre soutien, votre aide et pour la bonne ambiance que vous savez garder dans l'équipe. Vous retrouver à l'IRCL est toujours un plaisir, et pas seulement pour la quantité des bonbons toujours présente !

Un merci tout particulier pour mes collègues thésards et nouveaux docteurs, pour leur soutien au laboratoire et leur amitié en dehors :

Léo, le sérieux, et Matthieu, le rigolo : un super binôme qui a toujours su m'aider et me conforter, surtout en cette dernière année pas facile. Je vous souhaite le mieux pour la suite...sinon moi je suis toujours partante pour le projet boulangerie. Le labo a de la chance de vous avoir !

Cyril merci pour tes conseils précieux au laboratoire, pour ta bonne humeur et pour m'avoir appris à utiliser le mot « grabuge » dans n'importe quel contexte. JP, le meilleur collègue de bureau que j'ai eu pendant ma thèse, merci pour m'avoir fait découvrir le Farafina !

Justine L., qui est tombée au laboratoire lorsque j'avais le plus besoin d'aide. Barbara et Justine B., votre aventure ne fait que commencer : bon courage les filles !

Les anciens du laboratoire Steph, Laura, Rod, Yohann, qui ont contribué à ma formation et à rendre ma thèse plus agréable.

A mes amis Sara, Giovanna, Laura, Alessandra, Gaylor, Anne-Laure, Emeric, Anne-Lucie, et plein plein d'autres personnes en France, en Italie et ailleurs dans le monde qu'il serait trop long d'énumérer. Merci d'avoir toujours été là à me rappeler qu'il existe une vie en dehors du laboratoire !

Un grazie particolare alla mia famiglia che mi ha sostenuto in tutti questi anni. Anche se lontani, non avete mai smesso di essermi vicini e di credere in me, sicuramente più di quanto io stessa non faccia.

Et enfin un grand merci à Nicolas, ami, collègue, prof de français, merci pour avoir été à mes côtés pendant ces années et m'avoir supportée (en tous les sens) dans mes nombreux moments de doute.

Résumé

Malgré d'importants progrès en recherche fondamentale et clinique, le cancer du sein, reste à ce jour le premier cancer féminin en termes d'incidence et de mortalité.

Parmi les facteurs contribuant à son développement, notre laboratoire a mis en évidence le rôle des neurotrophines, en particulier le NGF (*Nerve Growth Factor*) et son précurseur (proNGF). D'autre part, les études récentes ont permis de démontrer l'importance des cellules souches cancéreuses (CSC) dans la tumorigenèse et dans les phénomènes de résistance thérapeutique et de métastase.

Mon projet de thèse avait pour but d'étudier les effets du NGF et du proNGF sur la régulation des CSC de sein et d'évaluer la conséquence sur le développement tumoral. La culture en mammosphères, qui permet la propagation de cellules moins différenciées, nous a permis de démontrer que le NGF et le proNGF sont capables d'enrichir la population de CSC dans plusieurs lignées de cellules épithéliales mammaires cancéreuses (MCF-7, T47-D, BT-20). Cet enrichissement est lié à la surexpression de Sox2, facteur de transcription essentiel dans l'autorenouvellement des cellules souches. De plus, nous avons démontré que le NGF et le proNGF augmentent le pourcentage des cellules quiescentes. De façon intéressante, le NGF et le proNGF peuvent également agir de façon préférentielle sur les cellules quiescentes en augmentant leur capacité à former des sphères. Ces résultats suggèrent que le NGF et le proNGF peuvent réguler le compartiment des CSC en contrôlant la balance entre la prolifération et la quiescence. L'inactivation par siRNA de p75^{NTR} (récepteur commun des neurotrophines) réduit fortement la formation de sphères ainsi que l'expression de Sox2, faisant de p75^{NTR} un récepteur clé dans le contrôle de la biologie des CSC. Les expériences de tumorigenèse chez les souris montrent que les cellules cancéreuses de sein MCF-7 cultivées en présence de NGF et de proNGF en condition mammosphères présentent une croissance tumorale accrue comparée aux cellules contrôles. Cependant, seules les cellules prétraitées par le NGF forment des métastases dans le cerveau, les poumons et le foie de façon systématique. L'analyse des cellules issues de tumeurs primaires montre que seules les cellules prétraitées par le NGF subissent une transition épithélio-mésenchymateuse. Ces travaux ont permis de montrer que le NGF et le proNGF contribuent à la régulation de la plasticité des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo*. Il serait intéressant d'approfondir les mécanismes moléculaires mis en jeu afin de mieux comprendre leur implication dans la tumorigenèse mammaire.

Abstract

Despite significant advances in cancer research and treatment, breast cancer remains one of the leading causes of cancer-related death in women.

Development, homeostasis and cancerogenesis of the mammary epithelium are controlled by several factors including growth factors. Among these, it has been shown by our laboratory that NGF (*Nerve Growth Factor*) and its precursor (proNGF) are overexpressed in breast cancer cells, where they exert a mitotic, anti-apoptotic and pro-invasive effects through an autocrine loop. In the last few years, a raising number of experimental data indicate the importance of cancer stem cells (CSCs) in tumour development, metastasis and resistance to therapies.

The objective of my thesis was to evaluate the influence of NGF and proNGF on breast CSCs biology and to determine their consequences on tumour development. Through mammosphere culture, an *in vitro* system to propagate CSCs in an undifferentiated state, we could show that NGF and proNGF enrich for CSC in several breast cancer cell lines (MCF-7, T47-D, BT-20). This enrichment is connected to the overexpression of Sox2, a transcription factor essential for stem cells self-renewal. Moreover, we showed that NGF and proNGF treatments increase the percentage of quiescent cells. Interestingly, NGF and proNGF can act directly on these quiescent cells by increasing their sphere forming ability. These results suggest that NGF and proNGF act on the CSC pool, by regulating the balance between quiescence and proliferation. Inhibition of p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) by siRNA drastically reduced sphere formation as well as Sox2 expression, indicating the key role of p75^{NTR} in breast CSC biology.

Tumorigenicity assays in SCID mice proved that cells from MCF-7 mammospheres cultured with NGF or proNGF increase tumor growth compared to the control condition. Nevertheless, only cells pre-treated with NGF were able to systematically develop metastases in brain, lung and liver. The analysis of cells from dissociated primary tumors showed that NGF pre-treated cells went through an epithelial-to-mesenchymal transition.

Taken together, our results have shown that NGF and proNGF contribute to the regulation of stem cells' plasticity *in vitro* and *in vivo*. Future perspectives concern the comprehension of involved molecular mechanisms in order to better understand their implication in breast cancer development.

Sommaire

Remerciements.....	3
Résumé.....	5
Abstract	6
Sommaire.....	7
Sommaire des figures	11
Sommaire des tableaux	12
Abréviations et acronymes.....	13
Introduction	17
A. La glande mammaire et sa cancérisation	19
1. La glande mammaire normale	19
1.1. Anatomie et histologie.....	19
1.2. Développement et contrôle.....	21
2.1. Généralités.....	23
2.2. Les tumeurs mammaires	24
a) <i>Les types de cancer du sein.....</i>	<i>24</i>
b) <i>Classification des cancers du sein</i>	<i>26</i>
2.3. Mécanismes de la tumorigenèse mammaire	28
a) <i>Stades de développement d'un cancer</i>	<i>28</i>
b) <i>Définition et mécanismes de la transition épithélio-mésenchymateuse.....</i>	<i>30</i>
c) <i>Altérations génétiques.....</i>	<i>32</i>
d) <i>Modifications épigénétiques</i>	<i>35</i>
e) <i>Influence du microenvironnement tumoral.....</i>	<i>36</i>
f) <i>Le rôle des facteurs de croissance dans le développement tumoral.....</i>	<i>38</i>
2.4. Cancer du sein et thérapies	39
B. Les cellules souches.....	43
1. La cellule souche : propriétés, spécification et différenciation	43
1.1. Potentialité des cellules souches	43
1.2. L'autorenouvellement	45
1.3. La plasticité des cellules souches : modèle hiérarchisé et réversibilité.....	47

1.4. La quiescence	48
1.5. La niche cellulaire	49
a) <i>Fonctions de la niche</i>	50
b) <i>Niche environnementale et métabolisme oxydatif</i>	53
1.6. Les facteurs clés de la pluripotence et de l'autorenouvellement	54
a) <i>Les gènes polycomb</i>	54
b) <i>Facteurs de transcription</i>	55
1.7. Les voies de signalisation	60
a) <i>La voie Wnt</i>	60
b) <i>La voie Notch</i>	61
c) <i>La voie Hedgehog</i>	62
1.8. Isolement des cellules souches	63
a) <i>Culture en suspension (formation de sphères)</i>	63
b) <i>Identification des cellules au cycle cellulaire lent (Label retaining cells)</i>	64
c) <i>Exclusion de colorants vitaux (Side population)</i>	64
d) <i>Activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogénase (test ALDEFLUOR)</i>	64
e) <i>Marqueurs de surface</i>	65
2. Les cellules souches cancéreuses	65
2.1. Origine cellulaire du cancer : le modèle hiérarchique	65
2.2. Propriétés des cellules souches cancéreuses	67
2.3. Origine des CSC et interaction avec la niche	68
2.4. Les cellules souches cancéreuses et le phénotype TEM	70
3. Les cellules souches mammaires	71
3.1. Les cellules souches mammaires normales	71
3.2. Les cellules souches du cancer du sein	72
3.3. Implications cliniques des cellules souches cancéreuses	75
C. Le (pro)NGF et ses récepteurs	79
1. Le NGF et son précurseur	79
1.1. Découverte	79
1.2. Structure: du gène aux protéines	80
a) <i>Les produits du gène</i>	80
b) <i>Organisation conformationnelle du (pro)NGF</i>	80
2. Les récepteurs au (pro)NGF	82

2.1. Le récepteur TrkA	82
a) <i>Découverte et structure</i>	82
b) <i>Signalisation du récepteur TrkA</i>	84
2.2. Le récepteur p75 ^{NTR}	85
a) <i>Découverte</i>	85
b) <i>Gène et structure</i>	85
c) <i>Les différentes formes de p75^{NTR}</i>	88
d) <i>Signalisation de p75^{NTR}</i>	91
e) <i>Les corécepteurs de p75^{NTR}</i>	92
2.3. La sortiline	93
3. Rôle du NGF et du proNGF dans le cancer	94
3.1. Effets anti-tumoraux liés à l'expression de p75 ^{NTR}	94
3.2. Effets pro-tumoraux	95
3.3. Cancer du sein	96
4. L'axe (pro)NGF/p75^{NTR} dans les cellules souches	97
D. Objectifs de la thèse	131
Résultats	133
A. Etude des effets du NGF et du proNGF sur les cellules souches cancéreuses de sein	135
Résultats complémentaires	187
2. Evaluation des effets du NGF et du proNGF sur la culture à long terme des mammosphères	191
B. Le clivage de p75^{NTR} dans le cancer du sein	197
Article 2 : Extracellular cleavage of the p75 neurotrophin receptor is implicated in its pro-survival effect in breast cancer cells.	199
Discussion et Perspectives	207
Discussion	209
1. <i>NGF et proNGF stimulent l'autorenouvellement des CSC de sein</i>	210
2. <i>NGF et proNGF agissent sur la balance entre quiescence et prolifération des cellules souches cancéreuses</i>	211
3. <i>Implication du récepteur p75^{NTR}</i>	213

<i>4. Action du NGF et du proNGF sur la croissance tumorale</i>	<i>214</i>
<i>5. Effets du NGF et du proNGF sur des cellules cultivées en mammosphères à long terme.....</i>	<i>216</i>
Perspectives	217
<i>1. Une meilleure compréhension de l'implication du NGF et du proNGF dans la biologie des CSC nécessite une optimisation des approches méthodologiques.....</i>	<i>217</i>
<i>2. Sécrétion du NGF et du proNGF par les CSC mammaires</i>	<i>218</i>
<i>3. Signalisation du NGF et du proNGF dans les CSC</i>	<i>219</i>
Bibliographie.....	221

Sommaire des figures

Figure 1. Anatomie et structure de la glande mammaire et du lobe mammaire.....	19
Figure 2. Histologie de la glande mammaire.....	21
Figure 3. Développement de la glande mammaire	22
Figure 4. Histologie des principaux types de cancer du sein.....	25
Figure 5. Etapes de la cancérisation d'un épithélium canalaire mammaire	30
Figure 6. Marqueur moléculaires associés à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).....	31
Figure 7. Relations entre les cellules épithéliales cancéreuses mammaires et le microenvironnement tumoral	38
Figure 8. L'évolution des cellules souches.....	43
Figure 9. Origine des cellules souches embryonnaires et adultes	45
Figure 10. Autorenewement des cellules souches par division asymétrique ou symétrique	46
Figure 11. La niche des cellules souches : composition et fonctions	50
Figure 12. Influence de la niche sur la division des cellules souches	52
Figure 13. Modifications bivalentes de la chromatine	55
Figure 14. Noyau de régulation transcriptionnelle des cellules souches embryonnaires	59
Figure 15. Voie de signalisation Wnt/ β -caténine	61
Figure 16. Voie de signalisation Notch	62
Figure 17. Voie de signalisation Hedgehog	63
Figure 18. Représentation schématique des deux théories de formation tumorale	67
Figure 19. Interaction entre les cellules souches cancéreuses et leur niche	69
Figure 20. Modèle de différenciation hiérarchique de l'épithélium mammaire.....	72
Figure 21. Schéma de la différenciation épithéliale mammaire normale et tumorale.....	73

Figure 22. Régénération de la tumeur par les cellules souches cancéreuses.....	77
Figure 23. Représentation schématique du pro/NGF	80
Figure 24. Structure du NGF et du proNGF.....	81
Figure 25. Représentation schématique du récepteur TrkA	84
Figure 26. Représentation schématique du récepteur p75 ^{NTR}	88
Figure 27. Les différentes isoformes du récepteur p75 ^{NTR}	90
Figure 28. L’outil d’analyse cellulaire histone 2B-GFP	136
Figure 29. Structure de l’ARN messager et structure protéique de CD44.....	188
Figure 30. Expression des isoformes de CD44 dans les cellules GFP ⁻ et GFP ⁺	189
Figure 31. Expression des isoformes de CD44 induites par les traitements au NGF et au proNGF.....	190
Figure 32. Caractérisation de cellules obtenues par une culture à long terme des mammosphères.....	192
Figure 33. Injection des cellules issues de la culture à long terme en souris SCID.....	194
Figure 34. Analyse phénotypique des cellules issues des tumeurs	195

Sommaire des tableaux

Tableau 1. Classification TNM des stades de cancer du sein	26
Tableau 2. Classification moléculaire des cancers du sein	28
Tableau 3. Les neurotrophines humaines	79
Tableau 4. Caractéristiques du récepteur TrkA humain.....	82
Tableau 5. Caractéristiques du récepteur p75 ^{NTR} humain	85
Tableau 6. Caractéristiques du récepteur sortiline humain.....	93

Abréviations et acronymes

A

aa : acides aminés
ABC : ATP Binding Cassettes
ADAM17 : A Disintegrin And Metalloproteinase 17
ALDH : aldehyde dehydrogenase
Ang-1 : Angiopoietin-1

B

Bcl-2 : B-cell lymphoma protein-2
Bcl-XL : B-cell lymphoma Extra Large
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor
BH3 : Bcl-2 Homology
BMP : Bone Morphogenetic Proteins
BRCA-1 / -2 : BReast CAncer-1 / -2
BrdB : bromodeoxyuridine

C

CAF : Cancer-Associated Fibroblasts
CCI : Carcinome canalaire invasif
CCIS : Carcinome canalaire *in situ*
CCL2 : chemokine CC-motif ligand 2)
CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor-2A
CLIS : Carcinome lobulaire *in situ*
CRD : Cystein-Rich Domain
CSC : Cellule Souche Cancéreuse
CSF-1 : Colony-Stimulating Factor-1
CTF : C-terminal fragment
CXCL12 : Chemokine CXC motif Ligand 12
CYCS : Cytochrome c

D

DD : Death Domain

E

EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : EGF receptor
ER : Estrogen Receptor

Erk : Extracellular signal-regulated kinase
ESC : Embryonic Stem Cell
EZH1 : Enhancer of Zeste Homolog 1

F

FGF : Fibroblast Growth Factor
FLT3 : FMS-Like Tyrosin kinase 3
FOXO3 : Forkhead box O3
FZR-1 : Fizzy/cell division cycle 20 Related-1

G

GH : Growth Hormone
GRB : Growth factor receptor-bound protein

H

HER-2 : Human Epidermal Growth Factor
HGF/SF : Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor
HH : Hedgehog
HMG : High Mobility Group

I

ICD : IntraCellular Domain
IGF-1 : Insulin Growth Factor-1
IL : Interleukine
iPS : induced Pluripotent Stem cells

J

JAK : Janus-Associated Kinase
JNK : c-Jun N-terminal Kinase

K

Klf4 : Krüppel-like factor 4

L

LIF : Leukemia Inhibitory Factor
LINGO-1 : LRR and Ig domain-containing, Nogo receptor-interacting protein

M

MAG : Myelin-Associated Glycoprotein
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MaSC : Mammary stem cells
MDGF-1: Mammary-Derived Growth Factor
MDR : Multi Drug Resistance
MEC : Matrice Extra Cellulaire
MEK : MAPK Kinase
MH2 : Mad Homologue
MMP : Matrix MetalloProteinase

N

NCSC : Neural Crest Stem Cells
NFATc1 : Nuclear Factor of Activated T cells c1
NFkB : Nuclear Factor kappa B
NGF : Nerve Growth Factor
NGFR : NGF Receptor
NOD-SCID : Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency
NOS : Nitric Oxide Synthase
NRAGE : Neurotrophin Receptor interacting MAGE-homolog
NRIF : Neurotrophin Receptor Interacting Factor
NT-3 : neurotrophine-3
NT-4/5 : neurotrophine-4/5

O

OCT-4 : Octamer-binding Transcription factor-4
OMgP : Oligodendrocyte Myelin glycoProtein

P

p75^{NTR} : p75 Neurotrophin Receptor
Pbx-1 : Pre-B-cell leukemia transcription factor-1
PcG : Polycomb Group
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDZ : Post-synaptic Disc-large Zona
PgR : Progesterone Receptor
PIP2 : Phosphatidylinositol(4,5) biPhosphate
PI3-K : Phosphoinositide 3-Kinase
PKAC β : Protein Kinase cAMP-dependent β catalytic subunit
PKC : Protein Kinase C
PLC- γ 1 : PhosphoLipase C - γ 1
POU5f1 : POU domain, class 5, transcription factor 1
PRC-1/-2 : Polycomb Repressive Complexes-1/-2
PS-1 : Presenilin-1
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

R

RET : REarranged during Transfection
RIP : Regulated Intramembrane Proteolysis
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

S

SDF- 1 : Stromal cell-Derived Factor-1
SHH : Sonic Hedgehog
SOX2 : Sex determinig Region Y-box-2

T

TACE : TNF- α Converting Enzyme
TGF : Transforming Growth Factor
Tie-2 : Tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2

TIMP-1 : Tissue Inhibitor of Matrix MetalloProteinase-1
TRADD : TNF receptor 1-associated death domain
TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAF : TNF Receptor-Associated Factor
Trk : Tropomyosin-related kinase
Trim28 : Tripartite motif-containing 28
TβR-I/-II : TGF-β Receptor-I/-II

U

uPA : urokinase-type Plasminogen Activator
UTDL : Unité terminale ducto-lobulaire

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VPS10P : Vacuolar carboxy-Peptidase Sorting receptor-10

W

Wnt : Wingless-type MMTV integration site

Z

ZEB-1 : Zinc finger E-box Binding homeobox-1

Introduction

A. La glande mammaire et sa cancérisation

1. La glande mammaire normale

1.1. Anatomie et histologie

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. Cette glande exocrine présente des aspects morphologiques et fonctionnels qui diffèrent selon l'âge, mais également selon le sexe, puisqu'elle reste immature et non fonctionnelle chez l'homme.

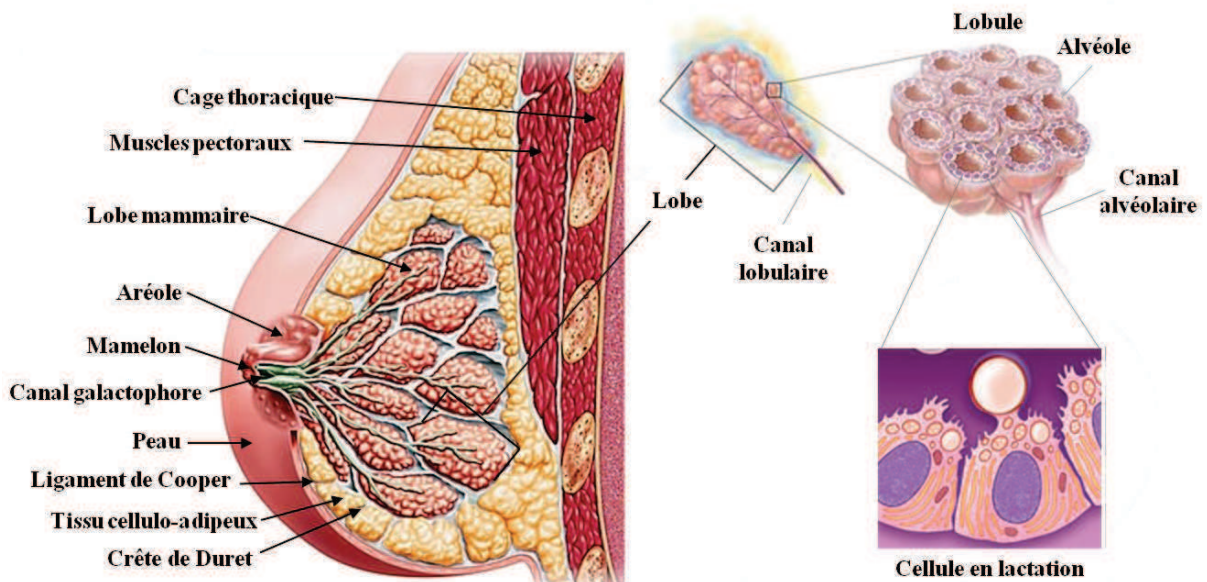


Figure 1. Anatomie et structure de la glande mammaire et du lobe mammaire

A gauche : représentation schématisée de la glande mammaire en coupe. La glande mammaire est une masse de tissu glandulaire située sur la face antérieure des muscles pectoraux. Elle est constituée d'une dizaine de canaux galactophores aboutissant à 10 à 20 lobules mammaires, 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 du mamelon. A droite : représentation schématisée de la structure du lobe mammaire. Un lobe mammaire compte 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 jusqu'au canal galactophore grâce à la contraction des cellules myoépithéliales (Adapté de Larousse Médical et Terese Winslow Medical and Scientific Illustration).

Introduction

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 10 à 20 lobes, subdivisés en 20 à 40 lobules, constitués eux-mêmes de 10 à 100 alvéoles ou *acini* (Figure 1). 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.

La glande mammaire est composée de plusieurs types cellulaires différents en termes de morphologie et de fonctionnalité. Le système alvéolo-lobulo-canalair est formé d'une assise continue de cellules épithéliales cubiques sécrétrices de lait, doublée d'une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales fusiformes contractiles. Ces deux couches cellulaires 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 2). En réponse au stimulus de succion, les cellules myoépithéliales se contractent, permettant ainsi l'éjection du lait dans les canaux alvéolaires, lobulaires et galactophores.

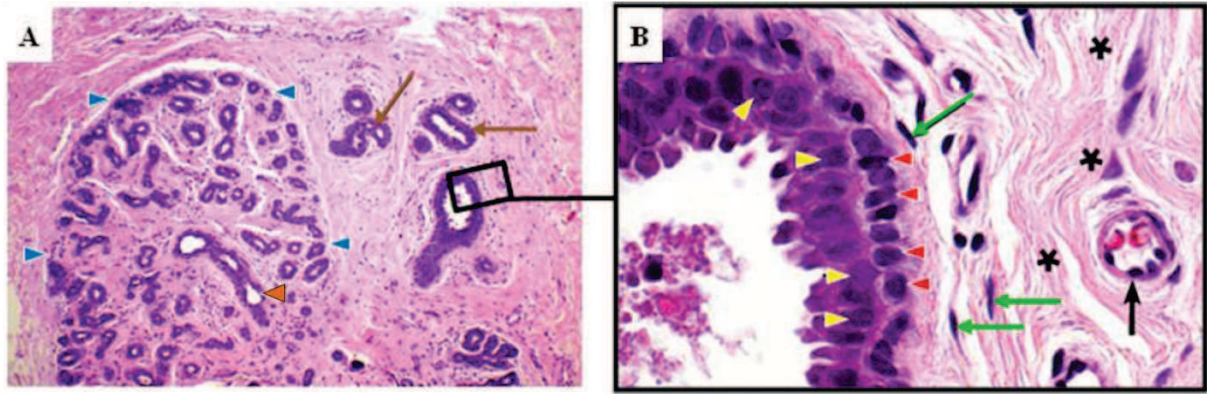


Figure 2. Histologie de la glande mammaire

(A) Lobule mammaire post-pubertaire hors lactation. Les flèches bleues délimitent le lobule, la flèche orange indique le canal terminal alvéolaire menant au réseau canalaire (flèches marron). Les fibres 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-canalaire parallèles à la lame basale. Les astérisques représentent les fibres de collagène et la flèche noire une artériole. (Adapté de *Biology of mammary gland*: <http://mammary.nih.gov>).

1.2. Développement et contrôle

Le développement de la glande mammaire est un processus constitué de différentes étapes qui se déroulent tout au long de la vie d'une femme et qui varient fortement du stade fœtal à la ménopause. Les modifications de l'architecture et de la taille de la glande mammaire sont hautement contrôlées par différentes hormones qui vont, en synergie avec le microenvironnement palléal, coordonner la régulation de son homéostasie (Figure 3).

L'ébauche mammaire qui se forme au cours de la vie fœtale dérive de l'ectoderme, mais elle demeure encore rudimentaire à la naissance. Pendant l'enfance, la glande mammaire reste quiescente, quasiment sans différences structurales entre homme et femme. Au moment de la puberté (8-12 ans), une croissance rapide est induite par l'ovulation et l'établissement des cycles menstruels réguliers, sous l'influence des stéroïdes sexuels (œstrogènes, progestérone), mais aussi de l'hormone de croissance (*Growth Hormone, GH*) et de corticostéroïdes. Une phase de croissance des canaux et du stroma est alimentée par un circuit d'hormones ovariennes qui agit sur des populations de cellules souches mammaires (MaSC) présentes dans la couche basale (Neville et al., 2002; Russo and Russo, 2004). Il y a cependant peu de développement des alvéoles, et la majeure partie de l'augmentation de volume des seins est attribuée aux dépôts lipidiques. Même si des mini

remodèlements surviennent à chaque cycle menstruel, c'est au cours de la grossesse que la glande mammaire atteint sa forme mature. Pendant la gestation, les alvéoles se développent activement, prenant la place du tissu adipeux, sous l'action de l'augmentation des concentrations plasmatiques de progestérone, d'œstrogènes et d'hormone lactogène placentaire. Ces hormones vont induire une phase de prolifération des cellules souches épithéliales et des cellules progénitrices situées à l'extrémité des canaux mammaires, conduisant alors à une croissance des canaux galactophores et à une différenciation des acini glandulaires (Sternlicht et al., 2006). D'autres hormones et facteurs de croissance sont directement impliqués dans la régulation de l'expansion mammaire pendant la grossesse, comme l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*), le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*), le MDGF-1 (*Mammary-Derived Growth Factor-1*), et des facteurs paracrines du stroma comme l'insuline et les glucocorticoïdes (Pang and Hartmann, 2007). 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 qui, en dégradant localement la matrice extracellulaire, contribuent à la migration et à la prolifération des cellules épithéliales nécessaires à la mise en place de l'arborescence galactophorique.

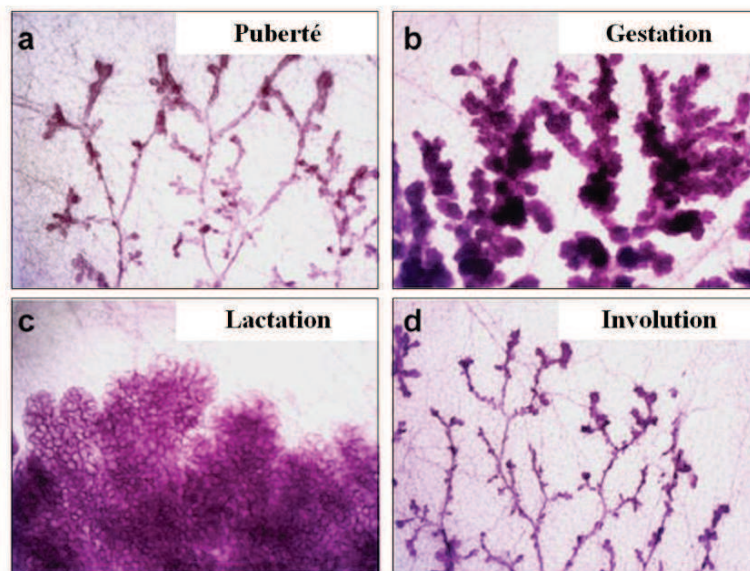


Figure 3. Développement de la glande mammaire

A la puberté (a), la glande mammaire subit l'effet de nombreuses hormones et facteurs de croissance provoquant un développement de l'arborescence des alvéoles. Lors d'une grossesse (b), les hormones lactogènes induisent la différenciation des cellules épithéliales des acini en cellules productrices de lait (c). Le sevrage entraîne la disparition de ces cellules et l'involution de la glande (d) (Schedin et al., 2007).

A la fin de la grossesse, les cellules épithéliales alvéolaires se polarisent et deviennent ainsi fonctionnelles. Le processus de lactation est déclenché après l'accouchement par une diminution de la progestérone circulante et une augmentation du niveau de la prolactine, suite à l'élimination du placenta (Suzuki et al., 2000). Jusqu'à l'accouchement, l'action de maturation de la prolactine sur les cellules épithéliales mammaires est inhibée par l'action de l'hormone placentaire lactogène et des stéroïdes sexuels d'origine placentaire. A la fin de la lactation, lors du sevrage, la glande mammaire involue : l'activité sécrétoire cesse et les cellules épithéliales et myoépithéliales s'engagent dans un processus d'apoptose. Après quelques jours, la glande mammaire retourne à un état moins différencié, sans toutefois retrouver exactement son état antérieur. Le cancer du sein

2.1. Généralités

Plus de 1,3 millions de femmes dans le monde sont diagnostiquées chaque année d'un cancer du sein, ce qui en fait le deuxième cancer féminin en termes d'incidence au niveau mondial, et le plus fréquent dans l'Union européenne et aux Etats-Unis. Il est responsable chaque année de plus de 400 000 décès (World cancer report, OMS, 2008). En 2012, le nombre de nouveaux cas de cancer du sein en France a été estimé à 53 000, avec un nombre de décès estimé à 11 500 (Institut Nationale de Veille Sanitaire, 2011). Il faut noter que le cancer du sein peut survenir aussi chez l'homme, mais il reste rare et est environ 200 fois moins fréquent que chez la femme. L'incidence du cancer du sein a augmentée de façon importante et constante entre 1980 et 2005, et le taux d'incidence standardisé à la population mondiale a presque doublé. Toutefois, dans la même période, le taux de mortalité a baissé de manière régulière et, est resté relativement stable grâce au dépistage précoce et à l'amélioration de l'efficacité thérapeutique. Aujourd'hui, le taux de survie relative à 5 ans après le diagnostic est de 85 % (pourcentage qui diminue avec l'âge et qui varie avec le stade du cancer lors du diagnostic) (Séradour et al., 2010).

Le cancer du sein est une pathologie à évolution lente. Il faut compter environ 6 à 8 ans pour que, 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).

2.2. Les tumeurs mammaires

a) Les types de cancer du sein

La classification actuelle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des cancers du sein est essentiellement basée sur des critères morphologiques. Les tumeurs de sein peuvent être bénignes, c'est-à-dire bien limitées et encapsulées, et leur évolution, hormis de rares exceptions, n'entraîne pas la mort du patient. La plus fréquente des tumeurs bénignes est l'adénofibrome, le plus souvent découvert avant 30 ans.

Les tumeurs malignes, quant à elles, sont mal délimitées et non-encapsulées. Elles résultent d'une prolifération cellulaire rapide, avec la tendance à infiltrer et détruire les tissus adjacents et pouvant donner lieu à des métastases. La grande majorité (plus de 95 % des cas) des tumeurs malignes sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire issus de la cancérisation de l'épithélium glandulaire provenant 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. On distingue alors les carcinomes *in situ* non invasifs des carcinomes infiltrants ou invasifs :

- **les carcinomes *in situ*/intercanalaires (non-infiltrants)** : ce sont les types les plus fréquents de cancers du sein non-invasifs chez la femme. Comme son nom l'indique, cette forme de cancer se développe à l'intérieur des canaux de lactation du sein. 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'une néoplasie lobulaire *in situ* (CLIS). Dans tous les cas, dans cette forme de cancer très précoce, 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)** : ces carcinomes représentent la grande majorité de cancers du sein (98 %). Ils présentent un envahissement du tissu environnant par les cellules cancéreuses, après avoir traversé la membrane basale. Il existe plusieurs types de carcinomes invasifs, à savoir les carcinomes lobulaires

infiltrants (4 à 11 %) et les carcinomes canauxaux infiltrants (75 %), ainsi que d'autres formes, plus rares et de bon pronostic, que sont les carcinomes tubulaires, mucineux (ou colloïdes), médullaires, papillaires ou encore les carcinomes apocrines, adénoïdes kystiques et cribriformes (Yerushalmi et al., 2009).

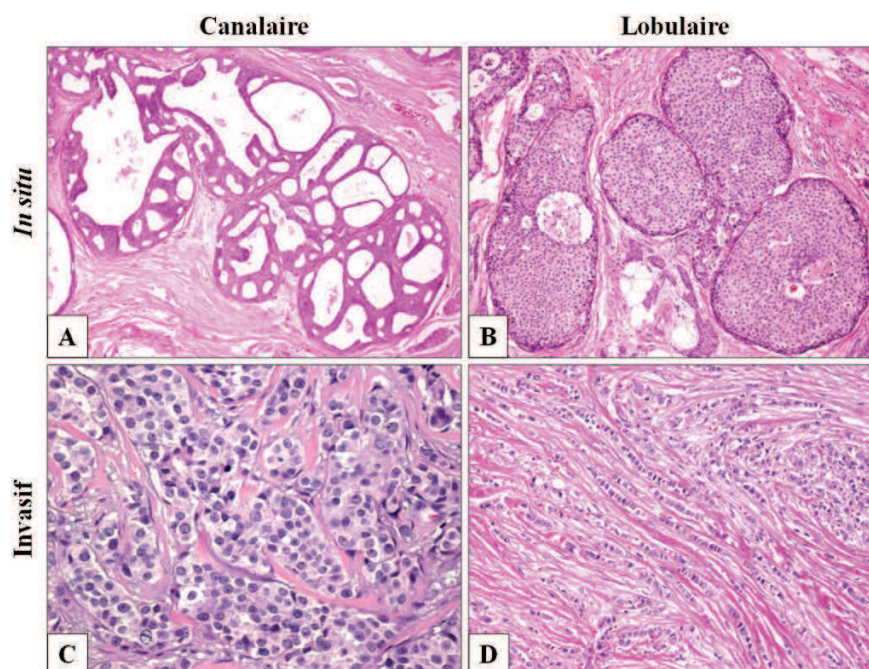


Figure 4. Histologie des principaux types de cancer du sein

Coupes histologiques des carcinomes in situ canauxaux (A) et lobulaires (B) et des carcinomes invasifs canauxaux (C) et lobulaires (D). Les coupes sont marquées à l'hématoxyline et à l'éosine. Images issues du site <http://www.webpathology.com/>.

- **les cancers métastatiques** : les cellules néoplasiques des carcinomes invasifs envahissent le tissu mammaire environnant et peuvent être disséminées à partir d'une tumeur primaire, *via* le réseau lymphatique ou sanguin. 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. Dans la plupart des cancers du sein, les métastases sont principalement localisées au niveau des os, des poumons et du cerveau, et peuvent être également retrouvées dans le foie, la plèvre et la peau.

b) Classification des cancers du sein

Le cancer du sein est une maladie complexe et hétérogène, se composant de plusieurs entités tumorales associées avec des propriétés histologiques, moléculaires et cliniques différentes. C'est pourquoi la classification des cancers du sein est constamment en évolution et, à l'heure actuelle, il n'est plus possible de parler de stades précoces et tardifs.

- **Classification TNM** : elle repose sur la taille de la tumeur, sa localisation et son éventuelle extension. Elle regroupe l'extension anatomique loco-régionale (T0 à T4), l'envahissement ganglionnaire (N0 à N3), et la présence de métastases (M0 ou M1), où 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 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 métastase ou M1 en leur présence, quel que soit leur siège, unique ou multiple. Cette classification permet donc de définir différents stades (Tableau 1).

Stade	Tumeur (T)	Ganglion (N)	Métastase (M)	Description
0	Tis (in situ)	N0	M0	Cancer non invasif
I	T1	N0	M0	Tumeur < 2 cm, pas de propagation à l'extérieur du sein
	T0/1	N0/1		
II	T2	N0/1	M0	Tumeur de 2 à 5 cm et/ou atteinte ganglionnaire satellite mineure
	T3	N0		
III	T0/1/2/3	N2		
	T4	N0/1/2	M0	Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure
	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** : l'approche histologique pour la classification des tumeurs mammaires a été remise en question par des données issues d'études de micro-array sur puces ADN démontrant l'hétérogénéité moléculaire de la maladie. Ainsi, les cancers du sein ont été classifiés sur la base de leur profil d'expression d'environ 500 gènes (Sorlie et al., 2003) et 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*). Cinq sous-types majeurs de cancer du sein ont été identifiés 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) (Brenton et al., 2005; Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001). Des études plus récentes sur des profils génétiques de tumeurs mammaires ont suggéré l'existence de sous-types supplémentaires (Lindeman and Visvader, 2010). Il est maintenant admis que le sous-type basal-like puisse être encore subdivisé, en donnant, par exemple, le sous-type « claudin-low » (Herschkowitz et al., 2007). Une hétérogénéité considérable semble aussi être présente dans les sous-types ER α -positifs (Luminal A et B), ainsi que différents niveaux de surexpression de HER-2/ErbB2 (Allred et al., 2004; Lindeman and Visvader, 2010).

Sous-type	Description
Luminal A	Cancers de bas grade, présentant une réceptivité hormonale importante (ER α ++) et une faible prolifération. Expression des cytokératines luminales 8, 18 et 19, et du récepteur aux œstrogènes GATA3, impliqué dans le contrôle de la croissance et le maintien de la différenciation des tumeurs ER α +
Luminal B	Expression de l'ER α moins importante et prolifération plus forte que dans les tumeurs du type « Luminal A ». De pronostic moins bon, bénéficient de l'introduction de la chimiothérapie en plus de l'hormonothérapie. 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. Associées 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 basé sur l'expression spécifique de certains gènes (Sørlie et al., 2001).

2.3. Mécanismes de la tumorigenèse mammaire

a) Stades de développement d'un cancer

Comme décrite par Weinberg et Hanahan, l'acquisition de six modifications distinctes et complémentaires de la physiologie cellulaire est considérée comme essentielle pour permettre aux cellules transformées de prendre l'ascendant sur les cellules saines (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011) :

Introduction

- indépendance vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire
- insensibilité aux signaux antiprolifératifs
- résistance à l'apoptose
- potentiel répliatif illimité (échappement à la sénescence)
- capacité à induire l'angiogenèse
- acquisition des capacités invasives.

De plus, deux nouvelles caractéristiques ont récemment été proposées comme étant cruciales au développement du cancer : la capacité à modifier le métabolisme cellulaire pour supporter la croissance accrue des cellules cancéreuses et celle d'échapper à la destruction par le système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011).

Bien que les causes et les mécanismes moléculaires du développement du cancer mammaire comme pour la plupart des tumeurs solides soient multiples, il est possible d'identifier un profil commun d'évolution. La transformation des cellules cancéreuses suit un processus multi-étapes où l'accumulation d'altérations génétiques d'une cellule et son expansion clonale amènent à la croissance d'une masse tumorale jusqu'à la formation de foyers métastatiques à distance. Ce processus progressif est lié à une succession de plusieurs stades anatomo-pathologiques. La transformation des cellules normales débute par l'acquisition des capacités prolifératives anormales par des cellules épithéliales de sous-type luminal et basal, provoquée par les premières altérations génétiques, ce qui conduit à la formation de masses bénignes (hyperplasies). Ces dernières peuvent ensuite évoluer vers des stades dysplasiques (ou d'hyperplasie atypique), où les cellules prolifératives commencent à présenter des altérations de l'architecture et de la fonction de l'épithélium, accompagnées par un processus de dédifférenciation cellulaire. Ce stade n'existe qu'au niveau épithélial (hyperplasie et dysplasie sont notées comme des lésions précancéreuses). Les dysplasies les plus agressives vont évoluer vers les stades de carcinomes *in situ*, c'est-à-dire le développement d'une masse de cellules épithéliales prolifératives uniquement au niveau local, sans destruction de la membrane basale. Bien qu'ils altèrent le fonctionnement du tissu épithélial, ces carcinomes détectés à temps sont souvent de bon pronostic. Dans le cas contraire, ces carcinomes évoluent vers les stades de carcinomes invasifs. A ce stade les cellules tumorales franchissent la membrane basale et envahissent le tissu conjonctif. Ce processus d'invasion met en jeu l'activation de nombreux processus cellulaires nécessaires à l'invasion du stroma, comme la perte d'adhérence, et la sécrétion des enzymes protéolytiques. La tumeur maligne doit être

vascularisée pour poursuivre sa croissance et échapper à une hypoxie sévère. Les cellules cancéreuses les plus agressives vont dégrader la membrane basale et essaient à partir de la tumeur primaire par les voies lymphatiques et sanguines. Cela entraîne la formation de métastases avec la colonisation par les cellules cancéreuses d'un nouvel organe à distance et la formation d'une ou plusieurs tumeurs secondaires, souvent à l'origine du décès. L'évolution du tissu normal en cancer est décrit dans figure 5.

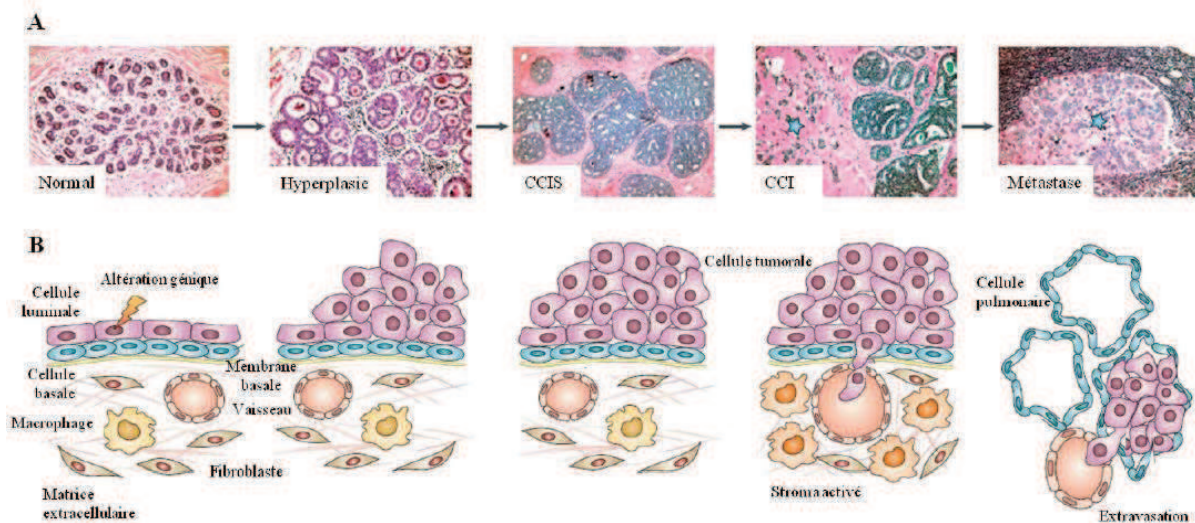


Figure 5. Etapes de la cancérisation d'un épithélium canalaire mammaire

*A partir d'un épithélium sain, les cellules touchées par des altérations génétiques prolifèrent de façon anarchique sous l'influence de divers signaux jusqu'au stade de l'hyperplasie atypique. Les cellules se différencient, acquièrent des modifications structurales et prolifèrent au niveau local pour donner un carcinome in situ. D'autres modifications phénotypiques permettront aux cellules cancéreuses de franchir la membrane basale pour se disséminer en cancer invasif et métastatique. Les différentes étapes sont illustrées : **A**) 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**) représentations schématiques de l'épithélium mammaire et du tissu palléal environnant (Adapté de Vargo-Gogola and Rosen, 2007).*

b) Définition et mécanismes de la transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) caractérise un processus dynamique et réversible, au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et développent des propriétés mésenchymateuses (Figure 6). En effet, les cellules épithéliales sont très spécialisées et sont caractérisées par une polarisation apico-basale. Elles s'organisent en structures cohésives grâce à leurs jonctions intercellulaires : jonctions d'adhérence (E-cadhérine, desmosomes), jonctions serrées (e.g. claudines, occludines) et

jonctions de communication (connexines), ce qui les empêche de sortir de la couche cellulaire. Les cellules mésenchymateuses, au contraire, sont organisées de façon beaucoup plus lâche, avec des contacts intercellulaires très limités et sans polarisation fonctionnelle. Situées généralement dans des tissus conjonctifs, ces cellules sont capables d'interagir avec la matrice extracellulaire (MEC) environnante par l'intermédiaire des intégrines et de la remodeler par la sécrétion de MMPs. Ces cellules présentent une plasticité qui permet leur migration, c'est-à-dire la répétition de phases transitoires d'extension, d'adhésion, de rétractation et de translocation (Thiery and Sleeman, 2006).

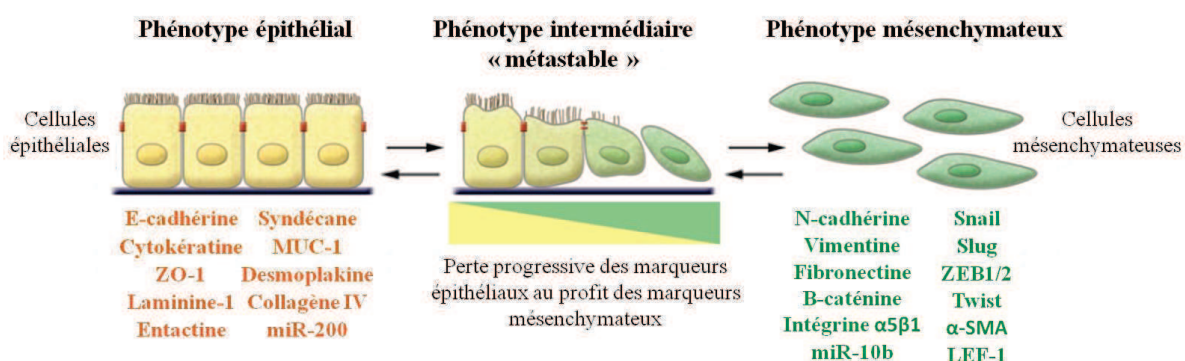


Figure 6. Marqueur moléculaires associés à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

La perte d'adhésion intercellulaire et la réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules épithéliales leur permettent d'acquérir des capacités migratoires. Le mécanisme de TEM est réversible. Les deux états extrêmes sont caractérisés par l'expression de marqueurs spécifiques à chaque situation (Adapté de Kalluri and Weinberg, 2009).

La TEM est associée à un changement du programme génétique conduisant à des modifications architecturales et fonctionnelles complexes, telles que la perte des jonctions cellule-cellule, l'organisation du cytosquelette d'actine, et la production de facteurs pro-invasifs (Thiery et al., 2009). Cette pression de transition est contrebalancée par des stimuli induisant la transition dans le sens inverse, c'est-à-dire une transition d'un phénotype mésenchymateux à un phénotype épithéliale. La TEM est déclenchée par des signaux extracellulaires, comme des facteurs de croissance (Nawshad et al., 2005), des cytokines (Fernando et al., 2011), des MMP (Radisky et al., 2005), des changements dans les composants de la MEC ou par l'hypoxie (Hwang-Verslues et al., 2013). Ces signaux vont activer un réseau complexe de voies moléculaires initiées par l'activation de différents récepteurs membranaires (comme Met, ErbB, TGF β). L'ensemble de ces événements détermine l'activation de facteurs de transcription tels que Snail (Snai1), Slug (Snai2), Twist, ZEB1/2, responsables de l'inhibition d'expression de marqueurs des cellules

épithéliales (E-cadhérine, cytokératines) et/ou de la surexpression des marqueurs des cellules mésenchymateuses (vimentine, N-cadhérine, fibronectine,...) (Nieto and Cano, 2012; Peinado et al., 2007).

On distingue trois types de TEM en fonction de leur rôle biologique. La TEM de type I intervient pendant l'embryogenèse et la formation des tissus (Lim and Thiery, 2012). La TEM de type II réfère à une transdifférenciation des cellules lors de phénomènes physiologiques comme la cicatrisation ou la régénération des tissus, mais aussi dans la formation de fibrose. Enfin, la TEM de type III est caractéristique d'un développement pathologique avancé, la néoplasie et la formation de métastases (Kalluri and Weinberg, 2009).

La TEM des cellules cancéreuses conduit à une perte des propriétés adhésives et à l'acquisition des propriétés migratoires et protéolytiques nécessaires à la formation de métastases (Vega et al., 2004). Au sein des tumeurs, le gain de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine ou Snail1, et/ou la perte de marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine par exemple, sont directement corrélés à la progression tumorale et au mauvais pronostic (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Peinado et al., 2004).

c) Altérations génétiques

Les altérations génétiques peuvent provoquer une inactivation des gènes suppresseurs de tumeur et/ou l'activation d'oncogènes (Mavaddat et al., 2010). Le nombre d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur recensés ne cesse de s'accroître. Dans le cancer du sein, les principaux oncogènes codent des protéines impliquées dans de nombreuses cascades de transduction : des récepteurs aux facteurs de croissance, des facteurs de transcription ou des protéines du cycle cellulaire (Lee and Muller, 2010).

❖ Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs

Selon leur formation, les gènes suppresseurs de tumeurs peuvent être subdivisés en trois groupes :

- (i) les garants de la stabilité du génome, ou « *caretakers* », tels que *TP53* ou *BRCA*, impliqués dans la réparation de l'ADN ;
- (ii) les inhibiteurs de la prolifération cellulaire, ou « *gatekeepers* », comme la protéine Rb (*Retinoblastome*), inhibiteur du cycle cellulaire, ou PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), inhibiteur de la PI3-K (*Phosphoinositide 3-kinase*) ;

(iii) les modulateurs du microenvironnement cellulaire et de l'implantation tumorale, ou « *landscapers* », comme l'E-cadherine ou CD44.

Leur mode de fonctionnement requiert le plus souvent l'inactivation concomitante des deux allèles d'un même anti-oncogène (perte d'hétérozygotie) pour aboutir à une perte de fonction (Knudson, 1993). Cette inactivation peut être déterminée par des mutations ponctuelles, des microlésions (insertions ou délétions), ou par une combinaison de ces événements. Plus récemment, il a été démontré que l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs peut être inactivée par méthylation du promoteur du gène. Selon le modèle de Knudson expliquant les syndromes de prédisposition héréditaire aux cancers, cette situation peut également arriver lorsqu'un individu présente une mutation d'un allèle 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).

Des gènes majeurs de prédispositions aux cancers du sein et de l'ovaire, mais aussi du pancréas et de la prostate sont ***BRCA1 et BRCA2*** (O'Donovan and Livingston, 2010). Des mutations au niveau de ces gènes sont associées à un risque de développement du cancer de 60-70% pour *BRCA1* et 40-60% pour *BRCA2*. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la réparation des endommagements double-brins à l'ADN mais aussi dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la régulation de la transcription *via* leur interaction avec Rad51, p53 ou encore l'ARN polymérase II (Maxwell and Domchek, 2012; Yoshida and Miki, 2004).

❖ Activation d'oncogènes

Un oncogène est, par définition, un gène dont l'activation favorise l'apparition et/ou le développement de tumeurs. Les mécanismes d'activation des oncogènes peuvent être multiples : amplification génique (surproduction de la protéine), délétion des zones régulatrices, mutation ponctuelle (activation constitutive de l'oncoprotéine), réarrangements structurels (translocations chromosomiques), intégration virale et dérégulation de l'expression (par stabilisation de l'ARN messager codant pour une oncoprotéine). Les oncogènes agissent principalement sur la transduction des signaux de prolifération (FGF, PDGF, EGFR, Erb-B2, Ras, Raf, MEK, Myc...), dans le contrôle positif du cycle cellulaire (Cycline-D1, Cdk4, Cdc25), dans la régulation négative de l'apoptose (Bcl-2, Bcl-XL, Survivine), dans la dissémination métastatique (métalloprotéases, protéines d'adhésion cellulaire) ou encore dans l'angiogenèse (VEGF,

Vascular Endothelial Growth Factor). Dans le cancer du sein, les anomalies génétiques les plus fréquemment observées déterminant l'activation des proto-oncogènes sont des amplifications d'ADN, alors que les mutations ponctuelles, réarrangements et insertions géniques sont rarement observés (Osborne et al., 2004). Trois oncogènes ont été retrouvés amplifiés dans plus de 15% des tumeurs mammaires : *MYC*, *ERB-B2*, *CCND1*.

- ***MYC***: localisé sur le chromosome 8q24, ce gène code pour un facteur de transcription impliqué dans la croissance, la différenciation cellulaire et dans 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).
- ***Erb-B2 (HER-2)*** : localisé en 17q21-22, ce gène appartient à la famille des gènes Erb-B, codant pour des récepteurs transmembranaires ayant une activité tyrosine kinase et qui sont tous surexprimés à différents degrés dans le cancer du sein. Erb-B2 est impliqué dans de nombreux processus tels que la prolifération, l'angiogenèse, les interactions cellule/cellule, la formation de métastases ou encore la résistance à l'apoptose (Moasser, 2007). Le gène Erb-B2 est significativement amplifié et surexprimé dans environ 20% des cancers de sein invasifs et dans 60% des comédocarcinomes (cancers mammaires qui se développent dans les canaux galactophores). Les tumeurs HER-2 positif 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 chimiothérapies.
- ***CCND1***: localisé sur le chromosome 11q13, ce gène code pour la cycline D1, un régulateur de la progression dans le cycle cellulaire mais agissant également comme régulateur transcriptionnel. *CCND1* est surexprimé dans environ 50% des cancers du sein et est amplifié seulement dans le 15% des cas (Arnold and 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).

d) Modifications épigénétiques

L'épigénétique désigne des modifications de l'expression de gènes n'impliquant aucun changement de la séquence du génome, dont la stabilité est essentielle pour le maintien des fonctions de chaque type cellulaire. L'importance des altérations épigénétiques comme cause (plutôt que conséquence) dans la tumorigenèse a été établie relativement tard par rapport à l'étude des causes génétiques. Les changements épigénétiques majeurs associés à la cancérogenèse sont la méthylation aberrante de l'ADN au niveau des dinucléotides CpG et les modifications post-traductionnelles des extrémités amino-terminales des histones (Lund and van Lohuizen, 2004). Les dinucléotides CpG sont répartis de façon non aléatoire sur le génome humain. Des régions particulièrement enrichies en CpG, connues comme îlots CpG, se situent au niveau du promoteur et/ou du premier exon de nombreux gènes. Dans des conditions normales, la plupart des dinucléotides CpG sont méthylés, à l'exception des îlots CpG. Ceci permet l'acétylation des histones au niveau de ces régions, ainsi que le maintien de la chromatine dans un état accessible aux complexes de transcription. Dans les cellules cancéreuses, les profils de méthylation sont souvent perturbés, avec une hypométhylation globale, accompagnée d'une hyperméthylation des îlots CpG, en rendant ces zones inaccessibles aux complexes de transcription, empêchant ainsi l'expression du gène (Feinberg and Tycko, 2004). Dans les cancers du sein, des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *BRCA1*, *Rb1*, *TP53*, *CDKN2A* (*Cyclin-Dependent Kinase inhibitor-2A*), *FZR-1* (*Fizzy/cell division cycle 20 related-1*) et *PTEN* sont communément inactivés par des modifications épigénétiques lors de la tumorigenèse. De la même façon, l'hypométhylation généralisée que l'on observe dans les cellules cancéreuses peut toucher des zones méthylées dans les tissus normaux et déterminer, par conséquence, la réactivation de certains gènes, comme des oncogènes. De plus, l'hypométhylation peut prédisposer l'ADN à des cassures ou à des remaniements chromosomiques au niveau de séquences satellites péri-centromériques (Stefansson and Esteller, 2013).

Des modifications du niveau d'acétylation et de méthylation des résidus lysine aux extrémités amino-terminales des histones peuvent affecter l'état transcriptionnel de la chromatine. Le niveau d'acétylation, réglé par les histones-désacétylases et les histones-acétyltransférases, et de méthylation, réglé par les histones-méthyltransférases, permettent de passer dans un état de la chromatine accessible pour la transcription à un état réprimé (Jenuwein and Allis, 2001). L'intérêt qui a été porté ces dernières années aux modifications épigénétiques lors du développement tumoral est lié au fait que ces

modifications, contrairement aux altérations génétiques, sont dynamiques et réversibles. La thérapie épigénétique, basée sur l'utilisation de modulateurs de l'acétylation des histones et de la méthylation de l'ADN, est déjà en essais cliniques (Previati et al., 2013).

e) Influence du microenvironnement tumoral

Les cellules épithéliales mammaires font partie d'un microenvironnement complexe qui comprend la matrice extracellulaire (MEC) et une grande variété de cellules non-épithéliales comme les cellules myoépithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les adipocytes, les lymphocytes et les macrophages.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.2, dans des conditions physiologiques, ce microenvironnement contrôle l'homéostasie de la glande mammaire par des communications dynamiques. Ces communications se font parfois de manière directe, par le biais de complexes jonctionnels, et, le plus souvent, par des facteurs solubles sécrétés dans le milieu extracellulaire, tels que les hormones, les facteurs de croissance et les chimiokines. De plus, un microenvironnement sain peut être capable d'inhiber l'initiation et la progression tumorale (Bissell and Hines, 2011).

Néanmoins, sous l'effet des cellules tumorales elles-mêmes (sécrétion de facteurs de croissance comme le FGF, VEGF, PDGF, EGF, TGF α et β), le stroma péri-tumoral est profondément remodelé. Le stroma péri-tumoral, dit réactif, se caractérise par des modifications biochimiques de la MEC, dues à la sécrétion d'enzymes protéolytiques, capables de remodeler le MEC et la membrane basale, et par la forte augmentation des populations cellulaires du stroma : infiltrations des cellules inflammatoires et immunitaires, forte vascularisation de vaisseaux sanguins et lymphatiques et accumulation de fibroblastes activés (CAF, *cancer-associated fibroblasts*).

L'établissement de la tumeur au niveau du sein nécessite une étroite relation entre les différents types cellulaires (Rønnov-Jessen et al., 1996). Sous l'influence des cellules cancéreuses, le stroma peut jouer à la fois un rôle de suppresseur de tumeur ou pro-tumoral (Mueller and Fusenig, 2004). En effet, une perturbation de l'homéostasie du microenvironnement peut avoir des effets pro-oncogéniques et favoriser la transformation des cellules cancéreuses. Par exemple, des études ont démontré que la formation des tumeurs mammaires humaines suite aux xénogreffes en souris est dépendante de la présence de fibroblastes dérivant du stroma tumoral humain (Kuperwasser et al., 2004).

Introduction

Un exemple intéressant est illustré par le TGF- β , un facteur considéré comme un puissant suppresseur de tumeur dans les cellules normales et à des stades cancéreux précoces, grâce à ses capacités à inhiber la croissance cellulaire, et induire l'apoptose et la différenciation. Le TGF- β peut au contraire jouer un rôle dans les stades plus tardifs en stimulant l'invasion, la formation de métastases et l'angiogenèse (Chang et al., 2007). La sécrétion d'importantes quantités de TGF- β par les cellules tumorales stimule la différenciation des CAF, qui vont sécréter de nombreux facteurs prolifératifs et antigéniques 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 (FGF, 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 and Weinberg, 2001; Padua and Massagué, 2009). Ces molécules vont diminuer l'apoptose, augmenter la prolifération cellulaire, inhiber l'adhésion cellulaire, stimuler le potentiel migratoire et invasif des cellules, et induire une transition épithélio-mésenchymateuse et le chimiotactisme vers les organes distants, favorisant ainsi le développement de métastases.

Les cellules cancéreuses mammaires peuvent aussi mobiliser les cellules immunitaires et inflammatoires. Les macrophages associés à la tumeur (TAM, *Tumor Associated Macrophages*), qui dans le cancer du sein peuvent constituer jusqu'à 50% de la masse tumorale, peuvent sécréter de l'EGF et induire ainsi la migration/invasion des cellules tumorales (Goswami et al., 2005; Obeid et al., 2013). De la même façon, la sécrétion du VEGF par les cellules tumorales permet la néo-angiogenèse nécessaire au développement de la tumeur par le recrutement des cellules endothéliales et des précurseurs circulants (Takakura, 2011).

Enfin, les adipocytes, présents en très grand nombre dans le microenvironnement de la glande 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 type VI, pouvant réguler la croissance des cellules cancéreuses du sein (Iyengar et al., 2005; Vona-Davis and Rose, 2007).

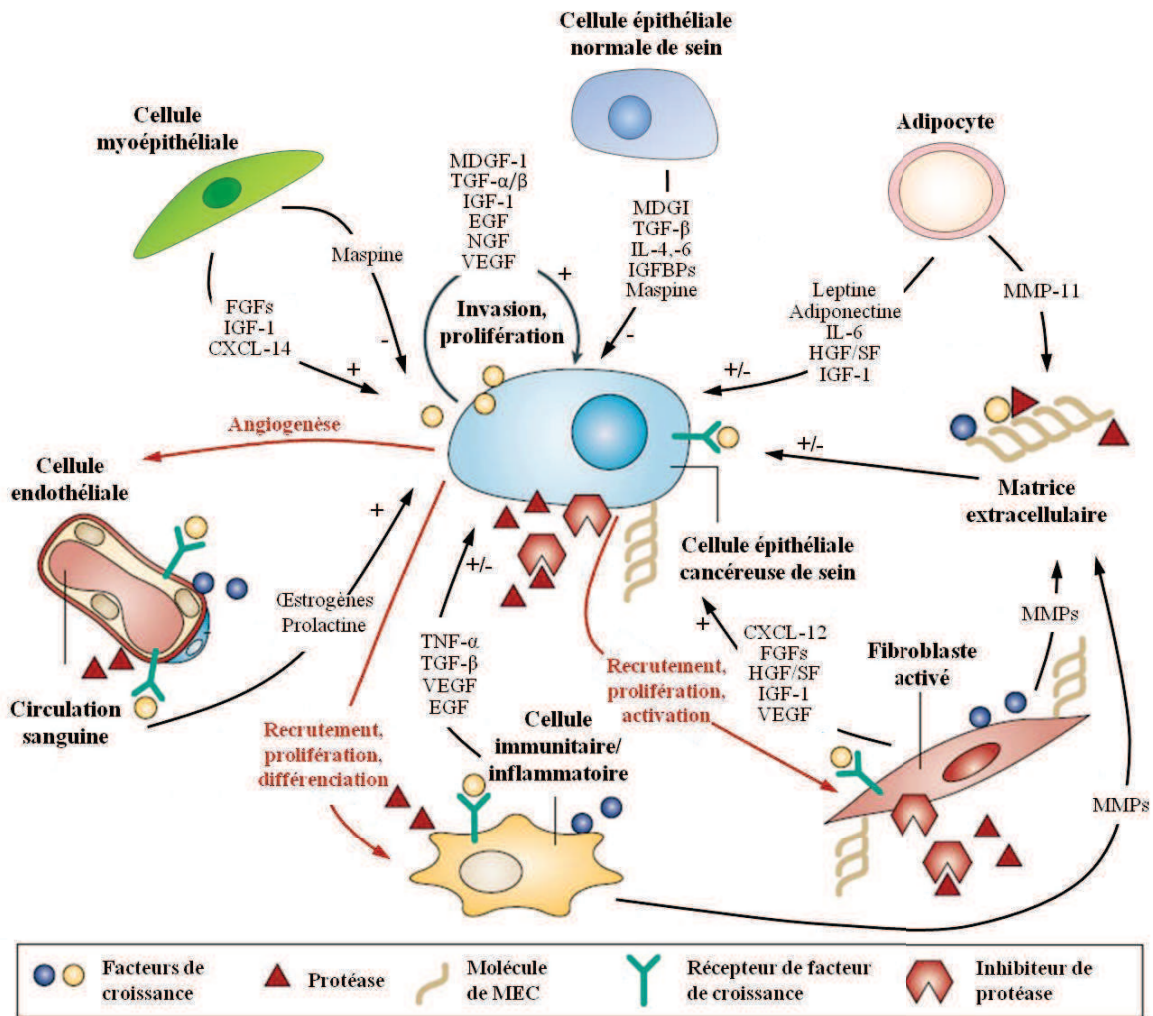


Figure 7. Relations entre les cellules épithéliales cancéreuses mammaires et le microenvironnement tumoral

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 « - » (Adapté de Mueller and Fusenig, 2004).

f) Le rôle des facteurs de croissance dans le développement tumoral

Parmi les facteurs responsables de l'évolution de cancer du sein, les facteurs de croissance jouent un rôle essentiel comme médiateurs des interactions stroma-tumeur et sont impliqués dans l'induction, la progression tumorale et l'acquisition des potentialités métastatiques.

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les facteurs de croissance peuvent être sécrétés par les cellules cancéreuses elles-mêmes, mais aussi par les différentes composantes du microenvironnement. Les facteurs de croissance impliqués dans le développement du cancer du sein sont surtout le TGF-β, le FGF, le HGF/SF, l'EGF et le

VEGF. 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 neurotrophine-4/5 (NT-4/5) et ces facteurs induisent la prolifération, la survie et/ou la migration de ces mêmes cellules (Descamps et al., 2001a; Dollé et al., 2003; Vanhecke et al., 2011). Le NGF produit par les cellules cancéreuses mammaires agit également de manière paracrine en augmentant la migration et l'invasion des cellules endothéliales (Dollé et al., 2005; Romon et al., 2010)

Dans ce contexte, les facteurs de croissance, leurs récepteurs et leurs voies de signalisation associées sont des cibles thérapeutiques privilégiées dans le cancer du sein (Alvarez et al., 2010).

2.4. Cancer du sein et thérapies

Le traitement du cancer du sein repose principalement sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, qui sont souvent complétées par l'hormonothérapie (tamoxifène, anti-aromatases) et/ou d'autres thérapies ciblées. Cependant, ces traitements ciblés ne sont pas indiqués dans tous les cas et la résistance intrinsèque ou acquise suite à ces traitements est la principale cause de récurrence chez de nombreux patients. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques reste donc primordiale pour améliorer l'efficacité des traitements du cancer du sein.

❖ Les thérapies ciblées

Le développement des thérapies ciblées est strictement lié aux progrès dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse. Ainsi, les thérapies ciblées les plus utilisées dans le cancer du sein ont été développées en réponse aux cancers métastatiques et/ou surexprimant le récepteur HER-2. L'Herceptine[®] (ou trastuzumab, anticorps monoclonal humanisé anti-HER-2) et l'Avastin[®] (ou bevacizumab, anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF) en sont des exemples.

D'autres études visent à cibler les voies pro- et anti- apoptotiques dérégulées dans les cellules cancéreuses par des altérations génétiques ou épigénétiques. En font partie les approches basées sur l'exploitation de la cytokine TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), capables d'induire l'apoptose dans de nombreuses cellules cancéreuses sans affecter la viabilité des cellules normales.

Introduction

L'inhibition des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (RTK) fait l'objet de plus en plus d'essais cliniques. Les RTK sont principalement des récepteurs des facteurs de croissance fréquemment surexprimés et/ou suractivés dans les cancers. D'une manière générale, toutes ces nouvelles thérapies se divisent en trois grandes familles :

- les anticorps monoclonaux se liant au domaine extracellulaire des RTK, empêchant soit la fixation de leur ligand, soit leur homo/hétérodimérisation et l'activation des voies de signalisation sous-jacentes (e.g. trastuzumab et pertuzumab, ciblant HER-2 ; gefitinib ou erlotinib, visant EGFR ; sunitinib, ciblant les récepteurs du VEGF) (Adams and Weiner, 2005);
- les petites molécules inhibitrices de l'activité kinasique qui vont entrer en compétition avec l'ATP (*Adenosine TriPhosphate*) au niveau du domaine de liaison intracellulaire du récepteur (Zhang et al., 2009);
- les anticorps monoclonaux dirigés contre le ligand et empêchant l'activation du récepteur (e.g. bevacizumab, visant le VEGF).

Par ailleurs, des inhibiteurs à large spectre inhibant plusieurs RTK ont été développés. Le sunitinib, par exemple, cible les trois récepteurs du VEGF, les PDGFR α et β , c-Kit, le récepteur RET (*REarranged during Transfection*), FLT3 (*FMS-Like Tyrosin kinase 3*) et le récepteur CSF-1. Cet inhibiteur, déjà utilisé pour les cancers du rein et les tumeurs stromales digestives, a également montré des résultats prometteurs contre le cancer du sein.

Des molécules inhibitrices de plusieurs voies de signalisation sont également utilisées. Ainsi, la voie PI3-K/Akt, la voie Src, la voie des MAPK sont ciblées dans le cancer du sein (Maurer et al., 2011).

❖ Mécanismes de résistance aux thérapies

Le développement de traitements spécifiquement élaborés pour cibler chacun des sous-types moléculaires du cancer du sein a offert un espoir d'amélioration dans la survie des patients présentant des métastases. Malgré cela, plusieurs facteurs concourent à une résistance des cellules cancéreuses de sein vis-à-vis de ces traitements.

Plusieurs observations semblent montrer que les mutations ne suffisent pas à expliquer la résistance, car la présence des mutations ne confère pas systématiquement un avantage de croissance aux cellules résistantes exposées à une pression de sélection d'une drogue.

Depuis quelque temps, les recherches semblent indiquer qu'un des mécanismes responsables de la résistance aux traitements tient à l'existence de sous-populations dans le

Introduction

cancer présentant des propriétés de cellules souches. De par leurs propriétés (analysées dans le paragraphe §B.3.3), les cellules souches cancéreuses (CSC) pourraient en effet contribuer à la résistance aux traitements et aux récurrences. Le développement de stratégies pour cibler efficacement cette population de cellules pourrait améliorer l'issue clinique des patients. Dans la lutte contre le cancer, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui gouvernent les différentes populations de cellules souches cancéreuses reste un enjeu majeur.

B. Les cellules souches

1. La cellule souche : propriétés, spécification et différenciation

La mise en évidence de l'existence des cellules souches remonte aux années 60 grâce aux expériences de Till et McCulloch sur les précurseurs hématopoïétiques (Till and McCulloch, 1961). L'injection de moelle osseuse dans des souris irradiées (afin d'éliminer les cellules résidentes) a permis de constater la présence de précurseurs capables de se multiplier et de se différencier. Ils ont ainsi permis de définir qu'une cellule souche est une cellule indifférenciée (non spécialisée) pluri/multipotente capable, lorsqu'elle est placée dans un environnement approprié, (i) de s'auto-renouveler indéfiniment par division cellulaire et (ii) de générer d'autres types cellulaires plus spécialisés, par l'acquisition d'une morphologie et d'une fonction spécifique du tissu.

1.1. Potentialité des cellules souches

Au fur et à mesure que les cellules évoluent depuis l'état de cellule souche jusqu'à leur différenciation terminale, leur potentialité, c'est-à-dire leur capacité à donner des types cellulaires différents, diminue, tandis que leur degré de différenciation augmente (Figure 8).

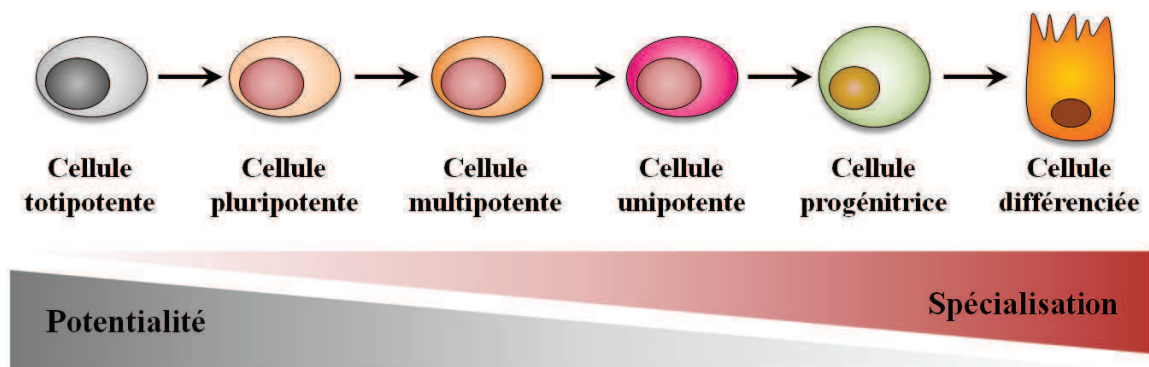


Figure 8. L'évolution des cellules souches

Les cellules souches sont hétérogènes par leur potentiel de différenciation. Lorsqu'une cellule souche s'engage dans un lignage cellulaire son potentiel de différenciation se restreint et la cellule devient de plus en plus spécialisée.

Introduction

Toutes les cellules souches ne disposent pas du même potentiel de différenciation et il est important de faire la différence entre quatre types de cellules souches (Figure 9) :

- les cellules souches **totipotentes**, issues des premières divisions de l'œuf fécondé, sont capables de donner naissance à tous les types cellulaires de l'organisme et, plus encore, de permettre le développement complet d'un individu.
- Les cellules souches **pluripotentes**, représentées par les **cellules souches embryonnaires** (ESC, pour *Embryonic Stem Cells*), sont dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste (le bouton embryonnaire), une structure de 16-40 cellules issues des divisions de l'ovocyte fécondé. Ces cellules sont à l'origine des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) et peuvent conduire à la formation de tous les tissus de l'organisme (Evans and Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998).
- Les cellules souches **multipotentes** (cellules fœtales et adultes) sont des cellules capables de générer plusieurs types cellulaires mais sont pour la plupart déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique. Ces cellules, généralement regroupées au sein d'un même organe ou tissu, sont très hétérogènes, puisqu'elles peuvent produire des cellules de morphologie et de fonction très différentes. Chez l'adulte, ces cellules servent à réparer les tissus lésés, malades, ou simplement vieillissants.
- Les cellules souches **unipotentes**, une catégorie de cellules souches adultes, sont capables de fournir qu'un seul type cellulaire, tout en s'autorenouvelant (e.g. cellules souches unipotentes de la peau, du foie et de l'intestin).

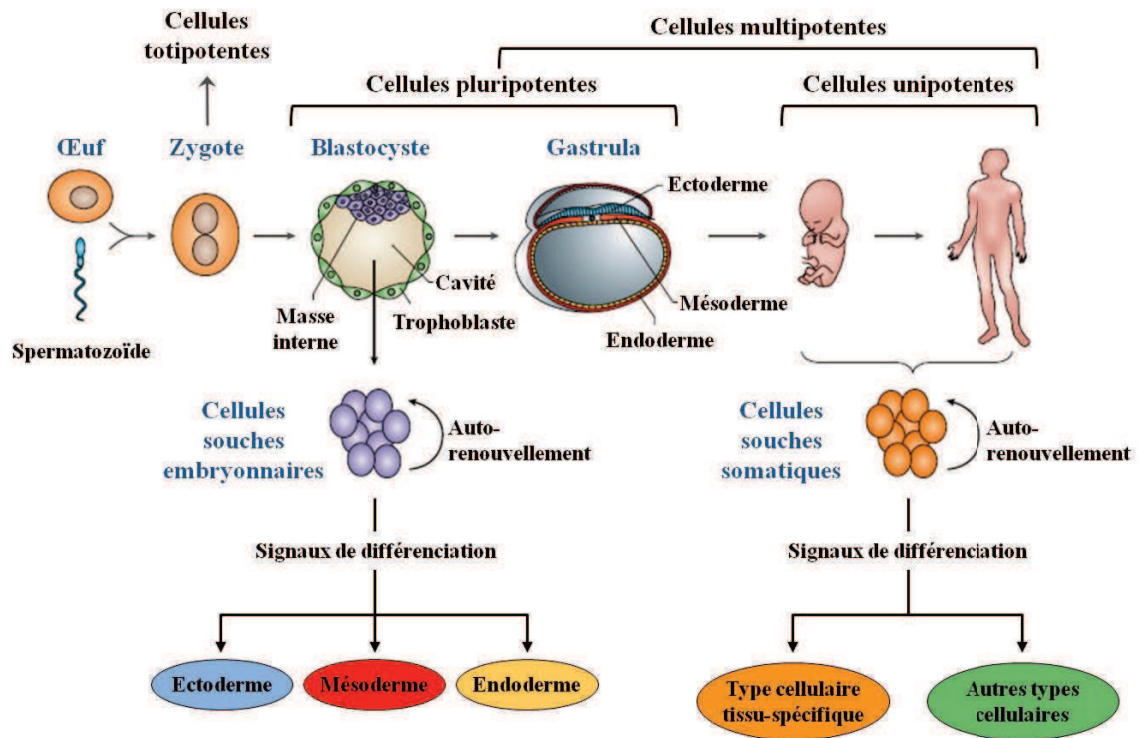


Figure 9. Origine des cellules souches embryonnaires et adultes

La fusion de l'ovocyte et du spermatozoïde détermine la formation d'un zygote diploïde et entraîne le début d'un cycle de divisions cellulaires résultant en un embryon pluricellulaire. Le stade de blastocyste est caractérisé par une masse cellulaire interne (le bouton embryonnaire), une cavité et une couche cellulaire externe (le trophoblaste). Les cellules souches embryonnaires dérivent de la masse interne du blastocyste ; en culture ces cellules sont capables de se différencier en cellules des trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme). Les cellules souches somatiques, quant à elles, sont présentes dans plusieurs tissus fœtaux et adultes. Ces cellules peuvent s'autorenouveler et se différencier en plusieurs types cellulaires tissu-spécifiques (Adapté de O'Connor and Crystal, 2006).

1.2. L'autorenouvellement

L'autorenouvellement désigne la capacité des cellules souches à proliférer et à produire des copies d'elles-mêmes sur une période indéfinie, tout en gardant leur pluri/multipotence et leur potentiel régénératif. Pour cela, la cellule doit être capable d'entrer dans le cycle cellulaire et au moins une des cellules filles doit rester indifférenciée (Fuchs and Chen, 2013). Cette capacité dérive du fait que les cellules souches peuvent se diviser soit de façon symétrique, soit asymétrique.

Les divisions symétriques produisent deux cellules filles identiques à la cellule souche d'origine, ce qui contribue à l'amplification du compartiment de cellules souches. La division asymétrique, quant à elle, génère une cellule souche identique à la cellule

d'origine et une cellule aux potentialités plus restreintes (Figure 10). Cette cellule, appelée cellule progénitrice (ou cellule d'amplification transitoire), s'engage dans un processus de différenciation spécifique du tissu dans lequel elle se situe (He et al., 2009). La plupart des connaissances sur le contrôle de l'autorenouvellement et sur les mécanismes de division des cellules souches dérive des expériences réalisées sur la *Drosophile* (Knoblich, 2008; Siller and Doe, 2009). La division asymétrique est caractérisée par la polarisation du plan de clivage et une ségrégation disproportionnée de certains composants au moment de la mitose, sous l'influence d'un environnement spécialisé (paragraphe §B.1.5).

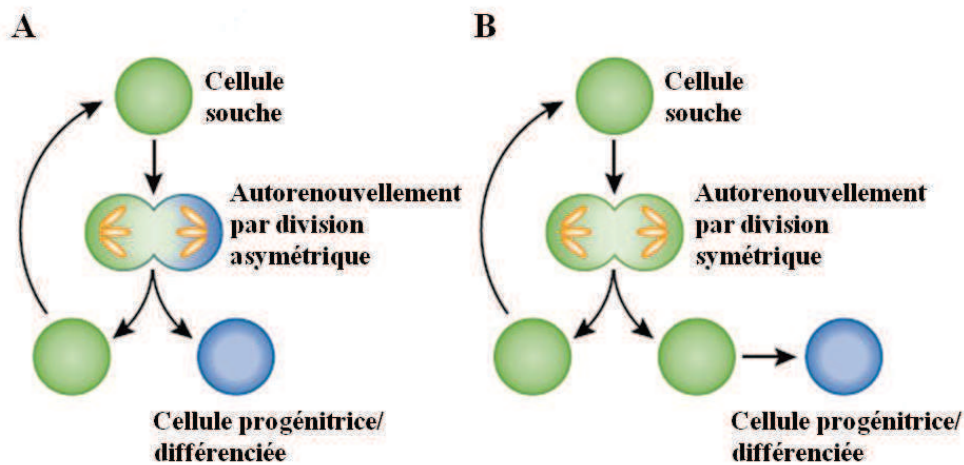


Figure 10. Autorenewement des cellules souches par division asymétrique ou symétrique

Selon l'orientation du plan de clivage, les cellules souches peuvent se diviser asymétriquement (A), pour donner une cellule souche et une cellule progénitrice qui entre en phase de différenciation, ou symétriquement (B) pour donner deux cellules souches (Adapté de Fuchs and Chen, 2013).

Comme l'a été décrit Andreas Trumpp dans le système hématopoïétique, les cellules souches peuvent se répartir en deux états physiologiques distincts : à l'intérieur d'une même niche il y aurait des cellules souches en un état de dormance cellulaire et d'inactivité biologique (appelées *Long-Term stem cells*, LT-SC), et d'autres cellules souches activées (*Short-Term, stem cells*, ST-SC) capables de s'autorenouveler (Trumpp et al., 2010). Cependant, les ST-SC sont aussi principalement quiescentes et leur division est rapidement induite en cas de nécessité, grâce à la présence de modifications bivalentes de la chromatine au niveau des promoteurs des gènes responsables de l'autorenouvellement (mieux décrit dans le chapitre §B.1.6-a). D'un point de vue physiologique, les ST-SC seraient dans un état de « pause », avec la machinerie de transcription prête à être activée en cas de nécessité. En effet, dans la plupart des tissus (e.g. peau, sang, intestin),

L'autorenouvellement est strictement connecté à la régénération tissulaire et au maintien de l'homéostasie cellulaire.

1.3. La plasticité des cellules souches : modèle hiérarchisé et réversibilité

L'évolution des cellules souches jusqu'à la différenciation finale en cellules spécialisées semble suivre une évolution hiérarchique stricte. Néanmoins, il se peut qu'une cellule souche adulte d'un lignage cellulaire puisse générer des cellules différenciées issues d'un autre lignage cellulaire. On parle dans ce cas de plasticité cellulaire. Cette plasticité a été démontrée pour la première fois en transplantant des cellules souches de la moelle osseuse dans le cerveau de souris adultes. Ces cellules souches, une fois placées dans leur nouveau environnement tissulaire, ont ainsi pu générer des astrocytes (Eglitis and Mezey, 1997). La découverte que les cellules souches soient moins spécialisées que communément admis ouvre des perspectives extraordinaires pour la thérapie cellulaire et l'espoir d'une nouvelle médecine régénérative.

De manière encore plus surprenante, des cellules non souches déjà engagées dans un lignage cellulaire semblent pouvoir se dédifférencier vers un état supérieur dans la hiérarchie de spécification. Cette capacité de dédifférenciation (ou transdifférenciation) est très alléchant d'un point de vue théorique, mais elle n'a toujours pas été prouvée en conditions physiologiques. Néanmoins, plusieurs méthodes expérimentales d'induction de la pluripotence ont été mises en place. Ces techniques, regroupées sur le terme de « reprogrammation », sont substantiellement basées sur :

- le **transfert nucléaire somatique**, par transplantation du noyau d'une cellule somatique adulte dans un ovocyte préalablement énucléé. Le noyau transféré subit une reprogrammation qui lui permet de contrôler l'évolution vers une blastocyste (principe du clonage de la brebis Dolly) (French et al., 2008; Gurdon et al., 1979) ;
- la **fusion cellulaire**, par exposition à des facteurs exprimés dans des cellules pluripotentes (comme des ESC) (Do and Schöler, 2010) ;
- la **reprogrammation nucléaire** directe, par la surexpression de facteurs de transcription spécifiques avec génération de cellules souches pluripotentes induites (iPS, *induced Pluripotent Stem cell*).

Cette dernière méthode a été mise en place par des chercheurs de l'université de Kyoto en 2006, qui ont reprogrammé des fibroblastes murins en surexprimant quatre facteurs de

transcription impliqués dans la pluripotence des ESC (Oct-4, Sox-2, Klf4 et c-Myc) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ces cellules reprogrammées présentent des caractéristiques comparables à celles des cellules souches embryonnaires en termes de morphologie, de prolifération et d'expression de marqueurs de pluripotence (Amabile and Meissner, 2009; Wernig et al., 2007).

Depuis sa découverte, cette méthode connaît un développement extraordinaire du fait des perspectives qu'elle ouvre en thérapie cellulaire. Cependant, de nombreux problèmes techniques et intrinsèques empêchent une application clinique immédiate, comme l'utilisation de rétrovirus lors de la reprogrammation, l'utilisation d'oncogènes (i.e. c-Myc), ou encore la présence de marques épigénétiques spécifiques de la cellule différenciée qui subsistent lors de la reprogrammation. Des solutions sont déjà étudiées, comme la possibilité de reprogrammation par des méthodes non virales ou l'exclusion de c-Myc du processus (Nakayama, 2009; Wang et al., 2013). Cependant, une meilleure caractérisation moléculaire et cellulaire de la pluripotence ainsi qu'une amélioration des procédés de transfection des cellules restent nécessaires.

1.4. La quiescence

Le potentiel d'autorenouvellement des cellules souches n'implique pas nécessairement que ces cellules prolifèrent de façon continue en condition physiologique. Au contraire, à chaque instant seule une faible proportion de cellules souches entre en cycle, alors que la majorité demeure en phase G0 du cycle cellulaire, ou phase de quiescence. La régulation de la balance entre prolifération et quiescence permet de maintenir un stock constant de cellules souches pouvant approvisionner l'organisme à tout moment, tout au long de la vie d'un individu. De plus, l'état de quiescence permet de protéger les cellules souches contre les stress génotoxiques (radiations, produits toxiques, stress oxydatif,...) (Alison et al., 2012).

Des analyses transcriptomiques parallèles des cellules souches quiescentes intestinales, neuronales, musculaires et du bulbe capillaire (Blanpain et al., 2004; Fukada et al., 2007; Morris et al., 2004; Muñoz et al., 2012) ont révélé la présence d'une signature génétique commune. De façon peu surprenante, des gènes liés à la réplication de l'ADN et à la progression dans le cycle cellulaire (cyclines A2, B1, E2, survivine), à la prolifération (PCNA, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), ou à la fonction mitochondriale (CYCS,

Cytochrome c), sont peu exprimés dans les cellules souches, ce qui reflète leur faible métabolisme (Cheung and Rando, 2013).

A l'inverse, les cellules souches quiescentes surexpriment des gènes codants pour des molécules impliquées dans la régulation transcriptionnelle et dans le choix du lignage cellulaire, comme *FOXO3* (*Forkhead box O3*) ou *EZH1* (*Enhancer of Zeste Homolog 1*). Il semble qu'une partie importante de leur régulation soit contrôlée par des ARN non codants, comme les miRNA, ce qui a permis d'établir récemment une signature quiescence-spécifique de l'expression des miRNA (Arnold et al., 2011). Ainsi, dans les cellules souches hématopoïétiques, miR-126 contrôle la quiescence en inhibant plusieurs composants de la voie de signalisation PI3K-AKT (Lechman et al., 2012).

1.5. La niche cellulaire

La régulation de la biologie et de l'homéostasie des cellules souches est principalement orchestrée par leur microenvironnement, aussi appelé « niche ». Le concept de niche a été développé en 1889 à la suite des études de Stephen Paget et de sa théorie de *seed and soil* (graine-sol) sur le développement de métastases. Paget soutenait que le développement de différentes tumeurs et leur capacité à métastaser étaient dépendants de l'interaction entre une cellule spécifique (la graine, c'est-à-dire la cellule cancéreuse) et son environnement spécifique (le sol) (Ribatti et al., 2006). Dans les années 70 Schofield a proposé l'existence d'une structure anatomique permettant de garder les cellules souches hématopoïétiques dans un état indifférencié (Schofield, 1978). La confirmation de l'existence d'une niche cellulaire et la compréhension de ses mécanismes de régulation *in vivo* sont dues aux expériences réalisées sur des organismes modèles comme *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans* (Kimble and White, 1981; Xie and Spradling, 2000). La taille et la disponibilité des niches représentent une limite physique au nombre de cellules souches présentes dans un tissu.

Les composants primaires de la niche des cellules souches sont (Jones and Wagers, 2008):

- les cellules stromales de support (e.g. les fibroblastes), qui interagissent directement avec les cellules souches par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, jonctions communicantes ou par l'intermédiaire de facteurs solubles ;
- la matrice extracellulaire, qui fournit la structure et les signaux mécaniques à la niche

- des vaisseaux sanguins qui fournissent des signaux systémiques et permettent la mobilisation des cellules souches ;
- des fibres nerveuses.

Même si toutes les niches ne comprennent pas nécessairement tous ces composants, la niche représente une entité complexe et dynamique pour l'intégration de plusieurs signaux provenant du tissu ou de l'organisme (Figure 11).

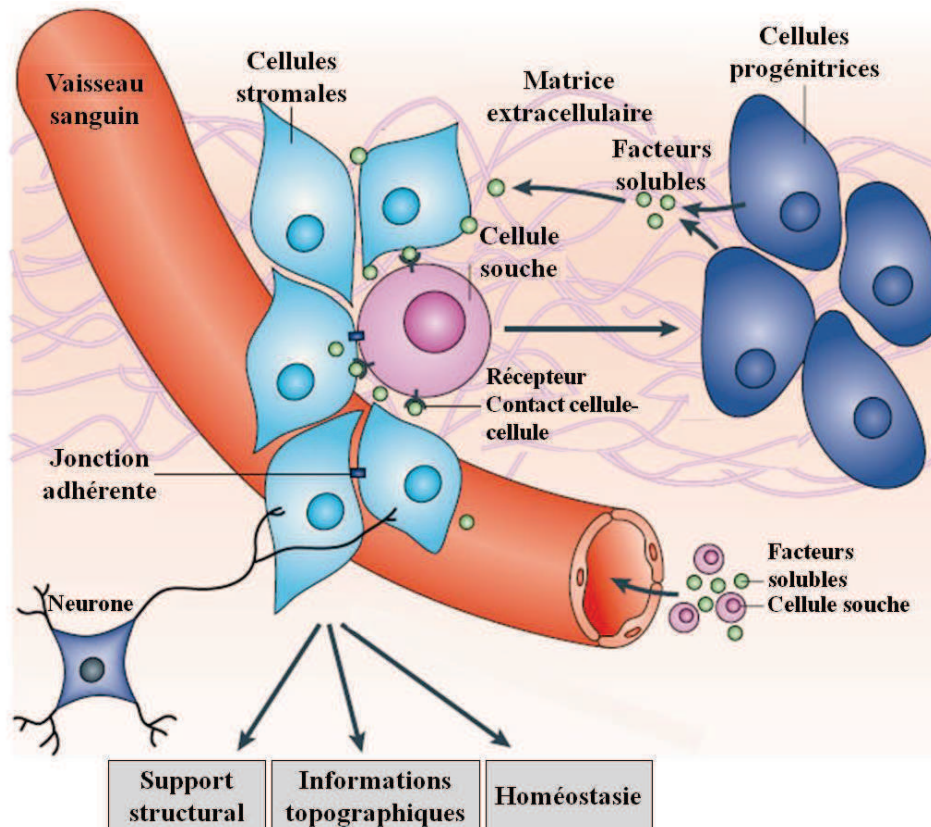


Figure 11. La niche des cellules souches : composition et fonctions

Les cellules souches sont localisées au sein d'un microenvironnement confiné appelé niche. La niche est composée des cellules stromales, des facteurs solubles, de la matrice extracellulaire, des cellules neuronales et d'un réseau de vaisseaux sanguins. Les niches peuvent incorporer la totalité ou certains de ces facteurs (Jones and Wagers, 2008).

a) Fonctions de la niche

La niche permet de réguler la plupart des processus biologiques des cellules souches par l'intermédiaire d'interactions cellule-cellule et cellule-matrice.

- **L'adhésion.** En tout premier lieu, la niche fournit aux cellules souches un site d'ancrage *via* l'établissement de contacts cellule-cellule avec les cellules de soutien ou *via* l'interaction avec la matrice extracellulaire. Les principaux récepteurs impliqués

dans l'ancrage des cellules souches à leur niche sont les cadhérines et les intégrines. Un exemple est illustré par l'intégrine $\beta 1$ et l'intégrine $\alpha 6$ (CD49f), exprimés par les cellules souches de plusieurs tissus comme celle du follicule pileux ou de la moelle osseuse (Brizzi et al., 2012; Raymond et al., 2009; Yu et al., 2012).

- **La division symétrique-asymétrique.** L'ancrage des cellules souches dans leur niche est également responsable de leur capacité à se diviser de façon symétrique ou asymétrique. Des facteurs fondamentaux associés à ce processus sont les protéines du complexe PAR (*Partitioning defective*) : Par-3, Par-6 et aPKC (*atypical protein kinase C*). Initialement identifié en *C. elegans*, ce complexe localisé au niveau des jonctions serrées intervient dans la répartition asymétrique de certains composants (comme Numb) au moment de la mitose (Goldstein and Macara, 2007; Goulas et al., 2012). En particulier, les jonctions adhérentes et le complexe PAR des cellules souches contribuent à l'orientation de leur fuseau mitotique et à l'établissement de la polarité des cellules (Fuchs et al., 2004). Si le fuseau mitotique est orienté parallèlement à la membrane basale, il y aura une répartition égalitaire des déterminants cellulaires au cours de la mitose et la division sera symétrique. Si le fuseau mitotique est orienté perpendiculairement à la lame basale, les facteurs qui déterminent le devenir cellulaire seront inégalement répartis et la division sera asymétrique (Figure 12) (Knoblich, 2008). La cellule ancrée à la membrane basale restera dans la niche et retournera en phase G0 tandis que l'autre cellule sera destinée à s'engager dans le processus de différenciation et à quitter la niche.

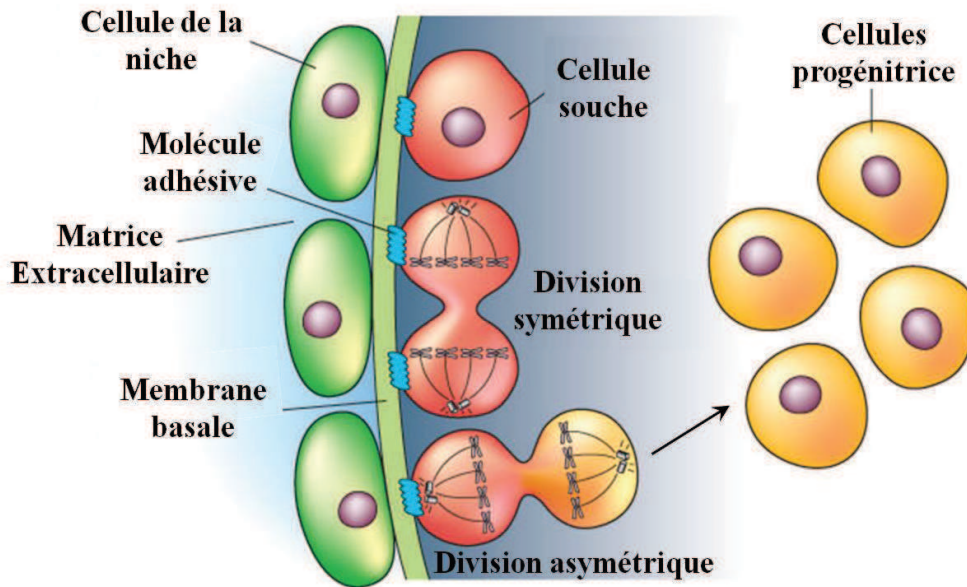


Figure 12. Influence de la niche sur la division des cellules souches

Les cellules composant la niche (en vert) envoient des signaux aux cellules souches (en rouge) qui bloquent leur différenciation et régulent leur division. Selon l'orientation du plan de clivage, les cellules souches peuvent se diviser symétriquement, pour donner deux cellules identiques, ou asymétriquement, pour donner une cellule souche et une cellule progénitrice (en jaune) qui entre en phase de différenciation (Spradling et al., 2001)

- **La quiescence.** L'établissement et le maintien de la quiescence nécessitent une multitude de facteurs fournis par le microenvironnement. Les mécanismes moléculaires régulant l'induction de la quiescence demeurent peu connus dans la plupart des modèles cellulaires. Le modèle le plus étudié et le plus connu est la niche des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Dans ce modèle, les ostéoblastes sécrètent de nombreuses cytokines, dont un exemple est l'Angiopoïétine-1 (Ang-1), qui interagit avec le récepteur Tie-2 exprimé par les HSC (Arai et al., 2004). Par l'intermédiaire de la voie Erk1/2, la voie de signalisation Ang-1/Tie-2 induit l'entrée en quiescence, grâce aussi à l'activation de certains facteurs de transcription comme Pbx-1 (*Pre-B-cell leukemia transcription factor-1*) (Ficara et al., 2008). Dans la niche du follicule pileux, c'est le facteur de transcription NFATc1 (*Nuclear Factor of Activated T cells c1*) activé par BMP-6 sécrété par la papille dermique qui augmente la quiescence des cellules souches du *bulge* (Horsley et al., 2008).
- **La mobilisation et la domiciliation des cellules souches.** En réponse à des stimuli spécifiques (e.g. dans le développement ou en cas de lésion tissulaire), les cellules souches peuvent être mobilisées de leur niche et être induites à s'installer au site d'intérêt (la niche d'origine ou une nouvelle niche), un processus appelé domiciliation

ou *homing*, en anglais. Ces processus sont orchestrés par de nombreuses molécules, telles que des chimiokines, des cytokines, des molécules d'adhésion et des facteurs de croissance. En particulier, la mobilisation des cellules souches est accompagnée par l'activation ou l'inhibition des molécules d'adhésion (comme les intégrines) et la sécrétion des protéases (MMP), permettant de dégrader la matrice extracellulaire et d'atteindre la circulation sanguine (Chen et al., 2011). Aussi dans ce cas, le modèle le plus étudié reste celui des HSC. La sécrétion de la chimiokine SDF-1 par plusieurs cellules de la moelle osseuse (dont les cellules endothéliales), par exemple, entraîne une réponse chimio-attractive dans les cellules souches exprimant CXCR4, récepteur au SDF-1. Ainsi, SDF-1 induit la sécrétion des MMP par les cellules souches et leur mobilisation dans la circulation sanguine (Chavakis et al., 2008; Spiegel et al., 2008).

b) Niche environnementale et métabolisme oxydatif

Une caractéristique de la niche, bien décrite pour la niche des cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques, est la présence d'une pression partielle en oxygène (pO_2) inférieure à la normale, soit moins de 5% pO_2 contre 12-15 % pO_2 dans le sang artériel. La découverte de cet état physiologique a été basée sur l'observation que les cellules souches hématopoïétiques quiescentes sont localisées dans des régions de la moelle osseuse éloignées des vaisseaux sanguins (Grant and Root, 1947).

Cette faible concentration en oxygène, appelée « **hypoxie** », a des conséquences sur le métabolisme des cellules souches. Ainsi, l'hypoxie dans la niche offre un avantage sélectif qui se caractérise notamment par la protection contre le stress oxydatif dû à la génération d'ions peroxydes (ROS, *Reactive Oxygen Species*) qui peuvent endommager l'ADN (Diehn et al., 2009). De plus, l'hypoxie favorise l'autorenouvellement des cellules souches et le maintien de la multipotence, alors qu'il a été démontré que des cellules souches embryonnaires humaines cultivées à une pO_2 supérieure à 20% se différencient spontanément (Ezashi et al., 2005; Singh et al., 2012; Zeng et al., 2011).

Les cellules souches équilibrent le potentiel redox en recrutant des systèmes de régulation enzymatiques antioxydants (e.g. la famille des superoxydes dismutase et le glutathion peroxidase) (Pervaiz et al., 2009), ainsi que des régulateurs redox clés, comme les membres de la famille FoxO (*Forkhead homeobox type O family*), Nrf2 (Nuclear factor erythroid-2-related factor 2), APE1/Ref-1 (*APurinic/aprimidinic Endonuclease1/Redox factor-1*), ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor-1*)

(Huang et al., 1996; de Keizer et al., 2011). Ces facteurs, agissent sur le maintien des cellules souches en régulant positivement la transcription de gènes impliqués dans la défense antioxydant.

1.6. Les facteurs clés de la pluripotence et de l'autorenouvellement

a) Les gènes polycomb

Les gènes de la famille Polycomb sont des inhibiteurs transcriptionnels qui jouent un rôle fondamental dans le maintien du profil d'expression des gènes impliqués dans le développement. Ces facteurs, initialement identifiés chez la *Drosophila melanogaster*, possèdent des orthologues chez les mammifères. Les protéines PcG (pour *Polycomb Group*) s'assemblent en larges complexes multimériques, dont les mieux caractérisés chez les mammifères sont PRC1 et PRC2 (*Polycomb Repressive Complexes-1, -2*) (Margueron and Reinberg, 2011). Ces complexes possèdent des activités catalytiques qui modifient post-transductionnellement les queues des histones et sont impliqués dans la répression transcriptionnelle de gènes cibles en altérant la structure chromatinienne locale. D'un point de vue moléculaire PRC2 est responsable de la di- et tri- méthylation au niveau de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me2/me3), qui constitue une marque de répression épigénétique, alors que PRC1 induit la monoubiquitination de l'histone H2A au niveau de la lysine 119 (Cao et al., 2002; Wang et al., 2004).

Les protéines du groupe Polycomb sont très exprimées au niveau de la masse cellulaire interne du blastocyste, dans les cellules souches embryonnaires et dans les cellules souches adultes, alors que leur niveau d'expression diminue lorsque la cellule se différencie.

Le maintien de la pluripotence par les PRC est déterminé par leur association (et par conséquent leur inhibition) au niveau du promoteur des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération ($p16^{INK4a}$ ou $p19^{ARF}$), dans l'organogenèse ou dans la différenciation cellulaire (Sauvageau and Sauvageau, 2010). Ainsi, les protéines PcG semblent contrôler de manière spatio-temporelle l'engagement des cellules souches vers la différenciation en agissant sur l'expression de plusieurs gènes clés dans la spécification cellulaire, comme le groupe de gènes *Hox*, ainsi que des membres des familles *Wnt*, *Pou*, *Sox*, *Tbx* et *Dlx* (Surface et al., 2010).

En outre, il a été plus récemment montré l'existence de modifications non conventionnelles des histones dans les cellules souches (Figure 13). Ces modifications, appelées « bivalentes », sont caractérisées par l'association concomitante de marques activatrices

(H3K4me3) et répressives (H3K27me3) dans plusieurs gènes spécifiques de lignage. Ce procédé permet un état de pré-activation de ces gènes qui peuvent être ainsi rapidement induits dans un programme de différenciation (en anglais *poised promoters*) (Bernstein et al., 2006; Sha and Boyer, 2008). En effet, l'ARN polymérase II est recruté sur ces gènes, sans que leur transcription soit activée (Fisher and Fisher, 2011). Dans le cancer du sein, par exemple, des modifications bivalentes sont présentes sur le promoteur du gène ZEB-1 (*Zinc finger E-box Binding homeobox-1*), un facteur de transcription capable de convertir les cellules souches en cellules souches cancéreuses (Chaffer et al., 2013).

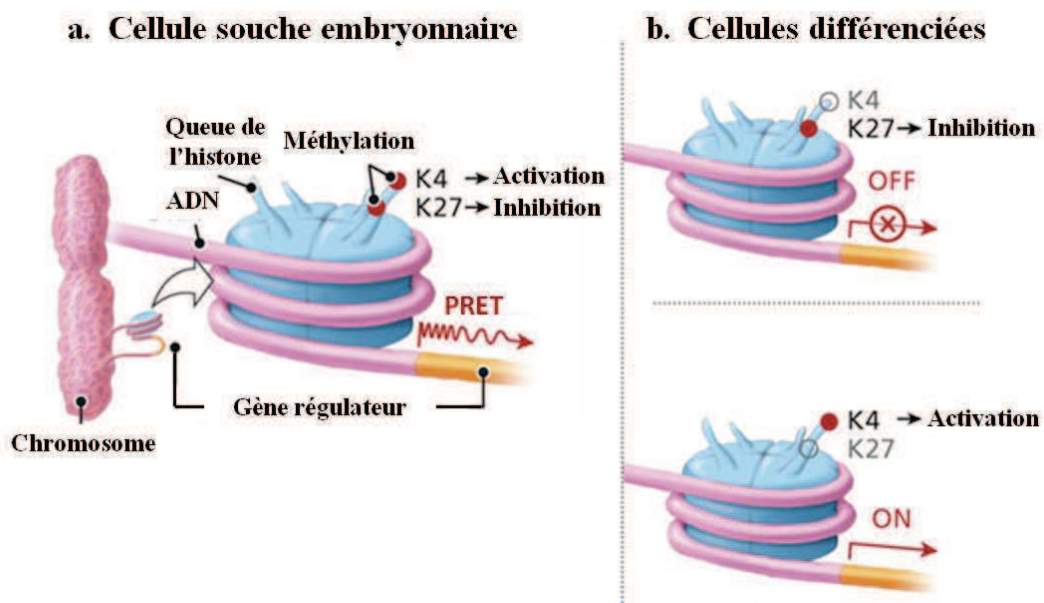


Figure 13. Modifications bivalentes de la chromatine

(a) La chromatine des cellules souches embryonnaires présente des domaines bivalents caractérisés par la présence simultanée de marques activatrices (H3K9ac et H3H4me) et répressives (H3K27me) dans plusieurs gènes spécifiques de lignage. Cet état peut maintenir le gène inactif mais prêt à être activé rapidement en cas de nécessité. (b) Quand la cellule se différencie seulement une marque est présente, en dépendance de l'expression du gène (Adapté de <http://archives.focus.hms.harvard.edu>).

b) Facteurs de transcription

Le maintien de la pluripotence des cellules souches est principalement garanti par un réseau de régulation transcriptionnelle. L'identification des gènes impliqués dans ce processus a largement bénéficié de la mise au point de technologies innovantes dans l'étude de l'expression des gènes. Ainsi, l'analyse de la machinerie transcriptionnelle des ESC réalisée en 2008 par des techniques de ChIP biotinylation (bioChIP) *in vivo* a révélé

que la plupart des gènes responsables du maintien de la pluripotence ou de l'autorenouvellement doivent être activés par au moins cinq facteurs de transcription différents (Kim et al., 2008). Trois d'entre eux, Oct-4 (*OCtamer-binding Transcription factor-4*), Sox-2 (*Sex determinig Region Y-box-2*) et Nanog, sont considérés comme critiques pour garantir le maintien de la pluripotence dans les cellules souches embryonnaires et leur rôle a été montré dans le développement (Chambers et al., 2003; Hay et al., 2004), auxquels s'ajoutent c-Myc, Klf4 (*Krüppel-like factor 4*).

- **Oct-4** : codé par le gène *POU5f1* (*POU domain, class 5, transcription factor 1*), Oct-4 est l'un des facteurs de transcription les plus précocement exprimés au cours du développement embryonnaire. Il est avant tout connu pour son rôle dans le maintien de la pluripotence dans les ESC des mammifères. Oct-4, qui appartient à la classe V de la famille de facteurs de transcription POU (PIT, OCT, UNC), possède plus de 1000 promoteurs cibles (Mathur et al., 2008). Il peut agir comme répresseur de transcription en recrutant des protéines Polycomb (comme SUZ12) pour inhiber la transcription de gènes spécifiques de lignages cellulaires (Squazzo et al., 2006). De plus, il peut réguler l'expression même de PRC1 et PRC2, jouant un rôle majeur dans la régulation épigénétique de la transcription.
- **Sox-2** : appartient à la famille des gènes *Sox* codant pour des facteurs de transcription capables de lier l'ADN de façon spécifique *via* leur domaine HMG (*High Mobility Group*) (Schepers et al., 2002). Le lien des protéines Sox à l'ADN peut déterminer une réorganisation locale de la chromatine permettant l'assemblage de complexes protéiques de transcription. Ces protéines peuvent aussi agir individuellement comme facteurs de transcription en se liant au niveau du promoteur des gènes et en régulant, de façon positive ou négative, leur transcription.

L'expression de Sox-2 (et des protéines Sox en général) aux stades précoces du développement (dans la masse interne du blastocyste) suggère leur implication dans la spécification précoce du devenir cellulaire. Au niveau moléculaire, Sox-2 promeut une spécification de type neuro-ectodermale dans certains tissus, en inhibant de façon directe l'expression des gènes déterminant le mésoderme, comme par exemple *brachyury* (Thomson et al., 2011; Wang et al., 2012). De façon générale, Sox-2 régule la détermination cellulaire en inhibant l'expression de

Introduction

facteurs de transcription spécifiques aux différents lignages (Sarkar and Hochedlinger, 2013).

- **Nanog** : facteur de transcription à homéodomaine, Nanog joue un rôle essentiel dans l'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires. En effet, la présence de Nanog suffit à garantir l'autorenouvellement des ESC de souris en absence de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), une cytokine essentielle pour leur maintien à l'état indifférencié (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003)
- **c-Myc** : facteur de transcription à facettes multiples, c-Myc est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires (régulation du cycle cellulaire et du métabolisme, maintien de la chromatine, synthèse des ARN et des protéines, différenciation, etc...) en interagissant avec les régions régulatrices de milliers de gènes cibles (Smith and Dalton, 2010). c-Myc contrôle essentiellement le processus d'autorenouvellement des cellules souches, ce qui le classe indépendamment de Oct4/Sox2/Nanog et le positionne plutôt dans un réseau de régulation avec Trim28 (*Tripartite motif-containing 28*) et Cnot3 (Hu et al., 2009; Sridharan et al., 2009).
- **KLF4** : Appartenant à la famille des facteurs de transcription Sp1-like, KLF4 agit à la fois comme activateur et répresseur transcriptionnel en se fixant au motif CACCC de nombreux gènes cibles. Il joue un rôle dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Le rôle de KLF4 dans le maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement semble être étroitement connecté à celui de c-Myc. Ainsi, KLF4 semble inhiber les signaux apoptotiques transmis par c-Myc, alors que c-Myc agirait sur les effets cyostatiques de KLF4, en inhibant p21^{WAF1/CIP1} (Yamanaka, 2007).

L'importance de ces facteurs a été démontrée par le fait que la seule transfection d'un cocktail de facteurs Oct-4, Sox-2, KLF4 et c-Myc dans des fibroblastes de souris suffit à induire le processus de reprogrammation des cellules somatiques aboutissant à une dédifférenciation des cellules vers un état de pluripotence (Takahashi and Yamanaka, 2006). Dans ce processus, Oct-4 et Sox-2 entraîneraient le recrutement des protéines polycomb, éteignant l'expression des gènes codant pour les facteurs de spécification cellulaire. La présence de c-Myc dans la formation des iPS a été remise en cause puisqu'il accroît les risques de formation de tératomes (tumeur formée par des cellules germinales pluripotentes). Il est également possible de générer des cellules iPS en utilisant la combinaison de gènes Nanog, Oct4, Sox2 et Lin28 (Yu et al., 2007).

Introduction

L'équilibre du réseau transcriptionnel des cellules souches est maintenu par une régulation étroite de chacun de ces facteurs. Par des mécanismes de co-régulation et d'autorégulation, ces facteurs de transcription forment une boucle de maintien de la pluripotence. En particulier, Oct-4 et Sox-2 forment un hétérodimère qui permet de réguler d'autres gènes de la pluripotence (comme Nanog) ainsi que leurs propres gènes en ciblant les motifs *oct-sox* de leurs promoteurs (Boyer et al., 2005; Masui et al., 2007). Ces facteurs activent, en collaboration avec l'ARN polymérase II, des gènes indispensables au maintien des cellules souches dans un état indifférencié alors que, en association avec les protéines du groupe Polycomb, ils répriment l'expression de gènes identifiés comme importants pour l'induction de la différenciation (Figure 14).

Il semble qu'un niveau précis d'expression de ces facteurs de transcription soit critique pour le maintien de l'autorenouvellement et de la pluripotence des cellules souches, ou au contraire pour induire des signaux de différenciation vers un lignage spécifique. Par exemple, lorsque l'expression de Oct-4 est réduite, les ESC se différencient en cellules du trophoblaste, alors que si son niveau d'expression dépasse de plus de 50% le niveau normal, les ESC s'engagent vers la différenciation en cellules primitives de l'endoderme et du mésoderme (Niwa et al., 2000; Stefanovic and Pucéat, 2007). De même, le maintien de l'expression de Sox-2 est nécessaire à l'induction et au maintien de l'identité neurale (Graham et al., 2003).

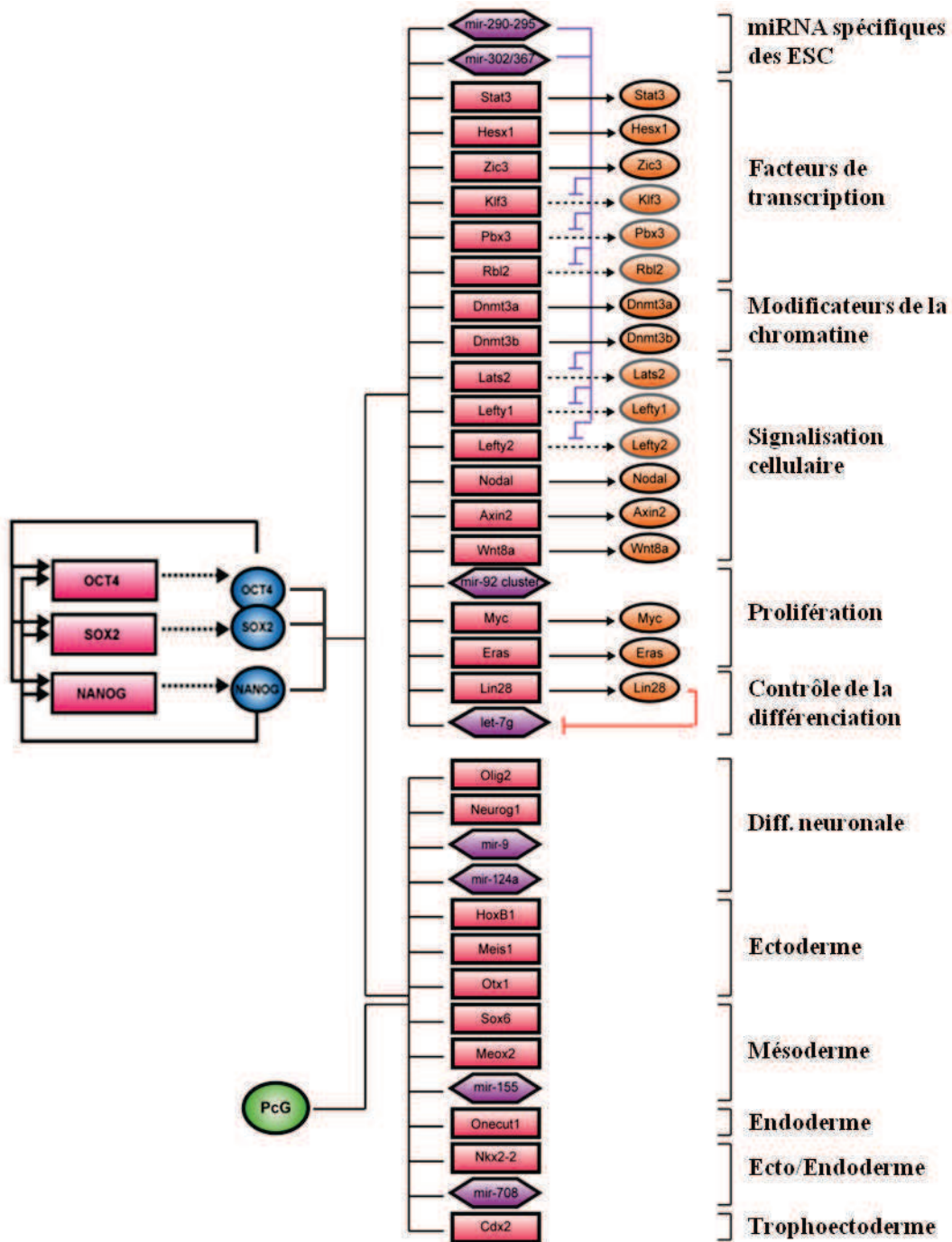


Figure 14. Noyau de régulation transcriptionnelle des cellules souches embryonnaires

Les facteurs de transcription clés de la pluripotence Sox-2, Oct-4 et Nanog (cercles bleu) constituent une boucle d'action autorégulatrice. Ces protéines se fixent sur le promoteur de nombreux gènes (en rose) et miRNA (en violet) intervenant dans la spécification des cellules via l'activation de la transcription (en orange) ou la répression transmise par le recrutement des complexes Polycomb (en vert, PcG) (Adapté de Boyer et al., 2005; Marson et al., 2008).

1.7. Les voies de signalisation

De nombreuses voies de signalisation régulent la biologie des cellules souches. Ces voies sont activées par des facteurs présents dans la niche et par des facteurs intrinsèques, comme les facteurs de transcription liés à la pluripotence qui ont été décrits dans le paragraphe précédent. Pour cette raison, leur activation est très dépendante du contexte cellulaire et varie selon différentes catégories de cellules souches. Néanmoins, des voies sont assez conservées dans les différents sous-types de cellules souches et interviennent dans le développement et l'homéostasie de nombreux tissus : la voie Wnt, la voie Notch et la voie Hedgehog.

a) La voie Wnt

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est une voie importante pour le développement embryonnaire et est impliquée dans l'homéostasie, la différenciation ou la prolifération des cellules souches. Les protéines Wnt sont des glycoprotéines solubles dont le lien aux récepteurs de la famille Frizzled entraîne une cascade de signalisation aboutissant à l'accumulation de la β -caténine et à sa translocation dans le noyau. De cette façon, la β -caténine peut former un complexe avec les facteurs de transcription TCF/LEF et moduler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la pluri/multipotence (Saito-Diaz et al., 2013) (Figure 15). L'activation de la voie Wnt semble inhiber la différenciation des ESC humaines. Pour autant, la seule inhibition des ligands Wnt ne suffit pas à induire la différenciation dans les mêmes cellules (Dravid et al., 2005). De plus, des composants de la voie Wnt sont capables d'interagir avec d'autres voies de signalisation et le résultat en termes d'effets biologiques peut donc être très différent selon les contextes cellulaires (Kléber and Sommer, 2004).

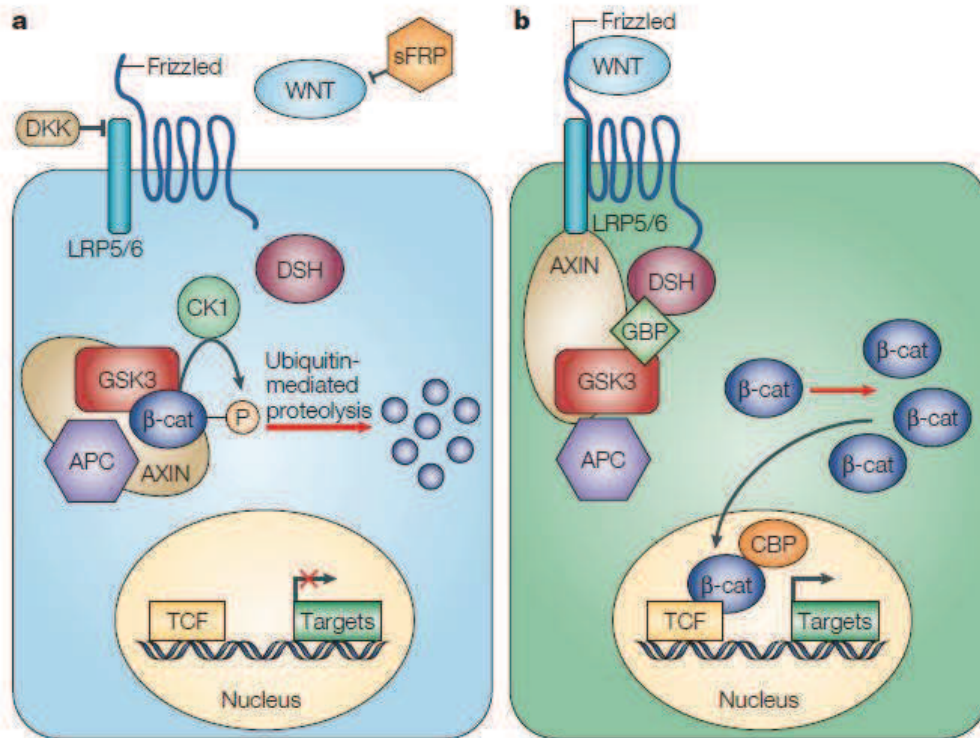


Figure 15. Voie de signalisation Wnt/β-caténine

En absence du ligand Wnt (a) la β-caténine, en complexe avec l'axine, APC et GSK3β, est dégradée et ses gènes cibles sont inhibés ; lorsque Wnt se lie au récepteur membranaire Frizzled, la β-caténine est libérée du complexe de dégradation et s'accumule dans le cytosol. Sa translocation dans le noyau et son lien aux facteurs de transcription Tcf/Lef induisent la transcription de ses gènes cibles (Moon et al., 2004).

b) La voie Notch

La voie de signalisation Notch, très conservée entre invertébrés et vertébrés, est une voie agissant de manière paracrine entre deux cellules. La voie de signalisation est activée par liaison du récepteur Notch avec un ligand transmembranaire (comme Delta ou Serrate) appartenant à la cellule voisine. Le récepteur Notch est activé par clivage protéolytique et son domaine intracellulaire est ensuite relocalisé dans le noyau où il va jouer le rôle de facteur de transcription en s'associant avec d'autres protéines (Kopan and Ilagan, 2009) (Figure 16). Comme pour la voie Wnt, l'interaction avec des composantes d'autres voies de signalisation rend l'effet de la voie Notch « contexte cellulaire-dépendant ». Pour cette raison, les conséquences biologiques peuvent varier du maintien/expansion de la population de cellules souches à l'induction de leur différenciation. Cette voie de signalisation peut jouer un rôle sur le devenir cellulaire en intervenant au cours de la division asymétrique : la distribution asymétrique par la cellule souche mère de Numb, un

inhibiteur de Notch, va conduire à la formation de deux cellules filles différentes. La cellule où la voie Notch est inhibée s'engagera dans la voie de la différenciation, alors que l'autre garantira l'autorenouvellement du pool des cellules souches ou se différenciera dans une cellule au destin différent (Neumüller and Knoblich, 2009).

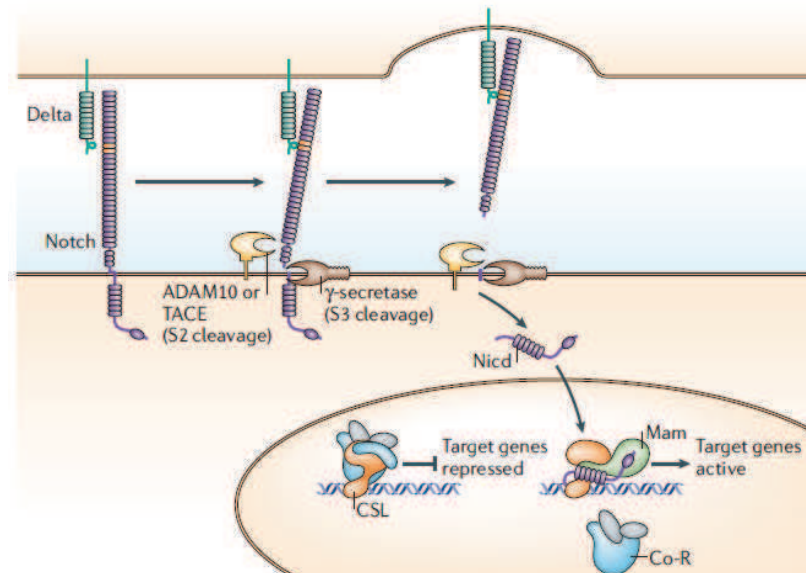


Figure 16. Voie de signalisation Notch

Lorsqu'un ligand de la famille Delta ou Jagged se lie au récepteur Notch, deux clivages protéolytiques libèrent le domaine intracellulaire du récepteur (NICD). Une fois transloqué dans le noyau, le NICD va former un complexe avec le facteur de transcription CSL et les co-facteurs de la famille Mastermind-like (MAML) pour induire la transcription de ses gènes cibles (Bray, 2006).

c) La voie Hedgehog

Très activée lors de l'embryogenèse, la voie Hedgehog participe à la prolifération et la différenciation des cellules, ainsi qu'à la mise en place de nombreux tissus. Chez l'adulte, elle joue notamment un rôle dans le maintien des cellules souches neuronales (Hooper and Scott, 2005). Les protéines Hedgehog (HH), Sonic, Indian et Desert Hedgehog, sont des protéines sécrétées qui se lient aux récepteurs membranaires Patched et Smoothened, entraînant l'activation d'une cascade de signalisation qui aboutit alors à la translocation de la forme entière et active du facteur de transcription Gli dans le noyau (Figure 17).

Les facteurs HH, décrits comme morphogènes, peuvent induire de manière dose-dépendante le devenir des cellules dans un tissu. Par exemple, lors de la mise en place du système nerveux central chez les vertébrés, le gradient de concentration de Sonic HH de la notochorde vers la plaque neurale, induit la différenciation de plusieurs types neuronaux le long de la ligne médiane ventrale (Jacob and Briscoe, 2003).

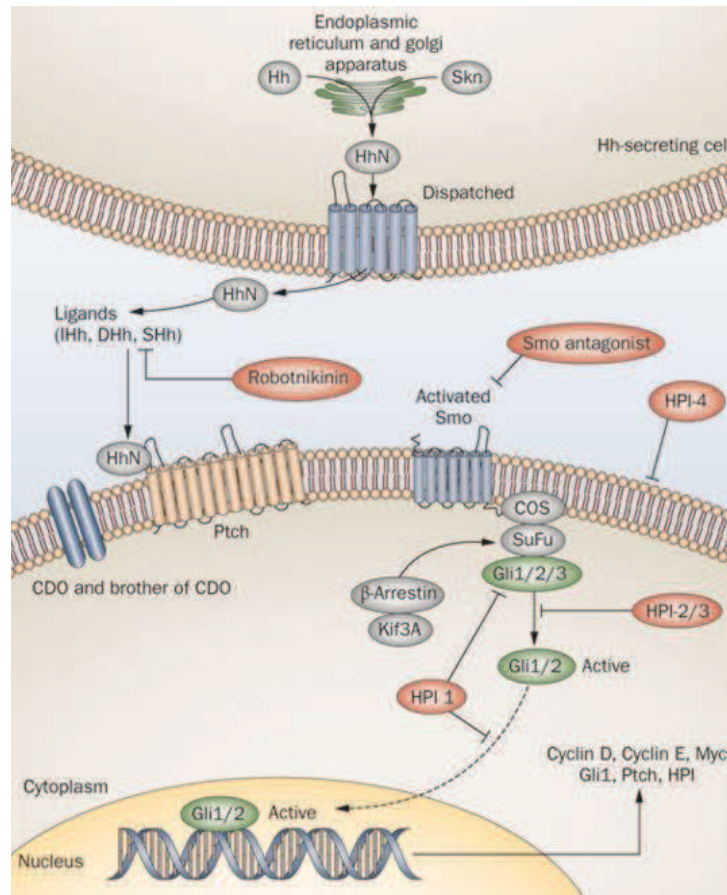


Figure 17. Voie de signalisation Hedgehog

Lorsque la voie est inactive, le récepteur Patched (Ptch) inhibe la protéine membranaire Smoothened (Smo). Les facteurs de transcription activateurs Gli sont localisés dans le cytoplasme où ils sont clivés pour donner une forme capable de réprimer l'expression des gènes cibles. Lorsque les ligands de la famille Hedgehog (HH) se fixent à Ptch, l'inhibition de Smo est levée, induisant la translocation dans le noyau de la forme entière et active du facteur de transcription Gli (Takebe et al., 2011).

1.8. Isolement des cellules souches

a) Culture en suspension (formation de sphères)

Le système de culture mis au point par Reynolds et Weiss pour les cellules souches neuronales, a été par la suite élargi aux cellules souches mammaires, puis à d'autres cellules souches adultes de plusieurs tissus (Dontu et al., 2003a; Reynolds and Weiss, 1996). Dans un milieu défini (supplémenté avec de l'EGF et/ou du bFGF et dépourvu de sérum) et en absence d'ancrage, il est possible de sélectionner et d'induire la prolifération des cellules souches adultes. L'avantage majeur de cette méthode est qu'elle constitue un système de sélection au cours duquel les cellules différenciées meurent, alors que seules les

cellules souches (ou les progéniteurs précoces) sont capables de proliférer en amas cellulaires sphériques (appelés neurosphères pour les cellules souches neurales).

b) Identification des cellules au cycle cellulaire lent (Label retaining cells)

Comme cela a été décrit dans les paragraphes précédents, une des particularités des cellules souches est de se trouver la plupart du temps dans un état de quiescence. Ainsi, plusieurs techniques ont été développées pour isoler ces cellules à prolifération lente. Les techniques d'incorporation de marqueur de l'ADN (thymidine tritiée ou bromodeoxyuridine, BrdU) sont majoritairement utilisées. Les cellules en phase S du cycle cellulaire au moment de l'injection incorporent le BrdU à leur ADN. Dans les cellules ayant une forte activité proliférative, le marquage est dilué au fur et à mesure des divisions cellulaires, alors que les cellules quiescentes retiennent le marquage et peuvent être ainsi repérées. Le même principe est utilisé avec des composés fluorescents comme le DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, un composé lipophile) ou le PHK-26.

c) Exclusion de colorants vitaux (Side population)

La surexpression par les cellules souches de transporteurs membranaires de la famille ABC (*ATP Binding Cassettes*) a permis de développer des techniques associées à l'identification de cellules capables d'exclure activement des colorants vitaux. Ainsi, certains colorants vitaux fluorescents comme l'Hoechst 33342 ou la Rhodamine 123 sont exclus par les cellules souches, permettant d'identifier ces cellules en cytométrie de flux en une sous-population appelée *Side Population* (Challen and Little, 2006; Goodell, 2005; Hadnagy et al., 2006).

Les transporteurs ABC constituent une famille de protéines membranaires qui assurent une fonction de transport à travers la membrane cellulaire. Chez l'homme, il existe 48 membres de cette famille, dont une partie est impliquée dans l'efflux de xénobiotiques et la résistance aux drogues (Schinkel and Jonker, 2003; Sharom, 2008).

d) Activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogénase (test ALDEFLUOR)

Une autre caractéristique des cellules souches, largement exploitée pour leur analyse, est la présence dans ces cellules d'une forte activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Cet enzyme intervient dans le métabolisme oxydatif de l'acide rétinoïque en participant à la transformation d'aldéhydes en acide carboxylique. Son activité est

mesurable par fluorescence en cytométrie en flux grâce à un kit commercial approprié, l'Aldefluor (StemCell technologies).

e) Marqueurs de surface

Les populations enrichies en cellules souches adultes dans différents tissus peuvent être identifiées par l'intermédiaire de marqueurs membranaires, le plus souvent utilisés en combinaison avec d'autres techniques d'isolation. Ces marqueurs sont en général tissu-séparés et très dépendants de l'état physiologique de la cellule, ce qui rend assez difficiles leur identification et leur classification.

2. Les cellules souches cancéreuses

2.1. Origine cellulaire du cancer : le modèle hiérarchique

Depuis quelques années, un nombre croissant de données expérimentales a démontré l'existence d'une hiérarchie cellulaire au sein des populations tumorales: des cellules dites initiatrices de tumeur ou cellules souches cancéreuses (CSC) seraient non seulement à l'origine du développement tumoral de par leur capacité de renouvellement illimitée, mais également des résistances aux agents thérapeutiques, *de facto* responsables des récurrences. Depuis leur découverte par l'équipe de John Dick en 1997 dans les cancers hématopoïétiques (Bonnet and Dick, 1997), des cellules souches cancéreuses putatives ont été isolées à partir de plusieurs cancers solides, tels que les cancers du sein (Dontu et al., 2003b), du colon (O'Brien et al., 2007), du pancréas (Li et al., 2007a), de la prostate (Ceder et al., 2008) et du poumon (Eramo et al., 2008).

La présence des cellules souches cancéreuses au sein de la tumeur a été suggérée par des essais clonogéniques mettant en évidence des sous-populations de cellules tumorales ayant une capacité de prolifération importante et capable de former des clones *in vitro* et *in vivo*. La mise en évidence de leur existence repose sur la capacité des CSC à reproduire l'hétérogénéité et les caractéristiques phénotypiques de la tumeur initiale après transplantation dans un modèle animal.

L'apparition de la théorie des cellules souches cancéreuses a modifié l'approche conceptuelle du développement tumoral soutenue pendant plusieurs dizaines d'années, constituant le concept d'origine clonale des tumeurs (aussi appelé modèle stochastique) (Kleinsmith and Pierce, 1964). Le **modèle stochastique** repose sur la possibilité que

Introduction

chaque cellule d'un tissu, même différenciée, peut proliférer de manière incontrôlée suite à l'accumulation de mutations acquises de façon aléatoire, menant ainsi à la formation d'un clone tumoral indépendant (Reya et al., 2001). Cependant, certaines observations sont difficilement conciliables avec ce modèle. En particulier, les cellules différenciées ont un potentiel prolifératif inférieur à celui des cellules souches et sont souvent renouvelées, ce qui rend très faible la probabilité d'accumuler des mutations. De plus, la forte hétérogénéité (au niveau des degrés de différenciation et de transformation) que l'on retrouve dans les tumeurs est difficilement obtenue à partir de cellules bien différenciées (Shipitsin and Polyak, 2008).

Ces différentes questions trouvent la réponse dans le **modèle hiérarchique**, considérant les cellules souches cancéreuses comme le moteur du développement tumoral. Les cellules auraient un potentiel de prolifération limité en dehors d'un petit nombre de cellules cancéreuses, les CSC, qui, quant à elles, auraient la capacité de proliférer de façon infinie et de donner naissance à toutes les autres cellules de la masse tumorale (Figure 18).

Cependant, les deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs et, au contraire, ils sont supposés coexister lors du développement tumoral. En effet, les CSC mêmes présentent une évolution clonale et des CSC plus agressives peuvent être sélectionnées lorsqu'une ou plusieurs mutations supplémentaires allaient agir sur l'autorenouvellement ou sur leurs propriétés prolifératives.

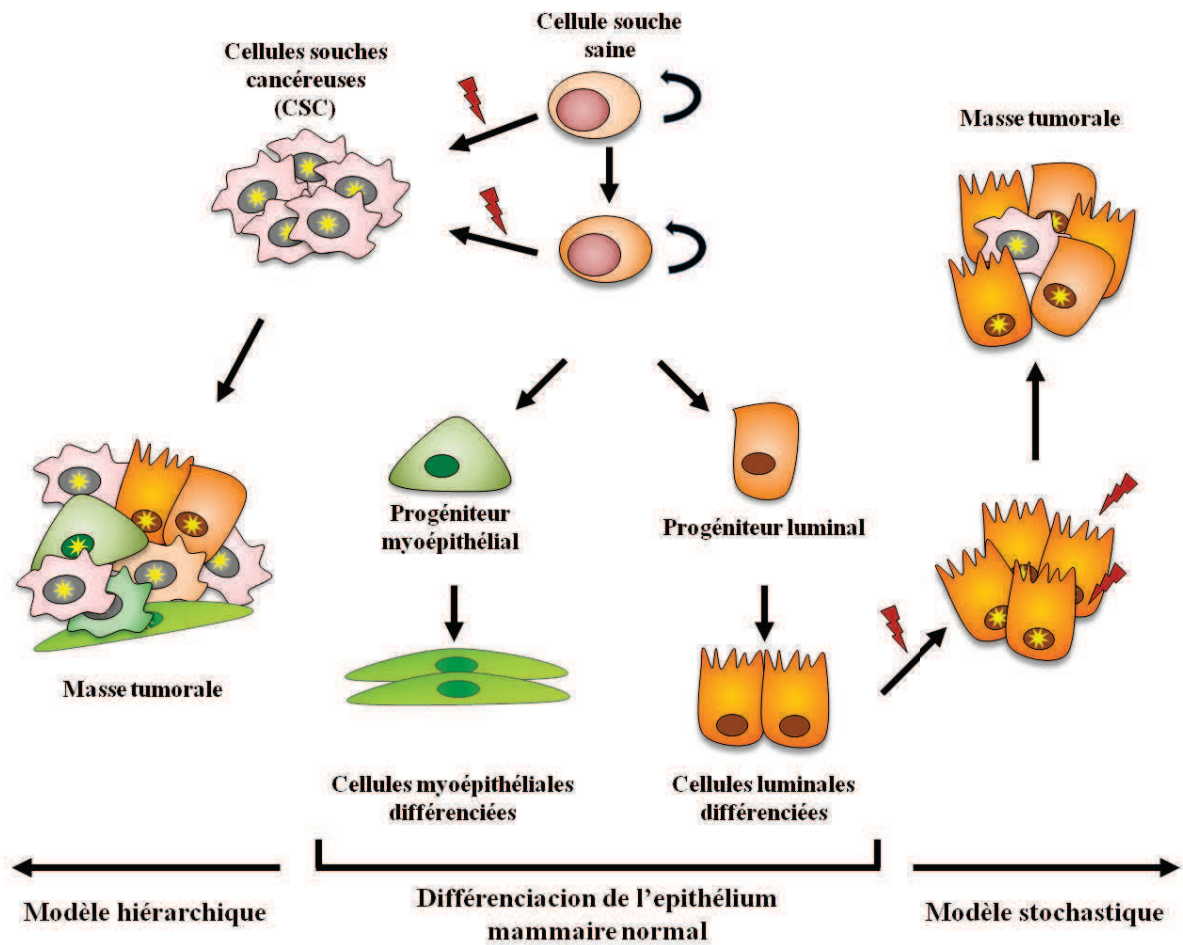


Figure 18. Représentation schématique des deux théories de formation tumorale

A droite, la théorie stochastique, où chaque cellule présente dans la tumeur est capable de proliférer et contribuer à la croissance tumorale. A gauche, la théorie hiérarchique : il existe une hiérarchie entre les cellules (Adapté de Shipitsin and Polyak, 2008).

2.2. Propriétés des cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses sont définies par leur capacité à reformer une tumeur reproduisant l'hétérogénéité phénotypique de la tumeur initiale après inoculation dans des souris hôtes (Lobo et al., 2007). Les CSC présentent plusieurs caractéristiques communes avec les cellules souches normales, comme l'autorenouvellement (par division symétrique ou asymétrique), une longue durée de vie, la capacité à reproduire l'hétérogénéité tissulaire, 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.

Les cellules souches normales et tumorales partagent plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération, l'autorenouvellement et le maintien de l'état indifférencié.

Dans les CSC, ces voies de signalisation sont souvent altérées, en général par les mêmes mécanismes que nous avons décrits dans le paragraphe sur le développement du cancer (paragraphe §A.2.3-b,c). Parmi les principales voies de signalisation concernées, on retrouve la voie Wnt/ β -caténine, la voie Sonic Hedghog et la voie Notch.

2.3. Origine des CSC et interaction avec la niche

L'origine des cellules souches cancéreuses dans les cancers solides n'a pas encore été éclaircie et elle pourrait varier en fonction des tumeurs. Les cellules souches cancéreuses pourraient provenir directement des cellules souches normales adultes de l'épithélium qui seraient seules le siège d'altérations génétiques tumorales. Autrement, les progéniteurs précoces, descendants immédiats des cellules souches normales, pourraient aussi être les cibles des altérations oncogénétiques et se comporter comme des CSC en ré-exprimant un programme d'autorenouvellement. Les CSC pourraient ainsi s'autorenouveler et générer en parallèle des dérivés engagés dans les voies de différenciation, qui déterminent l'hétérogénéité cellulaire propre à la masse tumorale (Figure 18) (Cozzio et al., 2003; Lobo et al., 2007).

Des modifications génétiques ou épigénétiques des cellules de la niche des cellules souches peuvent aussi jouer un rôle déterminant dans la transition entre cellules souches normales et CSC (Figure 19). En effet, les cellules souches normales sont maintenues en nombre limité par leur environnement pour empêcher une prolifération anarchique et garantir l'homéostasie tissulaire. Le haut potentiel prolifératif des CSC implique pourtant une dérégulation de l'interaction niche-cellule souche. Cette dérégulation pourrait venir d'une expansion de la niche normale qui déterminerait une augmentation de l'autorenouvellement des cellules souches et la formation de la masse tumorale. Le développement tumoral pourrait aussi être une conséquence de l'adaptation des CSC à une niche différente, ou encore à la sélection des CSC indépendantes vis-à-vis de la niche (Clarke and Fuller, 2006; Reya et al., 2001).

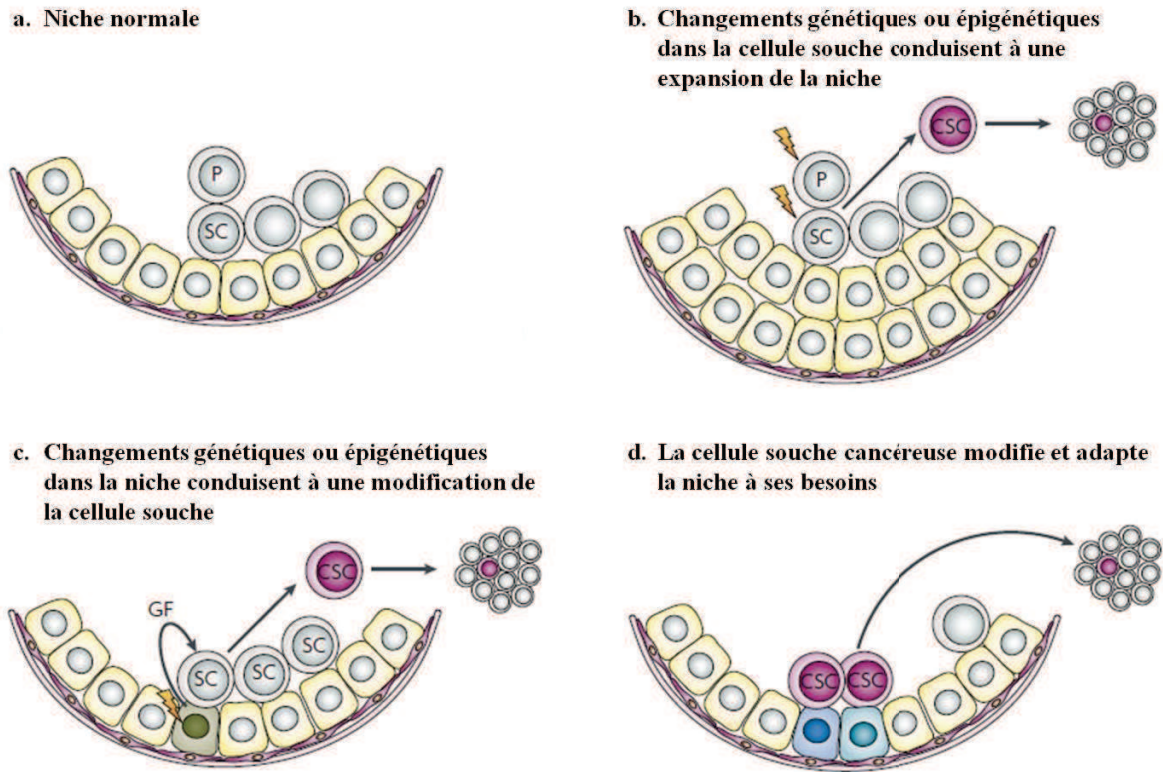


Figure 19. Interaction entre les cellules souches cancéreuses et leur niche

(a) Niche normale comprenant les cellules souche (SC), les cellules progénitrices (P) et les cellules du support ; (b) une série de modifications génétiques et épigénétiques dans les cellules souches ou dans les cellules progénitrices détermine la formation des CSC, qui agissent sur la niche ; (c) des modifications génétiques ou épigénétiques des cellules de la niche déterminent la formation des CSC ; (d) Les CSC modifient et adaptent la niche à leurs nécessités. Les cellules de la niche développent de nouvelles propriétés (en bleu) et/ou recrutent des cellules normalement non présentes (Adapté de Visvader and Lindeman, 2008).

L'importance de l'interaction niche-CSC est mise en évidence par le phénomène de **dormance tumorale**. La dormance tumorale est caractérisée par la présence chez un individu de cellules tumorales, qui peuvent rester quiescentes pendant des périodes prolongées sans qu'elles forment des tumeurs. Ces cellules dormantes pourraient être des cellules souches devenues cancéreuses suite à l'accumulation d'altérations génétiques, et maintenues en quiescence par l'influence anti tumorale de la niche ou d'un environnement sain inadapté à leur croissance. En effet, des autopsies effectuées sur des personnes de différents âges ont mis en évidence la présence de lésions tumorales silencieuses dans différents organes (Bissell and Hines, 2011; Imaida et al., 1997). Par exemple, d'après une étude réalisée sur des glandes mammaires prélevées post-mortem, près de 40% des femmes

présentaient des hyperplasies et néoplasies dès l'âge de 40 ans sans pour autant qu'elles aient développé un cancer du sein (Nielsen et al., 1987).

Les cellules dormantes peuvent aussi être des cellules tumorales résiduelles, disséminées précocement et persistant sous une forme quiescent dans un nouveau microenvironnement. Ces cellules, résidentes dans l'organisme après la rémission complète du patient, se localisent souvent dans des sites éloignés de la tumeur primaire et semblent être la cause primaire de rechutes tardives (Aguirre-Ghiso, 2007; Wells et al., 2013).

2.4. Les cellules souches cancéreuses et le phénotype TEM

Comme décrit dans le paragraphe A-2.3.b, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un mécanisme fondamental au cours du développement embryonnaire, impliqué, entre autres, dans la gastrulation et dans la migration des cellules de la crête neurale (Thiery and Sleeman, 2006). Cependant, les mêmes voies moléculaires qui contrôlent la TEM peuvent être réactivées chez l'adulte lors du développement tumoral. Ainsi, les marqueurs de TEM, généralement absents dans les cellules normales différenciées, sont souvent exprimés dans les cellules cancéreuses aux propriétés métastatiques (Peinado et al., 2007; Yang et al., 2004). Les propriétés mésenchymateuses des cellules cancéreuses leur confèrent des propriétés de cellules souches, comme la protection contre l'apoptose, l'échappement à la réponse immunitaire et la résistance aux chimiothérapies conventionnelles (Gupta et al., 2009; Puisieux et al., 2006). L'expression des inducteurs de TEM tels que Snail et β -caténine dans des cellules en bordure de la tumeur, ainsi que la détection de micro-métastases osseuses médullaires dans des tumeurs de stade 1 et grade 1 suggèrent que des cellules invasives présentant des propriétés de cellules souches cancéreuses migrantes soient présentes dès le début de la formation tumorale (Bidard et al., 2008). Ces données montrent également que le processus métastatique n'est probablement pas un phénomène tardif, comme le suggère le schéma classique de progression tumorale.

De façon intéressante, des travaux récents ont démontré que l'induction de la TEM suite à l'expression ectopique des facteurs de transcription Snail ou Twist, ou d'une version mutée de Ras, s'accompagne de l'acquisition de propriétés généralement associées aux cellules souches (Battula et al., 2010; Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). De plus, il a été décrit que les cellules de cancer du sein $CD44^+/CD24^-$ sur-expriment des facteurs de transcription impliqués dans la TEM (Mani et al., 2008). Les facteurs induisant la TEM peuvent maintenir et/ou promouvoir la pluri/multipotence de plusieurs façons. Par exemple, Twist1

semble agir en aval de BMI-1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*) et coopérer avec des membres de la famille Polycomb pour réprimer l'expression des certains gènes impliqués dans la différenciation (Yang et al., 2010). Le facteur de transcription ZEB1 peut moduler de façon indirecte l'expression de Klf-4 et Sox-2, en inhibant l'expression des micro-ARN de la famille miR-200 (Wellner et al., 2009). Il a été décrit que les facteurs de transcription Slug (impliqué dans la TEM) et Sox-9 (marqueurs des CSC) interagissent pour déterminer le destin cellulaire des cellules souches de la glande mammaire (Guo et al., 2012).

3. Les cellules souches mammaires

3.1. Les cellules souches mammaires normales

La glande mammaire est un organe particulièrement dynamique et sujet à des changements morphologiques drastiques pendant la puberté, la grossesse, la lactation et l'involution. L'enchaînement d'événements cellulaires que l'on observe nécessite un autorenouvellement cellulaire continu garanti par la présence des cellules souches mammaires. Ces processus impliquent aussi la participation d'une population cellulaire hétérogène incluant des progéniteurs précoces (luminales et myoépithéliales) ainsi que toutes les cellules constituant l'épithélium mammaire différencié (Visvader, 2009).

A la fin des années 50, DeOme et son équipe ont pu démontrer l'existence de cellules souches adultes mammaires grâce à des expériences de transplantation de clones cellulaires capables de générer un réseau ductal et alvéolaire complet chez la souris (DeOme et al., 1959). Des expériences successives, basées sur la transplantation d'un petit nombre de cellules dans le tissu adipeux de la glande mammaire de souris (*mammary fat pad*) ont démontré qu'une glande mammaire fonctionnelle pouvait être formée à partir d'une seule cellule (Kordon and Smith, 1998; Shackleton et al., 2006). L'application de combinaisons de marqueurs cellulaires de surface a permis de déterminer un modèle de différenciation hiérarchique chez la souris, où les cellules souches mammaires sont particulièrement enrichies dans la sous-population $CD49^{\text{high}}CD29^{\text{high}}CD24^+Sca1^-$ (Shackleton et al., 2006). Néanmoins, l'identification des cellules responsables de la morphogénèse et de la régénération de la glande mammaire humaine reste une question clé. C'est seulement ces dernières années que le potentiel régénératif des cellules épithéliales mammaires humaines a été exploré (Stingl, 2009; Villadsen et al., 2007) (Figure 20). Comme déjà décrit dans le

chapitre précédent, deux types de cellules forment la glande mammaire: les cellules myoépithéliales et les cellules luminales, qui peuvent se différencier soit en cellules canalaire, soit en cellules produisant du lait.

Grâce à des techniques de traçage cellulaire, la présence de cellules souches unipotentes a été démontrée à la fois dans des lignées luminales et myoépithéliales (Van Keymeulen et al., 2011). Récemment, une sous-population présentant une forte expression de CD49f (intégrine $\alpha 6$) et une faible (voire absente) expression de la molécule d'adhésion EpCAM a été mise en évidence pour ses capacités d'autorenouvellement *in vivo* (Eirew et al., 2008; Lim et al., 2009).

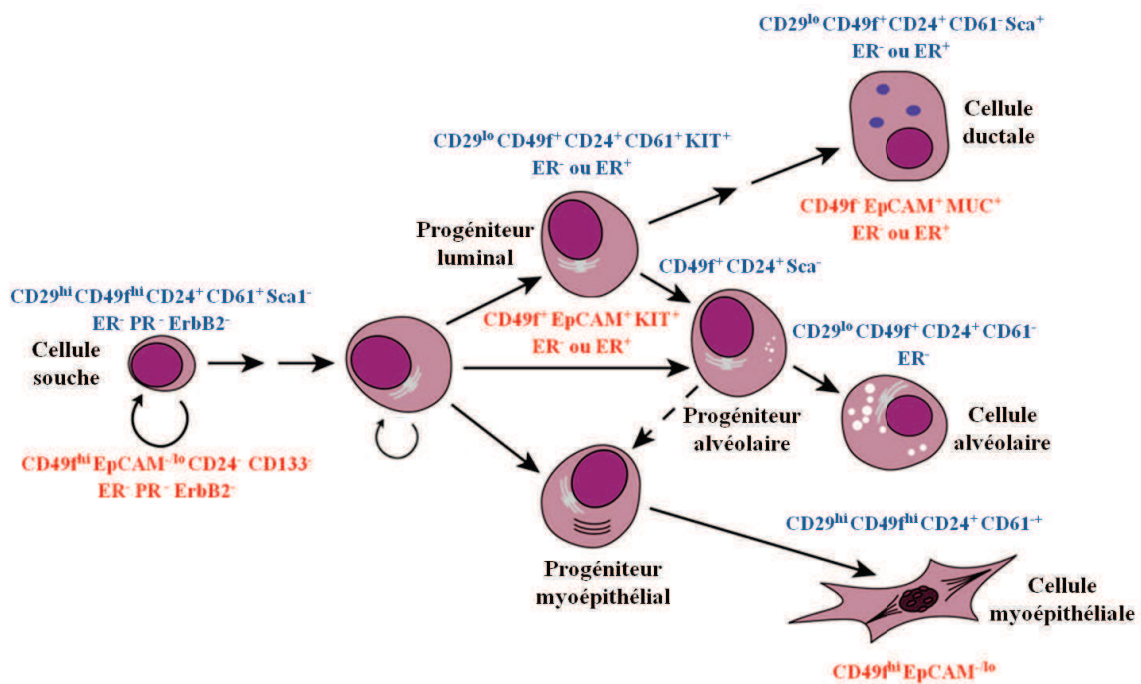


Figure 20. Modèle de différenciation hiérarchique de l'épithélium mammaire

Les principaux marqueurs de surface utilisés pour isoler les cellules souches de l'épithélium mammaire humain (en bleu) et chez la souris (en rouge) sont ici représentés (Visvader, 2009).

3.2. Les cellules souches du cancer du sein

Le cancer du sein est un des premiers cancers solides dans lesquels les CSC ont pu être identifiées et isolées c'est le cancer du sein. En suivant un schéma de différenciation similaire à celui qu'on peut observer dans le développement mammaire, les cancers du sein peuvent dériver des cellules souches normales ou des cellules progénitrices ayant subi par des altérations génétiques. Selon les types d'altérations génétiques et selon le statut hormonal de l'environnement dans lequel elles évoluent, les cellules issues des CSC

progressent de façon plus ou moins importante vers un stade différencié. La dichotomie luminal/basal-like des cancers du sein pourrait dériver des progéniteurs lumineux ou myoépithéliaux (Figure 21).

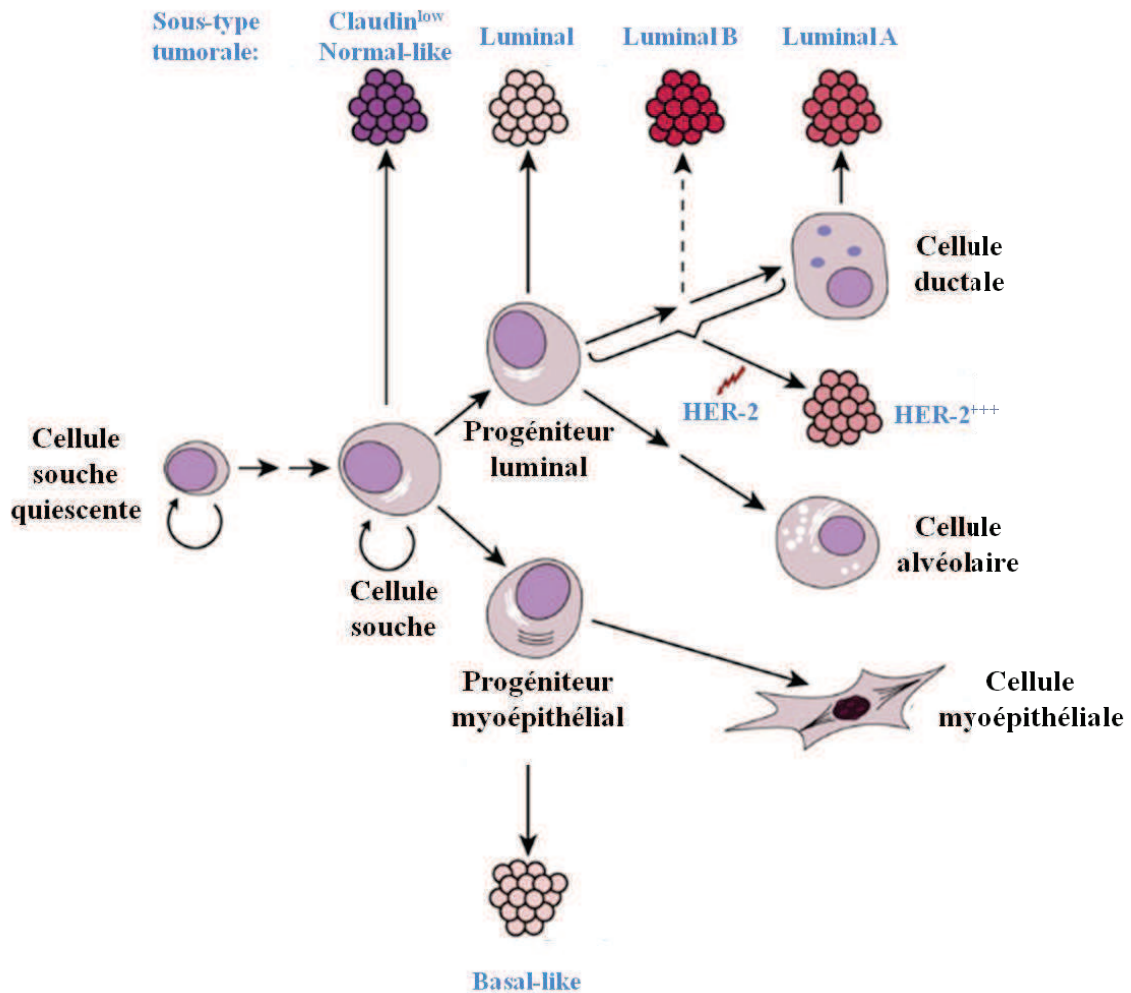


Figure 21. Schéma de la différenciation épithéliale mammaire normale et tumorale

A partir d'une cellule souche deux lignages cellulaires peuvent se développer, aboutissant à des cellules matures différenciées. Les six différents types de tumeurs mammaires sont ici associés à leur correspondant épithélial normal, sur la base du sous-type moléculaire (Adapté de Visvader, 2009).

A partir de métastases issues de cancer du sein, une population $CD44^+CD24^{-/low}/ESA^+/Lin^-$ a été initialement identifiée comme étant des cellules souches. Deux cents cellules présentant ce phénotype injectées dans le tissu adipeux de la glande mammaire de souris immunodéprimées NOD-SCID (*Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency*), ont été capables de provoquer un adénocarcinome du sein, alors que plusieurs dizaines de

Introduction

milliers de cellules non triées, isolées des mêmes tumeurs, en étaient incapables (Al-Hajj et al., 2003). En outre, ces cellules étaient capables de reconstituer l'hétérogénéité de la tumeur initiale, ce qui représente une preuve pour la validation de leur phénotype souche. Des observations analogues ont été faites pour d'autres types de tumeurs malignes.

Pour l'isolement des cellules souches cancéreuses de sein, les techniques déjà validées pour les cellules souches adultes normales ont également été utilisées. Ces techniques s'appuient sur l'évaluation de l'activité de l'enzyme aldéhyde déshydrogénase (test ALDEFLUOR), la présence d'une *Side Population*, la formation de tumorosphères (ou mammosphères) (Dontu et al., 2003b; Ponti et al., 2005), leur quiescence ou encore sur d'autres marqueurs membranaires (Britton et al., 2012; Ginestier et al., 2007; Harmes and DiRenzo, 2009; Katayama et al., 2009). Ainsi, les cellules ALDH⁺ issues des tumeurs sont jusqu'à mille fois plus tumorigènes que des cellules ALDH⁻ et peuvent reconstituer l'hétérogénéité de la tumeur initiale. Il est intéressant de noter que ces groupes de marqueurs identifient des populations qui se chevauchent mais ne sont pas identiques. Ainsi, un faible pourcentage de cellules CD44⁺/CD24⁻/ALDH⁺ (0,1-1,2%) a été identifié dans le cancer du sein comme étant extrêmement tumorigène (Charafe-Jauffret et al., 2009). Si on prend en considération l'hétérogénéité cellulaire caractérisant la glande mammaire, avec la présence concomitante de cellules progénitrices luminales et myoépithéliales, il n'est pas étonnant que différents cancers du sein puissent dériver de cellules souches cancéreuses différentes. L'étude des cellules souches dans diverses lignées cellulaires représentant les différents sous-types moléculaires de cancer du sein a permis de prouver l'hétérogénéité des cellules souches mammaires. Par exemple, des lignées cellulaires dérivant des tumeurs mammaires de souris KO pour le gène *Brcal* présentent deux populations avec des caractéristiques de cellules souches, une CD44⁺/CD24⁻ et une CD133⁺, qui ne se superposent pas (Wright et al., 2008). Cela peut être dû au fait que ces cancers ne correspondent pas à un lignage mais à une anomalie génétique capable de conférer à la tumeur des propriétés agressives. Le même raisonnement peut être fait pour les cancers HER-2⁺, qui pourraient dériver de CSC ayant la capacité de s'orienter soit vers un lignage, soit vers l'autre, soit vers les deux.

Il semble aussi que le pourcentage de CSC dans une tumeur soit strictement corrélé au type moléculaire. En effet, il semble que les tumeurs du type basal-like (plus agressives) présentent une quantité supérieure de CSC par rapport à celles du phénotype luminal (plus différenciées). Cependant, de plus en plus de travaux semblent démontrer que tous les

sous-types de cancer du sein seraient dérivés d'un même type de cellule souche cancéreuse de phénotype luminal (Lim et al., 2009; Molyneux et al., 2010; Proia et al., 2011).

3.3. Implications cliniques des cellules souches cancéreuses

D'un point de vue clinique, la découverte des CSC a plusieurs implications, puisque ces cellules doivent être ciblées et éradiquées pour assurer une survie à long terme du patient. Comme nous avons vu dans le chapitre précédent (§A.2.4.b) les CSC semblent être une de causes majeures de rechute et de récurrence dans le cancer (Figure 22). Résistantes aux thérapies conventionnelles grâce à leurs propriétés intrinsèques, les CSC peuvent aussi être enrichies par ces mêmes thérapies, comme dans le cas de la gemcitabine dans le traitement du cancer pancréatique (Mueller et al., 2009), le cyclophosphamide dans le cancer colorectal (Dylla et al., 2008), ou encore la doxorubicine et le cyclophosphamide dans le cancer du sein (Li et al., 2008).

L'un des principaux mécanismes de résistance des CSC aux agents chimiothérapeutiques est la **surexpression de transporteur d'efflux** (*Multi Drug Resistance*, MDR) (Dean, 2009). Dans les CSC, les agents cytotoxiques sont transportés activement et de façon non spécifique à travers la membrane plasmique *via* les transporteurs ABC. Les CSC mammaires surexpriment des transporteurs ABCB1 (glycoprotéine P, MDR-1) et ABCG2 (BCRP-1). Jusqu'à ce jour, les tentatives d'utilisation d'inhibiteurs de ces transporteurs (e.g. Verapamil, Fumitremorgin C) ont échoué à cause d'une importante toxicité (Choi and Yu, 2013; Peng et al., 2009).

De la même façon que pour les cellules souches normales, les CSC sont en général en **quiescence**. Les chimiothérapies et radiothérapies conventionnelles, ainsi que la plupart des thérapies, ciblent les cellules en prolifération et nécessitent l'activation du cycle cellulaire pour déclencher l'apoptose. Dans certains cas, ces cellules quiescentes peuvent coïncider avec les cellules tumorales dormantes (décrites dans le paragraphe §B.2.3).

Un mécanisme de résistance à la radiothérapie est représenté par le fait que les CSC peuvent résider au niveau des **niches hypoxiques** et présenter, par conséquence, un niveau plus bas des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et un système de récupération de radicaux libres plus efficace (Baumann et al., 2008; Diehn et al., 2009). Dans certains cancers, comme le glioblastome, les CSC semblent résister à la radiothérapie grâce à la surexpression des réponses aux dommages à l'ADN (**DDR**, *DNA Damage Response*).

Introduction

Plusieurs voies de signalisation semblent être liées à ce mécanisme, comme l'activation de l'ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) dans le glioblastome (Cheng et al., 2011) et dans le cancer du sein (Yin and Glass, 2011), ou la voie PI3-K/Akt dans le médulloblastome et dans le cancer du poumon (Hambardzumyan et al., 2008; Mihatsch et al., 2011)

La présence d'une forte **activité de l'ALDH** dans les CSC immatures pourrait aussi expliquer la résistance de ces cellules à certaines drogues comme la cyclophosphamide (Koelling et al., 1990; Sládek, 2003). L'inhibition de l'activité de l'aldéhyde déshydrogénase a en effet montré une réduction de la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie en cellules de cancer du sein ALDH⁺/CD44⁺ (Crocker and Allan, 2012) et pourrait représenter une cible potentielle dans certains traitements du cancer du sein et d'autres tumeurs solides.

Enfin, la corrélation entre l'état indifférencié des CSC et le phénotype lié à la **transition épithélio-mésenchymateuse** semble être une cause de la chimiorésistance de ces cellules (Ansieau et al., 2010). En effet, l'observation de la présence des caractéristiques de cellules mésenchymateuses dans les cellules persistantes à la suite d'un traitement de chimiothérapie de patientes atteintes d'un cancer du sein, suggère que la TEM puisse leur conférer une résistance supérieure (Creighton et al., 2009). Par exemple, Twist1 protège les cellules de l'apoptose en favorisant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Puisieux et al., 2006)

La mise au point de composés capables d'induire l'activation des CSC quiescentes et leur différenciation semble être l'approche la plus prometteuse pour cibler ces cellules. Des composés induisant la différenciation cellulaire sont déjà utilisés pour le traitement de certains cancers, comme l'acide trans-rétinoïque (ATRA) induisant la maturation des cellules malignes dans la leucémie aiguë promyélocytaire. L'ATRA a également montré des effets sur la différenciation des CSC de glioblastome (où il induit l'inhibition de la voie Notch) et du sein (Ginestier et al., 2009; Ying et al., 2011).

Récemment, la cisplatine (en association avec du TRAIL) a montré la capacité à induire la différenciation et la mort des CSC dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein (Prabhakaran et al., 2013). Cette molécule a néanmoins une demi-vie courte dans le plasma et peut être toxique à des doses élevées (Yin et al., 2011).

Les propriétés de résistance aux thérapies classiques, leurs capacités invasives ainsi que leur capacité régénérative font des CSC un sujet d'étude de choix et la cible du

développement de nouvelles thérapies. Le problème majeur est lié à leur isolement et caractérisation.

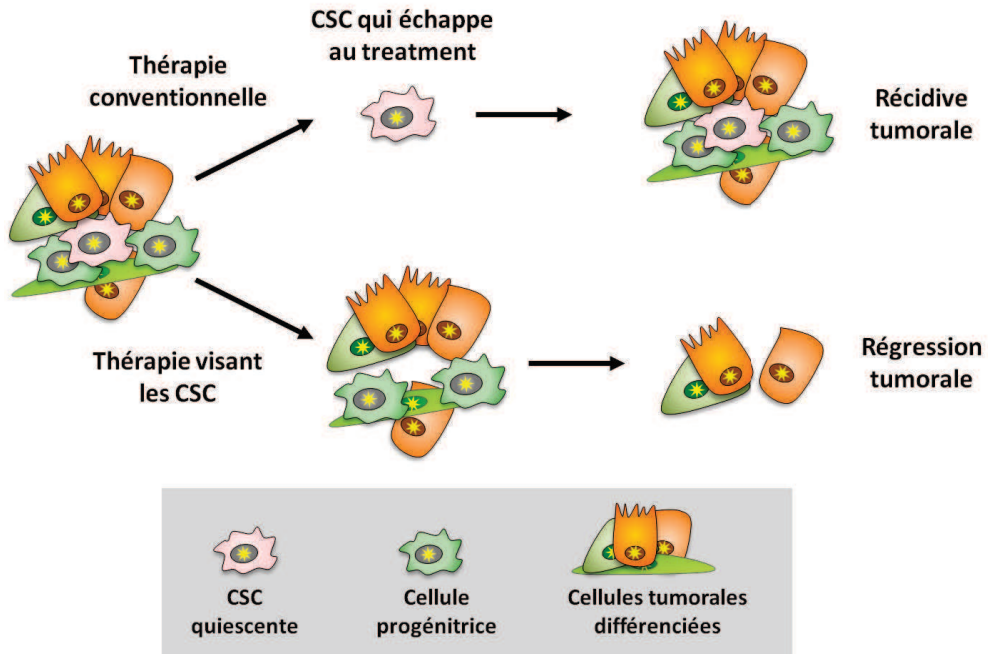


Figure 22. Régénération de la tumeur par les cellules souches cancéreuses

L'incapacité à cibler les cellules souches cancéreuses, résistantes aux thérapies conventionnelles, est la cause de phénomènes de récidence (D'après Reya et al., 2001).

C. Le (pro)NGF et ses récepteurs

1. Le NGF et son précurseur

Les neurotrophines constituent une famille de facteurs de croissance regroupant le NGF (*Nerve Growth Factor*), le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), la neurotrophine-3 (NT-3) et la neurotrophine-4/5 (NT-4/5). Initialement identifiées comme des facteurs essentiels pour la survie et la différenciation des neurones du système nerveux central et périphérique au cours du développement, les neurotrophines engendrent une réponse biologique aussi dans des tissus non-neuronaux.

1.1. Découverte

La découverte du NGF remonte à plus de 50 ans, lorsque Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger et Stanley Cohen observaient qu'une tumeur de souris transplantée dans un embryon de poulet était capable de sécréter une substance favorisant l'innervation de la tumeur : le NGF. Ainsi, le NGF fut isolé en 1954 (Cohen et al., 1954), séquencé en 1971 (Angeletti and Bradshaw, 1971) et en 1986 valut le prix Nobel de médecine à Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen. Les autres neurotrophines ont été identifiées et isolées bien plus tard, à commencer par le BDNF en 1982, purifiée à partir de tissu issu du cerveau de cochon (Barde et al., 1982), lequel a été suivi par la NT-3 en 1990 (Hohn et al., 1990; Jones and Reichardt, 1990; Maisonpierre et al., 1990; Rosenthal et al., 1990) et la NT-4/5, découvertes consécutivement chez le xenopus, le rat et l'homme (Berkemeier et al., 1991; Hallböök et al., 1991; Ip et al., 1992).

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. Les neurotrophines humaines

Neurotrophines humaines et leur localisation chromosomique. Dans le tableau sont également référencées la taille de l'ARNm majoritaire avec son numéro d'accension NCBI et la taille en acide aminés de la préproneurotrophine avec son numéro d'accension Uniprot.

1.2. Structure: du gène aux protéines

a) Les produits du gène

Issus de la duplication d'un gène ancestral, les gènes du NGF, BDNF, NT-3 et NT-4/5 sont très conservés et se répartissent, respectivement, sur les chromosomes 1, 11, 12 et 19. Leur synthèse aboutit à des précurseurs protéiques de tailles voisines présentant une forte homologie de séquence et des poids moléculaires très proches (Tableau 3).

Ces facteurs neurotrophiques sont tous synthétisés et maturés selon le même processus. Générés sous forme de pré-pro-neurotrophines d'environ 30 kDa, leur maturation débute par l'élimination du peptide signal au niveau du réticulum endoplasmique. Les pro-neurotrophines ainsi produites subissent ensuite une coupure protéolytique au niveau des 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, d'une masse d'environ 14 kDa (Gray and Ellis, 2008; Lee et al., 2001; Mowla et al., 2001). Des sites de glycosylation situés au niveau des pro-domaines interviennent dans la régulation du trafic endomembranaire et de la sécrétion des neurotrophines (Suter et al., 1991).

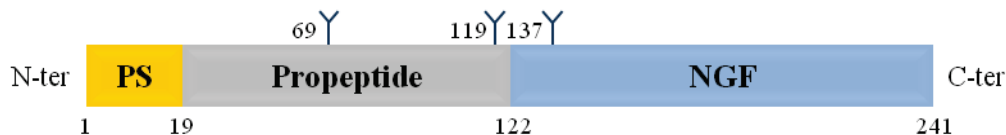


Figure 23. Représentation schématique du pro/NGF

Le gène du NGF code une pré-pro-neurotrophine possédant un peptide signal (PS, jaune), un propeptide (gris) et la protéine mature (bleu). Le peptide signal (19 aa) est clivé après séquestration de la protéine dans le réticulum endoplasmique. Le NGF mature est obtenu suite au clivage du propeptide par des enzymes spécifiques (furine, plasmine, métalloprotéases). Les motifs Y représentent des sites potentiels de N-glycosylation.

b) Organisation conformationnelle du (pro)NGF

La sous-unité active du NGF, le β -NGF, se présente sous forme d'un homodimère à pH physiologique. Chaque monomère est constitué d'une chaîne de 118 acides aminés présentant une partie centrale de 4 feuillets β (β 1- β 4) arrangés de manière antiparallèle, 3 boucles variables (V1-V3) et 6 cystéines conservées formant un nœud de cystéines (en

anglais, *cystine knot*) avec 3 ponts disulfures permettant de rigidifier la structure (Figure 24) (McDonald and Blundell, 1991; Wiesmann and de Vos, 2001).

Deux monomères de β -NGF s'associent parallèlement, grâce à la mise en place d'interactions hydrophobes entre les feuillets β (Bradshaw et al., 1994). En revanche, le propeptide seul est monomérique en solution, suggérant que ce sont les parties matures des proneurotrophines qui permettent leur dimérisation (Kliemann et al., 2004; Paoletti et al., 2009).

Le propeptide du proNGF (et des proneurotrophines en général) a un rôle primordial dans la conformation du NGF, en facilitant la mise en place des ponts disulfures de la partie mature (Hauburger et al., 2007; Rattenholl et al., 2001). Lorsqu'il est libre, le peptide 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).

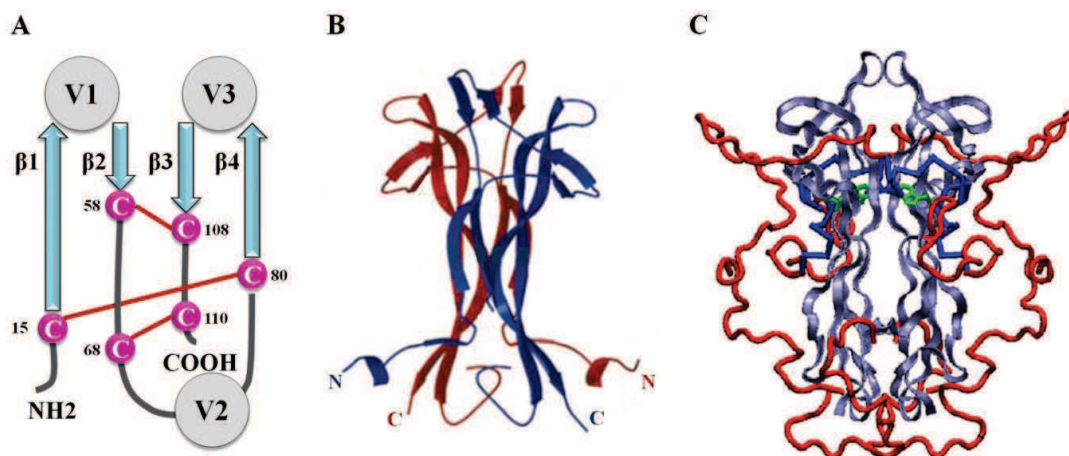


Figure 24. Structure du NGF et du proNGF

A. Monomère de β -NGF composé de 3 boucles variables (V1-V3), 4 feuillets β (β 1- β 4) et de 6 cystéines conservées établissant 3 ponts disulfures. B. Dimère de β -NGF formé de 2 protomères (un bleu et un rouge) orientés face à face et de façon parallèle. C. Dimère de proNGF avec le cœur formé par le dimère des parties matures (en gris) et les propeptides de chaque monomère de proNGF rejetés à l'extérieur (en rouge). L'interface d'interaction entre le peptide (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., 2011; Wiesmann et al., 1999).

Pendant de nombreuses années, le proNGF a été considéré comme une simple forme intermédiaire dans la synthèse du β -NGF mature, sans rôle particulier et dont le clivage était systématique. Ce n'est qu'au début des années 2000 que les effets de proneurotrophines ont été montrés. Ainsi, Lee et ses collaborateurs montrent que le proNGF et le proBDNF peuvent être sécrétés et avoir une action pro-apoptotique sur les neurones, là

où les formes matures induisent la survie et la différenciation cellulaire (Lee et al., 2001). Le proNGF est en effet sécrété *in vitro* par de nombreuses populations cellulaires, comme les neurones corticaux (Bruno and Cuello, 2006), les neurones sympathiques (Hasan et al., 2003), les cellules microgliales (Srinivasan et al., 2004), les astrocytes (Domeniconi et al., 2007) et les cellules du cancer du sein (Demont et al., 2012). *In vivo*, le proNGF est sécrété dans plusieurs organes et il peut induire une réponse biologique dans des populations neuronales et non-neuronales (Bierl et al., 2005; Harrington et al., 2004; Truzzi et al., 2008).

2. Les récepteurs au (pro)NGF

Les neurotrophines forment des homodimères qui exercent leur action sur trois types de récepteurs: les récepteurs de la famille Trk (*Tropomyosin-receptor kinase*), le récepteur p75^{NTR} (pour *Neurotrophin receptor*) qui lie l'ensemble des neurotrophines et les pro-neurotrophines avec la même affinité et la sortiline, qui lie les pro-neurotrophines. Chaque récepteur Trk a un ligand privilégié : le NGF pour TrkA, le BDNF et la NT-4/5 pour TrkB et la NT-3 pour TrkC.

2.1. Le récepteur TrkA

a) Découverte et structure

Le gène *trkA* (ou *NTRK1*), découvert dans les années 80, contient 17 exons et couvre environ 23 kb du chromosome 1 et est transcrit en un ARNm de 2,7 kb (Tableau 4) (Martin-Zanca et al., 1989).

Nom du gène	Localisation du gène	Taille de l'ARNm (pb)	n° NCBI	Taille en acides aminés	n° Uniprot
<i>NTRK1</i>	1q21-q22	2662	NM_002529	790	P04629

Tableau 4. Caractéristiques du récepteur TrkA humain

Gène du récepteur TrkA humain et sa localisation chromosomique ; taille du transcrit majoritaire avec son numéro d'accèsion NCBI ; taille en acides aminés de la protéine avec son numéro d'accèsion Uniprot.

Le domaine extracellulaire de TrkA est constitué de trois régions riches en leucines encadrées de deux régions riches en cystéines. La partie juxtamembranaire est constituée

Introduction

de deux domaines de type immunoglobuline-like (Ig-C2) 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 NGF et NT-3. Les domaines Ig-C participent à l'expression et à la bonne conformation du récepteur et jouent un rôle important dans la liaison du NGF (Holden et al., 1997; Urfer et al., 1995; Wiesmann et al., 1999). De plus, les domaines Ig-C stabilisent les formes monomériques de TrkA, empêchant leur dimérisation spontanée et leur activation en absence de neurotrophines (Arevalo et al., 2000). Enfin, la partie extracellulaire comporte également de nombreuses glycosylations qui semblent être essentielles pour l'adressage du récepteur à la membrane, mais aussi pour sa signalisation et pour prévenir son activation en absence de NGF (Friedman and Greene, 1999; Watson et al., 1999) (Figure 25).

Le domaine intracellulaire, très conservé entre les différents récepteurs Trk, présente de nombreuses tyrosines phosphorylables. Les résidus Y670, Y674 et Y675 sont situés à l'intérieur du domaine tyrosine kinase et sont responsables de la trans-autophosphorylation du récepteur. Les résidus Y490, Y695, Y751 et Y785 en dehors du domaine kinase sont responsables du recrutement des protéines adaptatrices nécessaires à la signalisation du récepteur (Segal et al., 1996; Stephens et al., 1994).

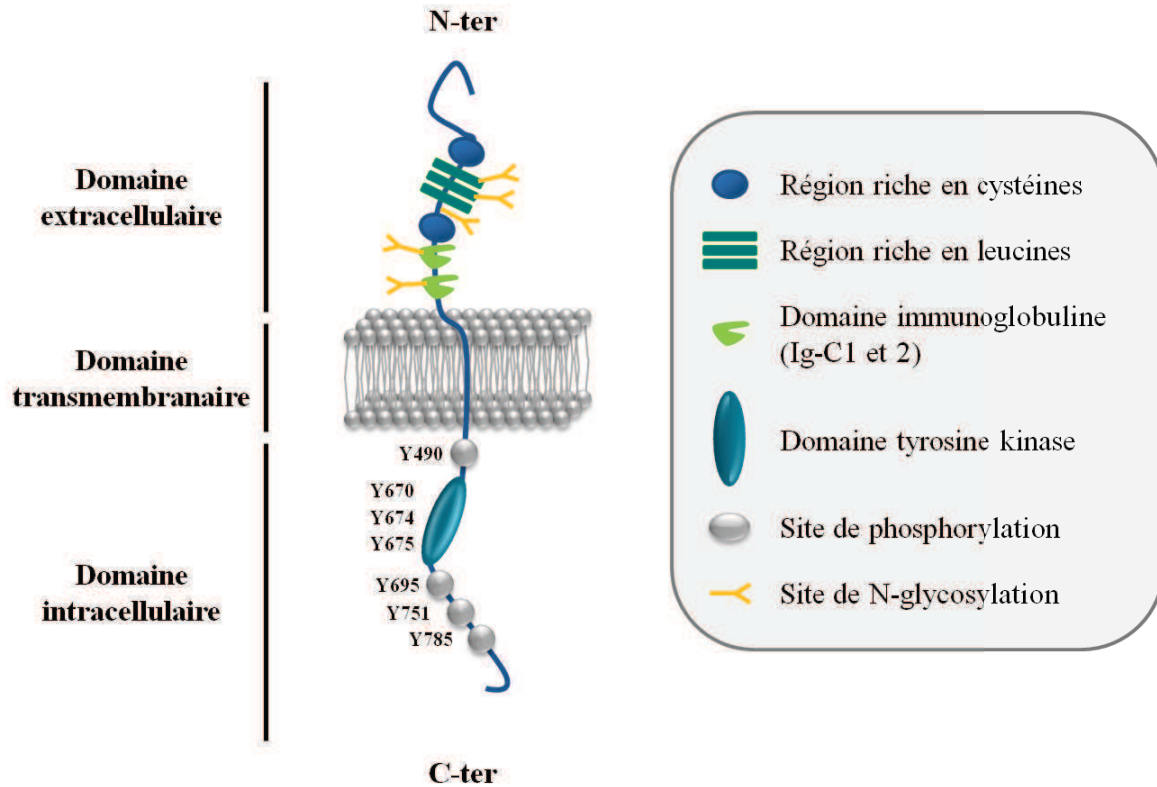


Figure 25. Représentation schématique du récepteur TrkA

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). Le domaine intracellulaire est 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.

b) Signalisation du récepteur TrkA

Comme dans l'ensemble des récepteurs à activité tyrosine kinase, l'activation de TrkA par le NGF induit une dimérisation du récepteur, initiant l'activation du domaine kinase et la trans-autophosphorylation de résidus tyrosine au niveau du domaine intracellulaire (Lemmon and Schlessinger, 2010; Schlessinger, 2000). 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 and Maruyama, 2011).

Les trois voies de signalisation principalement activées par le récepteur TrkA, particulièrement étudiées dans les cellules neuronales, sont : la voie des MAPK (*Mitogen-*

Activated Protein Kinase) Ras/Raf, la voie PLC- γ 1 (*PhosphoLipase C - γ 1*) -PKC (*Protein Kinase C*) et la voie PI3-K/Akt (Arévalo and Wu, 2006; Huang and Reichardt, 2003).

2.2. Le récepteur p75^{NTR}

a) Découverte

La protéine p75^{NTR} fut identifiée en 1973 comme étant le récepteur du *Nerve Growth Factor*, d'où son nom NGFR (*NGF Receptor*) (Herrup and Shooter, 1973). La découverte de sa faible affinité pour le NGF ($K_d=10^{-9}$ M) lui a valu le nom de LNGFR (pour *low affinity NGFR*) (Chao et al., 1986; Johnson et al., 1986; Radeke et al., 1987), qui a finalement évolué en p75^{NTR} (pour *Neurotrophin Receptor*) après la découverte de sa capacité à lier les autres membres de la famille de neurotrophines (BDNF, NT-3 et NT-4/5) avec la même affinité dans la plupart des types cellulaires (Rodríguez-Tébar et al., 1992; Rodríguez-Tébar et al., 1990).

b) Gène et structure

Le gène NGFR humain est constitué de 6 exons pour une longueur d'environ 23 kb. Il code pour un ARNm de 3,4 kb contenant une région non codante de 300 nucléotides en 5' et de 2000 nucléotides en 3' qui contient une séquence consensus de signal de polyadénylation (Tableau 5) (Johnson et al., 1986).

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 ; taille du transcrit majoritaire avec son numéro d'accèsion NCBI ; taille en acides aminés de la protéine avec son numéro d'accèsion Uniprot.

❖ Domaine extracellulaire et transmembranaire

Après le clivage du peptide signal de 28 acides aminés, p75^{NTR} est un récepteur de 399 acides aminés répartis en un domaine extracellulaire (222 aa), transmembranaire (19 aa) et intracellulaire (158 aa) (Figure 26).

Introduction

Le domaine extracellulaire de 222 acides aminés contient quatre domaines présentant une répétition de six cystéines appelés CRD (*Cystein-Rich Domain*), numérotés de 1 à 4 à partir de l'extrémité N-terminale, ce qui lui vaut d'appartenir à la superfamille des récepteurs TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (Baldwin et al., 1992; Yan and Chao, 1991). Chaque CRD contient trois ponts disulfures conférant au récepteur sa conformation et permettant la liaison des ligands. p75^{NTR} présente également un site de N-glycosylation et plusieurs sites de O-glycosylation dans sa région juxtamembranaire extracellulaire, faisant passer la masse moléculaire du récepteur 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 transmembranaire consiste en une seule hélice de 19 acides aminés dans laquelle la cystéine 257 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 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 sa signalisation à son association avec des protéines adaptatrices cytoplasmiques qui peuvent se fixer sur différentes régions, dont les plus importantes sont le domaine de mort et le domaine juxtamembranaire.

Le **domaine de mort** (DD, *Death Domain*), la région la plus proéminente du domaine intracellulaire, est une structure globulaire d'environ 80 acides aminés comprenant 6 hélices α . La présence d'un réarrangement au niveau de l'hélice 1, avec une orientation particulière, en fait un domaine de mort de type II, contrairement aux autres membres de la famille de récepteurs TNF (e.g. TNFR et Fas) (Liepinsh et al., 1997). Cette différence a d'importantes conséquences physiologiques, notamment dans le recrutement de protéines adaptatrices spécifiques (Wang et al., 2001).

Le domaine juxtamembranaire, également appelé **domaine Chopper**, est une petite région de 29 acides aminés qui permet le recrutement de protéines adaptatrices conduisant à l'activation des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose et dans la survie cellulaire. Ce domaine doit rester attaché à la membrane pour exercer son effet pro-apoptotique (e.g. dans les neurones); la forme soluble agit plutôt comme un dominant négatif et est donc anti-apoptotique (Coulson et al., 2000, 2004).

Introduction

A l'extrémité C-terminale p75^{NTR} présente un tripeptide Serine-Proline-Valine (SPV), site consensus de liaison à des domaines PDZ (*Post-synaptic Disc-large Zona*). Les protéines contenant des domaines PDZ sont des molécules adaptatrices permettant l'assemblage de complexes protéiques servant de plateforme de signalisation. Ces protéines pourraient également jouer un rôle dans la localisation cellulaire en interagissant directement avec les lipides membranaires (Hung and Sheng, 2002; Sheng and Sala, 2001).

Plusieurs modifications post-transductionnelles ont lieu dans le domaine intracellulaire. Il est palmitoylé sur la cystéine 279, ce qui semble être nécessaire au clivage du récepteur (Barker et al., 1994; Underwood et al., 2008), et il présente plusieurs sites de phosphorylation. La phosphorylation des tyrosines Y336 et Y368 dans le domaine de mort, suite à la fixation du NGF, aboutit à l'activation/inactivation des GTPases Ras et RhoA, liées à la croissance des neurites (Blöchl and Blöchl, 2007; Blöchl et al., 2004). La phosphorylation de la tyrosine Y336 peut aussi permettre la fixation d'une E3-ubiquitine ligase c-Cbl favorisant l'ubiquitination de p75^{NTR} (Ohrt et al., 2004) et son interaction à TRAF6 pour induire la survie cellulaire dans les neurones (Geetha et al., 2012). p75^{NTR} peut aussi être phosphorylé sur le sérine 304 par la PKAC β (*Protein Kinase cAMP-dependent β catalytic subunit*) permettant sa translocation dans les raft lipidiques (Higuchi et al., 2003). Enfin, la phosphorylation de la serine 277 par la PKC (*Protein Kinase C*) permettrait de contrôler la durée du signal du complexe p75^{NTR}/ligand après le transport rétrograde dans les neurones (Butowt and von Bartheld, 2009).

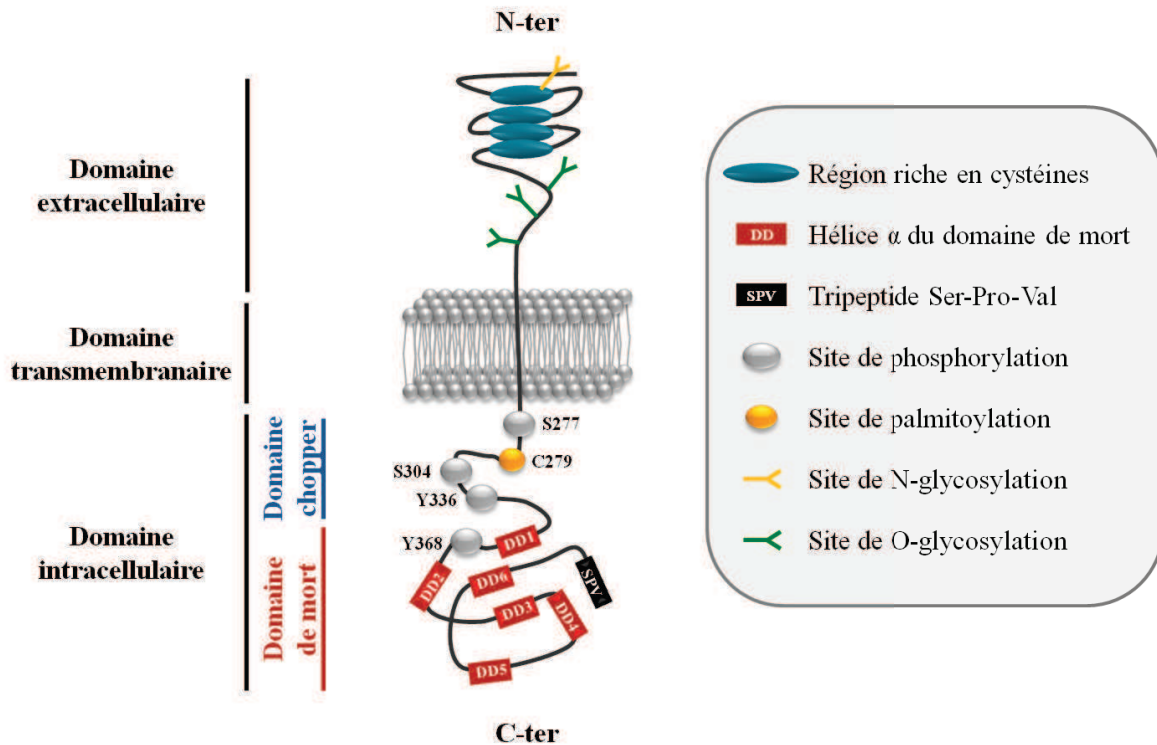


Figure 26. Représentation schématique du récepteur p75^{NTR}

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

c) Les différentes formes de p75^{NTR}

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

❖ Epissage alternatif

Le gène *NGFR* peut subir un épissage alternatif de l'exon 3, générant une isoforme alternative dépourvue des CRD 2,3 et 4 et de son ectodomaine. Cette isoforme, identifiée dans les ganglions sympathiques de poulet mais présente aussi chez l'homme, est incapable de fixer le NGF, BDNF, NT-3 et NT-4/5 (von Schack et al., 2001). La fonction biologique de ce p75^{NTR} tronqué reste inconnue, bien que des souris KO pour les deux récepteurs présentent des pertes plus importantes au niveau neuronal et au niveau du

développement par rapport aux souris KO que pour la seule forme complète (Hempstead, 2002). En effet, les domaines transmembranaire et intracellulaire de cette isoforme restent intacts et *a priori* fonctionnels.

❖ Protéolyse de p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} complet est la cible de deux clivages successifs connus sous le nom de RIP, pour *Regulated Intramembrane Proteolysis* (Brown et al., 2000) (Figure 27). Un premier clivage est réalisé dans la partie extracellulaire juxtamembranaire par la métalloprotéase ADAM17/TACE (*A Disintegrin And Metalloprotease/TNF α Converting Enzyme*) (Weskamp et al., 2004). Ce clivage permet la libération d'un fragment soluble (p75^{NTR}-ECD, *Extracellular Domain*) comprenant le domaine extracellulaire de p75^{NTR}, qui conserve sa capacité à fixer les neurotrophines. La partie du récepteur qui reste liée à la membrane est appelée p75^{NTR}-CTF (*C-terminal fragment*). Le site exact de clivage par l'ADAM17 n'est pas connu, néanmoins des expériences de mutagenèse dirigée et une identification par spectrométrie de masse ont permis la mise en évidence de deux 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 au deuxième clivage, qui a lieu dans la partie transmembranaire et libère dans le cytoplasme un fragment intracellulaire appelé p75^{NTR}-ICD (*IntraCellular Domain*). Le deuxième clivage est réalisé par la presenilin-1 (PS-1) (Zampieri et al., 2005), qui fait partie du complexe protéique γ -sécrétase, et est modulé par l'association de l'E3 ubiquitin ligase TRAF6 (*TNF Receptor-Associated Factor 6*) à la PS-1 (Powell et al., 2009). Le site de ce second clivage a été identifié par spectrométrie de masse et se situe entre les valine 263 et 264, juste après la séquence ²⁶⁰AAVV²⁶³ (Jung et al., 2003).

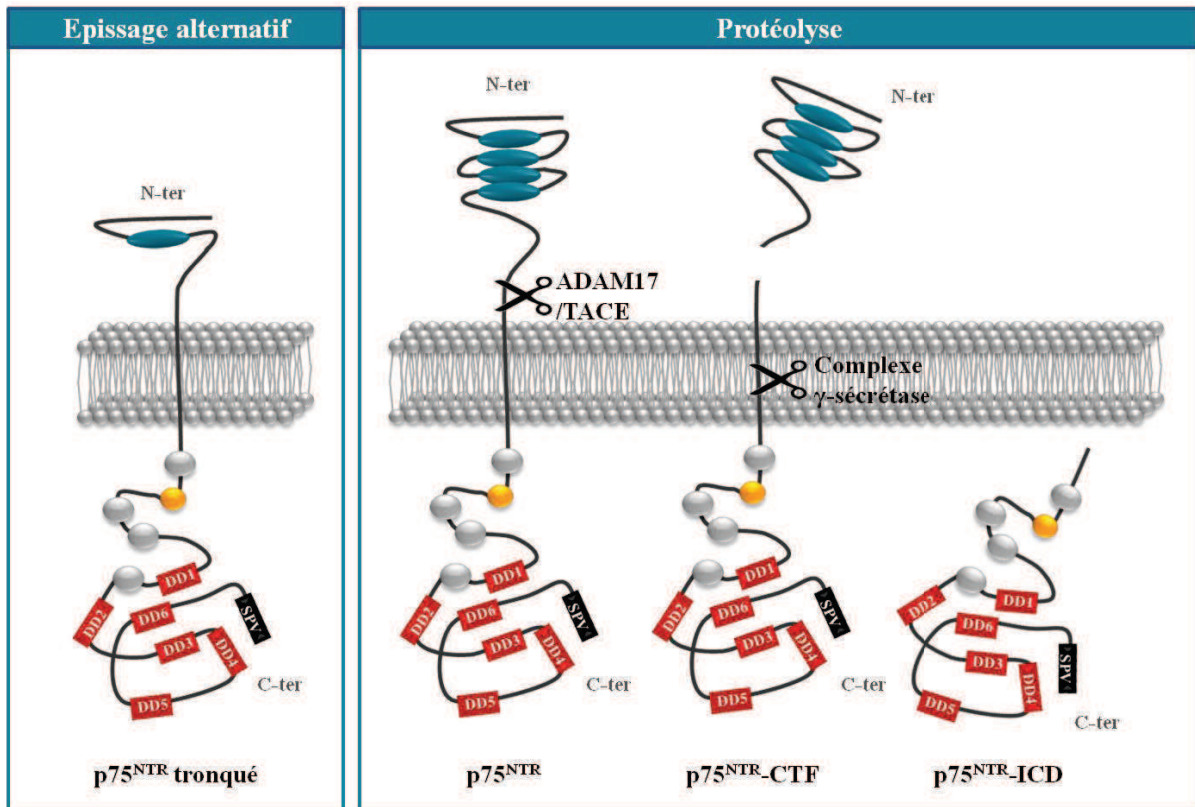


Figure 27. Les différentes isoformes du récepteur p75^{NTR}

L'épissage alternatif de l'exon 3 du gène *NGFR* conduit à la formation d'une forme tronquée du récepteur p75^{NTR} (à gauche). Cette forme tronquée possède un domaine extracellulaire très court composé du seul CRD1 ne pouvant plus lier les neurotrophines. La forme complète de p75^{NTR} peut subir une protéolyse par une série de deux clivages successifs (à droite). Le premier clivage par la métalloprotéase ADAM17/TACE libère un fragment soluble correspondant à la partie extracellulaire du récepteur et une partie ancrée à la membrane (p75^{NTR}-CTF). Le deuxième clivage par le complexe γ -sécrétase a lieu dans la partie transmembranaire du fragment CTF et libère dans le cytoplasme la partie intracellulaire (p75^{NTR}-ICD, capable de se transloquer dans le noyau).

Le fragment intracellulaire libéré à la suite des clivages a été identifié dans le noyau des cellules, suggérant un rôle comme facteur de transcription (Frade, 2005; Kanning et al., 2003; Majdan et al., 1997; Podlesniy et al., 2006). Dans les neurones sympathiques, par exemple, le clivage de p75^{NTR} induit par le BDNF entraîne l'ubiquitination de NRIF (*Neurotrophin Receptor Interacting Factor*) et la translocation dans le noyau du complexe p75^{NTR}-ICD/NRIF pour induire l'apoptose (Kenchappa et al., 2006).

La protéolyse de p75^{NTR} est un des mécanismes principaux de signalisation du récepteur et celle-ci est finement régulée, même si sa dynamique de régulation n'a pas été complètement élucidée. Plusieurs laboratoires ont montré l'implication des récepteurs Trk dans l'induction du premier clivage (Ceni et al., 2010). 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 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 MAPK. Suite à ce clivage, p75^{NTR} activerait la voie Akt et provoquerait l'arrêt du cycle cellulaire (Ceni et al., 2010). Dans un autre modèle, la lignée 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 neurotrophine testée (i.e. NGF, BDNF, NT-3, proNGF et proBDNF), n'a d'effet sur le clivage de p75^{NTR}.

d) Signalisation de p75^{NTR}

Ne présentant pas une activité catalytique intrinsèque, p75^{NTR} doit sa signalisation à son interaction avec d'autres récepteurs, au recrutement de partenaires protéiques intracellulaires et à sa protéolyse. Les multiples voies de signalisation activées par p75^{NTR}, principalement établies dans les modèles neuronaux et les cellules PC12, aboutissent, selon le contexte cellulaire, à la survie, la mort par apoptose, à la régulation du cycle cellulaire ou à la neurogénèse.

La fixation des ligands à p75^{NTR} entraîne le recrutement de protéines adaptatrices au niveau des domaines intracellulaires du récepteur. Les voies de signalisation ainsi activées aboutissent à deux effets majeurs : l'induction de l'apoptose ou, au contraire, de la survie cellulaire (Roux and Barker, 2002).

- Les **voies pro-apoptotiques** mettent principalement en jeu l'activation de la voie JNK, conduisant à l'activation de la voie des caspases, grâce à l'induction des protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 (*Bcl-2 Homology*) et au relargage du cytochrome C dans le cytosol (Bhakar et al., 2003; Nykjaer et al., 2005). p75^{NTR} peut également induire la génération de PIP2 (*Phosphatidylinositol(4,5) biPhosphate*), provoquant la mort cellulaire par efflux de potassium (Coulson et al., 2008). De nombreux adaptateurs interagissant avec la partie intracellulaire de p75^{NTR} et impliqués dans l'induction de l'apoptose ont été identifiés, dont NRAGE (*Neurotrophin Receptor interacting MAGE-homolog*) (Salehi et al., 2002), NADE (*p75^{NTR}-associated cell death executor*) (Mukai et al., 2003) et NRIF (*Neurotrophin Receptor Interacting Factor*) (Kenchappa et al., 2006) sont les mieux caractérisés.

Introduction

- Les **voies de survie** cellulaire induites par l'activation de $p75^{NTR}$ par les neurotrophines mettent en jeu principalement l'activation du facteur de transcription NF κ B. Ce facteur peut être activé par recrutement des protéines de la famille TRAF (en particulier TRAF6), de RIP-2 (*Receptor Interacting Protein-2*), FAP-1 (*Fas-Associated Protein-1*), FAIM (*Fas Apoptosis Inhibitory Molecule*) et TRADD (*TNF Receptor-Associated Death Domain protein*), tous interagissant directement avec le domaine intracellulaire de $p75^{NTR}$ (El Yazidi-Belkoura et al., 2003; Irie et al., 1999; Khursigara et al., 2001; Powell et al., 2009; Sole et al., 2004). $p75^{NTR}$ peut également induire la survie en activant directement la voie PI3K/Akt généralement associée aux récepteurs Trk (Roux et al., 2001).
- Les **autres voies** activées par $p75^{NTR}$ sont impliquées dans la synthèse des céramides, dans l'élongation de neurites, dans la myélination, dans la migration/invasion cellulaire, dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans le maintien des cellules souches (Chittka et al., 2004; Dobrowsky et al., 1994; Johnston et al., 2007; Nakamura et al., 2007; Notterpek, 2003; Yamashita et al., 1999).

e) Les corécepteurs de $p75^{NTR}$

Les effets induits par le récepteur $p75^{NTR}$ sont très divers et un des mécanismes contribuant à cette diversité est la capacité de $p75^{NTR}$ à coopérer avec d'autres récepteurs pour former des complexes multimériques. Ainsi, la famille des Trk, la sortiline et les récepteurs Nogo et LINGO-1 (*LRR and Ig domain-cointaining, Nogo receptor-interacting protein*) interagissent avec $p75^{NTR}$.

- La formation du complexe **$p75^{NTR}$ /Trk** permet d'améliorer l'affinité et la spécificité de chaque neurotrophine pour son récepteur Trk ($K_d=10^{-11}$ M), principalement dans un contexte de survie cellulaire (Chao and Hempstead, 1995; Esposito et al., 2001). Les voies de signalisation de $p75^{NTR}$ et TrkA peuvent également être affectées par l'interaction des deux récepteurs et de nombreuses études ont montré l'importance du ratio TrkA/ $p75^{NTR}$ dans la réponse cellulaire induite par la stimulation du NGF (Chao and Hempstead, 1995; Gatzinsky et al., 2001). Ainsi l'expression de TrkA peut bloquer l'effet pro-apoptotique de $p75^{NTR}$ dans plusieurs modèles neuronaux (Casaccia-Bonnet et al., 1999) et, inversement, la présence de $p75^{NTR}$ peut augmenter l'activation des voies de signalisation induites par TrkA (Lachance et al., 1997).

- L'association **p75^{NTR}/sortiline** (paragraphe §C.2.3) permet la fixation des proneurotrophines, en particulier le proNGF et le proBDNF. 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; Paiardini and Caputo, 2008; Schweigreiter, 2006)
- La formation du complexe trimérique **p75^{NTR}/NogoR/LINGO-1** est mise en place pour induire l'inhibition de la croissance neuronale. En réponse aux ligands Nogo-66, MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*) ou OMgP (*Oligodendrocyte Myelin glycoProtein*), le complexe recrute la protéine Rho-GDI, autorisant ainsi la libération de RhoA et son activation (Mi et al., 2004; Niederöst et al., 2002; Yamashita and Tohyama, 2003).

2.3. La sortiline

La sortiline est une protéine exprimée dans différents tissus, mais particulièrement abondante dans le système nerveux central en cours de développement (Nykjaer and Willnow, 2012; Petersen et al., 1997). Le gène de la sortiline (*SORT1*) est situé sur le chromosome 1 et contient 20 exons qui s'étendent sur 50 kb (tableau 6).

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 du récepteur sortiline humain

Gène de la sortiline humaine et sa localisation chromosomique ; taille de l'ARNm avec son numéro d'accèsion NCBI ; taille en acides aminés de la protéine avec son numéro d'accèsion Uniprot.

La sortiline appartient à la famille des récepteurs membranaires Vps10p (*Vacuolar protein sorting-10*), participant chez les mammifères au trafic protéique à travers le réseau de l'appareil de Golgi vers la membrane cellulaire, mais également au transfert inverse vers les endosomes ou les lysosomes (Hermeijer, 2009). Après le 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) (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 (Canuel et al., 2009; Nielsen et al., 2001). Ainsi, selon que la sortiline soit vésiculaire ou exposée à la membrane plasmique, la partie N-terminale est luminale ou extracellulaire. La sortiline exposée à la surface cellulaire est alors capable d'interagir avec p75^{NTR} pour créer des sites de liaison de haute affinité pour les neurotrophines. La sortiline peut aussi interagir avec les récepteurs Trk 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). Récemment, notre équipe a montré l'interaction entre la sortiline et TrkA dans l'induction de l'invasion dans des lignées de cancer du sein en réponse à une stimulation au proNGF (Demont et al., 2012).

3. Rôle du NGF et du proNGF dans le cancer

Les neurotrophines et leurs récepteurs sont connus pour être impliqués dans le développement et le maintien du système nerveux. Ils sont également impliqués dans plusieurs pathologies cérébrales, tels que l'Alzheimer, la schizophrénie ou les œdèmes cérébraux. Cependant un nombre croissant montre que les neurotrophines (en particulier le NGF) sont exprimées par des cellules non-neuronales et peuvent avoir un effet sur le développement tumoral.

3.1. Effets anti-tumoraux liés à l'expression de p75^{NTR}

L'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs peut influencer négativement le développement et la progression du cancer. Cet effet est généralement lié à l'expression du récepteur p75^{NTR}, qui a été identifié comme un suppresseur de tumeur dans les cancers gastriques, hépatiques, prostatiques, de la vessie et du pancréas. Dans ces cancers l'expression de p75^{NTR} diminue dans les cellules cancéreuses comparées aux cellules normales. Ainsi, la surexpression de p75^{NTR} dans ces cancers inhibe la croissance *in vitro* et *in vivo* en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 *via* l'augmentation de p27^{Kip1} ou p16^{INK4a} et une diminution des cyclines A, D1 et E et de PCNA (Allen et al., 2005; Jin et al., 2007a; Khwaja and Djakiew, 2003; Khwaja et al., 2006).

De plus, dans les cancers gastriques et prostatiques p75^{NTR} inhibe la migration et l'invasion *in vitro* et la formation de métastases *in vivo*, par la diminution de la voie NFκB et des enzymes uPA (*urokinase-type Plasminogen Activator*) et MMP-9, ainsi que par une augmentation de l'inhibiteur de MMP, TIMP-1 (*Tissue Inhibitor of Matrix MetalloProteinase-1*) (Jin et al., 2007b; Nalbandian and Djakiew, 2006).

p75^{NTR} peut également induire l'apoptose dans le cancer de la vessie et de la prostate par la régulation des protéines impliquées dans la voie mitochondriale de l'apoptose telles que Bad, Bax, Bik, Bcl-2, Bcl-XL, IAP1, les caspases 9 et 7 et le relargage du cytochrome C (Khwaja et al., 2006; Tabassum et al., 2003).

On peut noter que dans le cancer de la prostate et du pancréas l'expression de TrkA augmente au cours de la progression tumorale, alors que celle du p75^{NTR} diminue. De cette balance en faveur de TrkA résulte une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses (Arrighi et al., 2010; Papatsoris et al., 2007; Sakamoto et al., 2001).

Inversement, dans le neuroblastome le récepteur TrkA est associé à un bon pronostic et il induit la différenciation des cellules cancéreuses sous l'effet du NGF, bien que l'isoforme TrkA-III soit capable d'augmenter la tumorigenèse et l'angiogenèse *in vivo* (Nakagawara and Brodeur, 1997; Tacconelli et al., 2004).

3.2. Effets pro-tumoraux

Le plus souvent, l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs contribue à la progression tumorale en favorisant la stimulation de la croissance, de la métastase et de l'angiogenèse.

L'activation du récepteur TrkA par le NGF est corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers de l'ovaire (Ødegaard et al., 2007), de la thyroïde (où le gène *NTRK1* est modifié) (Pierotti and Greco, 2006), de la prostate (Arrighi et al., 2010), du pancréas (Ma et al., 2008), du conduit salivaire (Negri et al., 2008) et du sein (Lagadec et al., 2009). 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)

La surexpression de p75^{NTR} a un effet pro-tumoral dans le mélanome (Chan and Tahan, 2010), dans le cancer des cellules squameuses (Søland et al., 2008) et dans le cancer du sein (Verbeke et al., 2010).

L'implication des proneurotrophines dans les cancers est peu détaillée. Une intervention potentielle du proNGF dans la progression tumorale a été mise en évidence dans le cancer de la prostate, où les cellules stromales prostatiques sécrètent du proNGF qui semble favoriser la migration des cellules cancéreuses, dans le cancer du pancréas, du sein et dans le mélanome (Delsite and Djakiew, 1999; Demont et al., 2012; Truzzi et al., 2008; Zhu et al., 2002).

3.3. Cancer du sein

Comme nous avons vu précédemment, l'axe (pro)NGF/TrkA/p75^{NTR} a une influence dans le cancer du sein. En effet, les cellules épithéliales cancéreuses mammaires produisent et sécrètent le NGF, le BDNF, la NT-4/5 et le proNGF et ces facteurs induisent la prolifération, la survie et/ou l'invasion de ces mêmes cellules *via* une boucle autocrine (Demont et al., 2012; Descamps et al., 2001a; Dollé 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).

L'utilisation de modèles de surexpression des récepteurs, d'anticorps bloquants, d'inhibiteurs pharmacologiques *in vitro* et *in vivo*, a permis de discriminer le rôle des récepteurs TrkA et p75^{NTR} dans l'effet pro-tumoral du NGF et du pro-NGF.

Ainsi, le récepteur p75^{NTR} exerce son effet anti-apoptotique en recrutant l'adaptateur TRADD pour stimuler la voie NFkB (Descamps et al., 2001a; El Yazidi-Belkoura et al., 2003), mais aussi par l'induction d'un ralentissement de la prolifération, associé à une diminution de phospho-Rb et une augmentation de l'expression de p21^{Waf1} (Verbeke et al., 2010). Le récepteur TrkA, quant à lui, stimule la prolifération, la survie et la migration/invasion des cellules cancéreuses de sein *in vitro* comme *in vivo*, et augmente l'angiogenèse *via* l'activation des voies APK, PI3-K/Akt et p38 MAPK (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 inhibiteur de l'activité kinase du récepteur, réduit la formation de tumeurs mammaires dans un modèle de xénogreffes (Adriaenssens et al., 2008).

Le NGF produit par les cellules cancéreuses agit également de manière paracrine en augmentant la migration, l'invasion, la perméabilité et la tubulogenèse des cellules

endothéliales (Dollé et al., 2005; 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 du VEGF par les cellules endothéliales, en réponse au NGF. Enfin, plus récemment, notre laboratoire a montré que le proNGF est produit et sécrété par les cellules épithéliales cancéreuses mammaires et surexprimé dans les tumeurs mammaires malignes. Sur ces cellules, le proNGF induit l'invasion en activant les voies PI3-K/Akt et Src, en interagissant avec la sortiline et TrkA (Demont et al., 2012).

4. L'axe (pro)NGF/p75^{NTR} dans les cellules souches

L'activité et l'homéostasie des cellules souches sont régulées, entre autres, par les facteurs de croissance. Comme nous avons déjà vu précédemment, les membres de la famille TGFβ ont des effets péiotropiques sur le compartiment des cellules souches et le EGF et le bFGF ont été identifiés pour leur action sur le maintien et la prolifération des cellules souches neurales (Kitchens et al., 1994). Les neurotrophines jouent également un rôle fondamental dans la régulation des cellules souches dans certains modèles cellulaires. Les neurotrophines et le récepteur p75^{NTR} sont impliqués, par exemple, dans la migration et la différenciation des cellules souches neurales du système nerveux central. Ici, p75^{NTR} semble maintenir les cellules dans un état indifférencié alors que la présence des ligands induit leur différenciation et leur spécification. (Du et al., 2006; Guo et al., 2013; Young et al., 2007). Bien que l'implication du NGF dans les cellules souches situées dans les autres tissus soit peu définie, il apparaît que le récepteur p75^{NTR} constitue un marqueur potentiel de plusieurs catégories de cellules souches, présentant des degrés de potentialité et de spécification très différents. Premièrement, p75^{NTR} est exprimé par les cellules souches embryonnaires (Moscatelli et al., 2009; Schuldiner et al., 2000) et est un marqueur consolidé des cellules souches de la crête neurale (NCSC, *Neural Crest Stem Cells*) (Jiang et al., 2009). Plusieurs tissus dérivants de la migration des cellules de la crête neurale gardent une sous-population de cellules souches p75^{NTR}-positive. Par exemple les cellules souches du système nerveux entérique, des ganglions spinaux, du nerf sciatique (Kruger et al., 2002; Li et al., 2007b) ainsi que les cellules souches de nombreux épithéliums, comme les cellules souches de l'œsophage, du larynx, de l'épiderme, de la cornée et de la pulpe dentaire (Li et al., 2012; Martens et al., 2012; Marynka-Kalmani et al., 2010; Okumura et al., 2003).

Introduction

Dans une revue que je signe comme premier auteur, nous avons collecté et ordonné les connaissances actuelles sur l'implication du récepteur p75^{NTR} dans les cellules souches. Cette revue, je l'ai inséré dans l'introduction pour faire un état des lieux du rôle et des fonctions de ce récepteur : ainsi, une meilleure compréhension du récepteur p75^{NTR} pourrait s'avérer déterminante pour une meilleure caractérisation des cellules souches.

The emerging role of p75 neurotrophin receptor in stem cell biology: marker or biomarker?

Elisa Tomellini^{1,2}, Chann Lagadec^{1,2}, Renata Polakowska^{3¶} and Xuefen Le Bourhis^{1,2}

¹Université Lille 1, 59650, Villeneuve d'Ascq, France

²INSERM U908, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

³Inserm U837 Jean-Pierre Aubert Research Center, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), 59045 Lille, France

Corresponding author: Xuefen Le Bourhis, INSERM U908, Batiment SN3, Université Lille 1, 59650 Villeneuve d'Ascq, France. Phone: 33 (0)3 20 43 40 97; Fax: 33 (0)3 20 43 40 38; Email: xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr

Key words: p75^{NTR}, stem cells, cancer stem cells.

Abstract

p75^{NTR}, the common receptor for both neurotrophins and proneurotrophins, has been widely described for its role in many tissues, including the nervous system. More recently, a close relationship between p75^{NTR} expression and pluripotency has been described. p75^{NTR} was shown to be expressed in various types of stem cells and has been used to prospectively isolate stem cells with different degrees of potency. Here we overview the current knowledge on p75^{NTR} in stem cells, ranging from embryonic to adult stem cells and cancer stem cells. In attempt to address its potential role in the control of stem cells biology, the molecular mechanisms underlying p75^{NTR} signaling in different models are also highlighted, p75^{NTR}-mediated functions include survival, apoptosis, migration and differentiation and depend on cell type, (pro)neurotrophins bindings, expression of interacting transmembrane co-receptors, availability of intracellular adaptor molecules as well as post-translational modifications such as regulated proteolytic processing. It is therefore conceivable that p75^{NTR} can modulate cell-fate decision through its highly ramified signaling pathways. Thus, elucidating the potential implication of p75^{NTR} as well as the underlying molecular mechanisms will certainly shed new light on the biology of both normal and cancer stem cells.

1. Introduction

Since the discovery of pluripotent embryonic stem cells (ESCs), first isolated in 1981 [1], the ability of these cells to differentiate into three germ layers (ectoderm, mesoderm and endoderm) and then into fully specialized cells [2] has opened many enticing perspectives in tissue regeneration and cell therapy. Comprehension of stem cell biology has become even more important with the discovery of cancer stem cells (CSCs) and their fundamental role in tumor development [3]. Embryonic stem cells, adult stem cells and cancer stem cells share common features. They all are long living cells, with the ability to renew through mitotic cell divisions and to differentiate into more specialized cell types. However, they are quite different in terms of potency, ranging from pluripotency in ESCs, multipotency, bipotency, unipotency to the increasing degree of commitment of transit amplifying/progenitor cells. Nevertheless, with the exception of hematopoietic stem cells, specific markers have not yet been identified. The research of specific cell-surface markers is essential for distinguishing ESCs, adult stem cells and CSCs from their destined-to-differentiate transit amplifying daughters, to better understand mechanisms governing stem cell renewal and differentiation. Among increasing prospective stem cell markers, the p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}, also known as NGFR or CD271) seems to enrich for the stem/progenitor subset in several models presenting varying degrees of potency. p75^{NTR} has been widely described for its signaling role as the common receptor for neurotrophins and proneurotrophins and, as such, p75^{NTR} can exert a plethora of functions according to cell context [4,5]. The aim of this review is to overview what is known about p75^{NTR} in stem cell biology. Based upon the well-known and diverse signaling functions of p75^{NTR}, we also attempt to address its potential role in the control of stem cells proliferation and differentiation.

2. Diverse functions of p75^{NTR}, the common receptor of neurotrophins and proneurotrophins

Since p75^{NTR} has been identified as a bona fide neural crest stem cell marker [6], it was widely used to isolate putative stem cells from neural crest-derived tissues, and its involvement in mesenchymal stem cells (MSCs) differentiation along the osteogenic, adipogenic, chondrogenic and myogenic lineages has been exploited. Nonetheless, p75^{NTR} expression and its function *in vivo*, as well as underlying mechanisms in stem cell biology

have not yet been sufficiently addressed. In this chapter we will briefly overview what is known about p75^{NTR}-mediated signaling, which might give us a clue about the role of p75^{NTR} in stem cells.

p75^{NTR} is the common receptor for all neurotrophins, which includes nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3) and neurotrophin 4/5 (NT-4/5), and their immature precursors proneurotrophins.

p75^{NTR} is a 427 amino acid transmembrane receptor, containing an extracellular stalk domain, a single transmembrane domain and a cytoplasmic domain. The presence of 4 cysteine rich domains (CRD) at the extracellular part of p75^{NTR} affiliates it to the TNF receptors superfamily and is responsible for receptor conformation and ligand binding [7]. A N-glycosylation site and several O-glycosylation sites in the extracellular domain seem to be implicated in membrane targeting of the protein, as well as in ligand binding [8]. The transmembrane domain consists of a unique helix, where the highly conserved cysteine C257 plays an important role in receptor dimerization, in conformational changes induced by ligand binding and in signal transduction [9]. The intracellular domain, very conserved between species, does not have an intrinsic catalytic activity and it owes its signaling to the association with cytoplasmic partners through different regions. Three regions within the intracellular domain are important for p75^{NTR} activity: (i) the chopper and (ii) death domain, whose activation induces apoptosis [10], and (iii) the conserved SPV (tripeptide Serine-Proline-Valine), a consensus sequence to PDZ (Post-synaptic Discharge Zona) proteins binding domains. The associated partners allow for assembly of protein complexes, acting as signaling platforms. The p75^{NTR} intracellular domain is also subject to several post-translational modifications, like a palmitoylation [11] and phosphorylations at several amino acid residues. For more specific details about p75^{NTR}, extensive descriptions of its structure and processing are reviewed in [12,13].

p75^{NTR} signal transduction pathways are extremely variable, being strongly dependent on cell type, cell differentiation status, neurotrophins binding, availability of intracellular adaptor molecules, expression of interacting transmembrane co-receptors and post-translational modifications [14]. This leads to divergent cellular responses including cell survival [15], apoptosis [10,16], neurite outgrowth and retraction [17], myelination [18], cell cycle regulation [19], cell migration and invasion [20,21], and progenitor differentiation [22] (Figure 1).

2.1. Influence of co-receptors in p75^{NTR} signaling

Formation of p75^{NTR} dimers has a strong regulatory effect on the activation of receptor signaling [9,23]. Nevertheless, different biological effects of p75^{NTR} can be explained by the ability of p75^{NTR} to cooperate with other receptors, forming multimeric/heteromeric complexes. Indeed, apart from its interaction with specific tyrosine kinase receptors of neurotrophins (TrkA for NGF, TrkB for BDNF and NT-4/5, TrkC for NT-3), p75^{NTR} participates in several signaling platforms by interacting with an increasing list of co-receptors, including sortilin (SORT1), Nogo receptor (NgR) and LINGO-1 [24,25]. Interactions with co-receptors seem to be dependent on p75^{NTR} cellular localization, the state of cellular differentiation and its post-translational modifications [14].

p75^{NTR} and Trk receptors can interact both in synergistic or antagonistic manners and their association or mutual control has been extensively investigated [26]. The formation of a p75^{NTR}/Trk complex was shown to facilitate affinity and selectivity of each neurotrophin for its Trk receptor ($k_d=10^{-11}$ M), probably by the induction of conformational changes in its intracellular and extracellular domains, exposing a high affinity site for association with neurotrophins [27]. Recently, the direct interaction between p75^{NTR} and TrkA has been demonstrated even in the absence of NGF [28], and it cannot be excluded that other proteins might be associated in this complex.

The p75^{NTR}/sortilin complex is known to induce cell death following pro-neurotrophins binding [29,30]. Signaling pathways connected to the ternary complex proNT/p75^{NTR}/sortilin are poorly described. The cytoplasmatic tail of sortilin has a potential to recruit specific protein partners to induce its own signaling and/or to facilitate p75^{NTR}-mediated signals.

Finally, the trimeric complex with NgR and LINGO-1 receptors is known to fix Nogo-66, MAG (Myelin-Associated Glycoprotein) or OMgP (Oligodendrocyte Myeline glycoprotein) to inhibit neurite growth, by the activation of RhoA [31–33].

2.2. p75^{NTR} signaling by the recruitment of intracellular partners

p75^{NTR}, like other members of the TNFR superfamily, does not have an intrinsic enzymatic activity and it owes its signaling to the recruitment of intracellular binding proteins, leading to activation of different signaling pathways. These signaling pathways have been predominately established in neuronal models and in rat PC12 (pheochromocytoma) cells where, depending on the cellular context, mediate survival, apoptosis, cell cycle arrest, myelination and

neurogenesis. There is a wide array of proteins that have been demonstrated to interact with the intracellular domain of p75^{NTR}. These include:

- 1) NRAGE (Neurotrophin Receptor-interacting MAGE homolog) [34], NADE (p75^{NTR}-associated cell death executor) [35], NRIF (Neurotrophin Receptor Interacting Factor) [36], Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) and TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor 6) [37], leading to pro-apoptotic signaling mainly by activation of the JNK pathway;
- 2) TRAFs [38], RIP2 (Receptor Interacting Protein 2) [39], FAP1 (Fas-Associated Protein 1) [40], FAIM (Fas Apoptosis Inhibitor Molecule) [41] and TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain protein) [42], leading to pro-survival signaling through the activation of the Nuclear-factor -kB (NF-kB) transcription factor;
- 3) SC1 (Schwann Cell factor-1), Sall2 (Sal like 2), Necdin, leading to cell cycle arrest [19];
- 4) Par3 (Protease activated receptor 3), implicated in Schwann cells myelination [43];
- 5) PDE4 (Phosphodiesterase type 4), leading to cAMP degradation and matrix remodeling in Schwann cells [44];
- 6) MAGI-1 (Membrane-Associated Guanylate kinase with inverted organization) [45] and Shc [46], both involved in neurite extension.

2.3. p75^{NTR} proteolytic processing

The regulated proteolysis of p75^{NTR} has been largely described in neurons. p75^{NTR} undergoes extracellular cleavage by the metalloproteases ADAM17/TACE, releasing the ectodomain of the receptor, to form a 28 kDa membrane-bound C-terminal fragment (p75-CTF). The p75-CTF is subsequently cleaved within the transmembrane domain by γ -secretase and gives rise to the soluble p75 intracellular domain (p75-ICD). The p75-ICD has been reported to be involved in cell death [47] or survival [48] of neurons and in glioma cells invasion [49]. Whether these cleavages are regulated by neurotrophins binding or by co-receptors is still a source of debate as well as their connection with p75^{NTR} signaling. It has been reported that in PC12 and HEK293 cell lines, TrkA activation increases p75^{NTR} cleavage by ADAM17 [50,51]. Several studies documented the nuclear translocation of the p75^{NTR}-ICD fragment, suggesting a direct or indirect transcriptional activity of the receptor [52]. Although in the majority of cases p75^{NTR}-CTF was described as a transient form without signaling functions, this fragment has been more recently shown to be involved in the survival of breast cancer

cells [53] and in promoting cell death in neurons when over-expressed in a form that cannot be cleaved to generate the ICD [47].

Despite the diversity of p75^{NTR} signaling in adult cells, no specific signaling is known in a stem cell context. However, we can assume that in the stem cell case, p75^{NTR} is likely to function in a cell-context dependent manner. Moreover, p75^{NTR} activation has been shown to crosstalk with canonic signaling pathways involved in stem cell phenotype such as Notch and Wnt pathways. Indeed, NGF/p75^{NTR} activation was described to modulate the expression of *hes1/5*, target genes of Notch signaling pathway through NF-κB activation [54]. During axon regeneration, NGF regulates the activities of GSK-3β and ILK, in addition to PI3K and Akt [55]. By inactivating GSK-3β, NGF participates to the activation of the Wnt pathway allowing the stabilization of APC and β-catenin [56]. Moreover, Trk receptors directly phosphorylate β-catenin at the Y142 upon neurotrophins binding, driving β-catenin translocation to the nucleus [57]. Through β-catenin translocation, Wnt factors and NTs could regulate stem cell fate decisions by activating T-cellfactor-lymphoid-enhancing-factor (TCF/LEF)-driven gene transcription [58]. BDNF, for instance, seems to contribute to proliferation and neuronal and oligodendrocytic differentiation of NSCs in vitro by triggering the Wnt/β-catenin signaling pathway [59].

3. Expression and potential roles of p75^{NTR} in stem cells

Increasing data describe the expression of p75^{NTR} in both stem cells and well differentiated cells. In many cases, p75^{NTR} has been used solely or in combination to identify stem/progenitor subsets with varying degrees of commitment, going from embryonic to adult tissues. In this chapter, we attempt to make an up-to-date overview of both the expression and potential roles of p75^{NTR} in stem cells according to their potency and germ layer origin (Table 1, Figure 2).

3.1. p75^{NTR} in embryonic stem cells

Embryonic stem cells (ESC) are pluripotent stem cells originating from the inner mass of the blastocyst that have the dual ability to self-renew and to differentiate into all cell types within the embryo and the adult. Some evidences concerning the role of p75^{NTR} in human ESCs remain controversial. Schuldiner *et al.* found that p75^{NTR} is expressed in a human embryonic stem cell line derived from human blastocyst and its mRNA is downregulated upon

differentiation in monolayer culture [60]. In the same cells, Pyle found only a transient or low expression of this receptor and supported the idea that BDNF, NT-3 and NT-4/5 neurotrophins sustain hESC survival through their binding to TrkB and TrkC receptors [61]. Nevertheless, whether the low amount of p75^{NTR} detected in these cells might be implicated in the activation of TRK signaling pathways or in neurotrophins response was not assessed, leaving unresolved the role of p75^{NTR}.

p75^{NTR} was clearly found in the mouse embryo at the early blastocyst stage (3.5 days post coitum, dpc) in Oct4-positive cells, as well as in mouse ES cell lines [62]. Its expression persists in the inner cell mass of the blastocyst (4.5 dpc), while p75^{NTR} transcripts are not present in trophoblast cells [63]. In particular, p75^{NTR} is associated with mouse ESC proliferation upon NGF treatment through its interaction with TrkA receptor [62]. Interestingly, primordial germ cells (unipotent stem cells) isolated from 11.5 dpc mouse gonads, are found to be p75^{NTR}-negatives but become p75^{NTR}-positives when dedifferentiated into pluripotent embryonic germ stem cells *in vitro* [62], suggesting that p75^{NTR} is expressed by more primitive stem cells localized high in the stem cell hierarchy.

Nevertheless, the close relationship between p75^{NTR} expression and pluripotency this far described indicates that neurotrophins signaling may be a key regulator of proliferation and survival in embryonic stem cells. Further studies are clearly needed to understand the precise dynamics of neurotrophins/p75^{NTR} actions and the underlying mechanisms.

3.2. p75^{NTR} is a robust marker of neural crest SCs

It has been clearly established that p75^{NTR} is a robust marker of neural crest stem cells (NCSCs), as p75^{NTR} has been successfully used to isolate NCSCs from fetal and adult tissues [64]. The neural crest is a transient population of multipotent stem cells arising at the lateral edge of the dorsal neural tube in vertebrates [65]. These cells migrate extensively into the embryo before aggregating to form a vast array of cell types including, among others, the neurons and glia of the peripheral nervous system (PNS), endocrine cells in the adrenal and thyroid glands, melanocytes, craniofacial cartilage and skeletal cells [66–68].

Jiang *et al.* were able to generate functional NCSCs *in vitro* by FACS-sorting p75^{NTR}-positive cells from human embryonic stem cells whose differentiation was induced by stromal fibroblasts. These p75^{NTR}-positive cells readily form neurospheres in suspension culture, self-renew to form secondary spheres, and give rise to multiple neural crest lineages including peripheral nerves, glial cells and myofibroblastic cells. Importantly, these cells massively

migrate and differentiate into neural crest derivatives when transplanted into developing chick embryos *in vivo*, demonstrating functional NCSC properties [6].

The persistence of the p75^{NTR} staining in stem cells originating from neural crest stem cells *in vivo* was evaluated in E14.5 rat sciatic nerve tissue. Starting from post-migratory neural crest cells of the fetal peripheral nerve (which is thought to contain only glial precursors), a p75^{NTR}+/*P0*- (a peripheral myelin protein) fraction was identified as highly enriched in cells functionally indistinguishable from NCSCs *in vitro*. This subpopulation self-renewed in clonal assays and generated neurons, Schwann cells, and smooth muscle-like myofibroblasts [65,69].

NCSC migration and fate are driven by environmental signals. For instance, maintenance of an undifferentiated state as well as persistent expression of p75^{NTR} in NCSC are both supported by the combinatorial Wnt/BMP (bone morphogenic protein) pathways [70,71]. Neurotrophins act in combination with different factors to mediated different fates. Indeed, NGF, BDNF or NT-3 act in concert with stem cell factor (SCF) to mediate cell death and melanocytic lineage through p75^{NTR} receptor, while the combination of FGF-2 and NT3 promotes expression of sympathetic neuroblast markers, and SCF and BDNF are involved in directing neural crest cells into sensory neuron lineage [72]. These data emphasize the importance of the concerted action of neurotrophins and p75^{NTR} in neural crest stem cells proliferation, survival and differentiation. According to the differentiation process, it cannot be excluded that neurotrophins might participate in NCSC migration and homing of p75^{NTR}-positive cells, as well as to their specific differentiation once stem cells have reached their destination.

3.3. p75^{NTR} in adult stem cells

Adult stem cells are organ- or tissue-specific stem cells. These stem cells may be multipotent, bipotent or unipotent and maintain continuous cellular turnover to provide regenerative capacity in continually renewing tissues and reparative capacity in post-mitotic tissues. In the adult, the presence of p75^{NTR} characterizes various stem/progenitor cell types like bone marrow stem cells, muscle stem cells (satellite cells), liver stem cells (stellate cells), keratinocytes of the basal layer of the epidermis, of the corneal limbal epithelium and of squamous epithelia, stem cells of the oral and esophageal mucosa. In general, p75^{NTR} is considered as the most specific marker of mesenchymal stem cells, which are endowed with adipogenic, osteogenic and chondrogenic potential [62] and of stem cells of all neural crest-derived tissues [68].

3.3.1. Ectodermal origin

Several tissues originating from migratory neural crest stem cells through a series of progressive restrictions in developmental fate have been shown to keep some multipotent/bipotent undifferentiated cells bearing p75^{NTR} expression. For instance, stem cells from dorsal root ganglion [73], adult gut [74], sciatic nerve [69] have a subpopulation of p75^{NTR}-positive cells, displaying multipotency and sphere forming potential. Enteric neural stem cells isolated from the myoenteric plexus of both rodents and humans were shown to contain a rather homogeneous population of neural crest-derived cells that exhibit high proliferation, low apoptosis, and high expression of p75^{NTR}, as well as expression of neuronal precursor markers including Nestin, Ret and Sox10 [75]. Differentiation of these cells in the enteric nervous system is driven by the combination of NT-3 and other neurotrophic factors, through the up-regulation of TrkC and the concomitant down-regulation of p75^{NTR} [76]. We can therefore infer that in these cells p75^{NTR} might maintain the undifferentiated phenotype and survival of stem cells.

A p75^{NTR}-positive cell fraction has been found to be a useful stem/progenitor cells marker in many regenerative epithelia, such as esophageal keratinocytes [77], laryngeal squamous epithelial cells [78], oral [22], epidermal [79] and corneal keratinocytes [80]. p75^{NTR} expression is mainly restricted to the basal cell layer, where keratinocyte stem cells are thought to reside [22]. In epithelial cells, p75^{NTR} distinguished a relatively immature keratinocyte subset, slow-cycling *in vivo* and presenting a strong regenerative potential *in vitro* [77]. In particular, in human oral mucosal epithelium, p75^{NTR}-positive cells were shown to be Ki67-negative *in vivo*, and to present a higher clonal growth potential *in vitro*, demonstrating the importance of this receptor for the maintenance of a stem cell pool, through the induction of a quiescent state [22]. Importantly, the implication of neurotrophins on the activation of these quiescent p75^{NTR}-positive cells has not been tested. In human adult oral mucosa lamina propria p75^{NTR}-positive stem cells are self-renewing cells that co-express Oct4 and partially express Sox2 and Nanog transcription factors [81]. p75^{NTR} is also found to be involved in controlling the fate of murine keratinocyte SCs through cell-cell interactions, where p75^{NTR}-related signaling would contribute to the control of hair follicle regression, probably by driving apoptosis [82,83]. A recent study have identified pluripotent p75^{NTR}⁺/P0⁺ stem cells in the skin bulge that were shown to differentiate into all cell types of the adult [84]. Finally, NGF is able to drive healing in a model of corneal denervation by stimulating stem cell proliferation through the induction of p75^{NTR}, TrkA and p63 (an epithelial stem cells

markers) expression [85]. These results highlight that NGF and p75^{NTR} represent pleiotropic factors affecting stem cells self-renewal in regenerating epithelia.

p75^{NTR} has been proposed as a marker of neural crest-derived dental pulp stem cells. Deciduous dental pulp stem cells (DDPSC) have been characterized as a multipotent stem cell population, with the ability to differentiate into mesodermal and neural cell lineages [86]. p75^{NTR}-positive DDPSCs own high self-renewal capacity and the ability to migrate from the deciduous dental pulp tissues [87]. The adipogenic, osteogenic, chondrogenic and neurogenic differentiation potential of p75^{NTR}-positive stem cells has been evaluated by their ability to form lipid droplets, mineralized nodules, and the cartilage extracellular matrix [88,89]. A study performed in 1996 by Luukko and colleagues found a direct correlation between the development of tooth innervation and the expression of neurotrophin receptors, postulating that p75^{NTR} alone may mediate neurotrophins effects during the determination and differentiation of odontoblast and ameloblast cell lineages. p75^{NTR} transcripts were first seen in the tooth germ during its transition from the bud to the cap stage in E16. One possible ligand for p75^{NTR} could be NGF, which has been found in developing and adult rat teeth [90]. Other study detected NGF, proNGF and p75^{NTR} in rat incisors [91]. This indicates that p75^{NTR} and its ligands are important for tooth development and are maintained in adult dental pulp stem cells.

p75^{NTR} is also widely expressed in several cell types of the central nervous system (mainly derived from the neural tube) where neurotrophins and growth factors play an important role in the regulation of several biological processes at various stages of development [92] and after neural injury (glial cell damage, axonal degeneration and traumatic injury) [93]. p75^{NTR} is a specific marker defining a population of highly proliferative subventricular-zone stem or precursor cells responsible for neuron production [94]. In neuronal stem cells p75^{NTR} was shown to be essential for the induction of oligodendrocyte differentiation. BDNF mediates its effects on neurite differentiation by activating TrkB and p75^{NTR}, while NGF and NT3 were found to induce differentiation through an Erk1/2 signaling pathway [94,95]. In the same cells, proNGF/p75^{NTR} signals would reduce oligodendrocyte differentiation by the induction of cell cycle arrest [96]. Moreover, Hapner *et al.* previously showed that a neutralizing antibody against p75^{NTR} could fully prevent neural differentiation induced by activation of the truncated TrkC [97]. During neurodevelopment p75^{NTR}-interacting proteins NADE, NRIF and SC-1 are co-localized with p75^{NTR}. The spatial and temporal ratio of NADE and NRIF seems to make individual neuroblast or glioblast more or less susceptible to p75^{NTR} mediated apoptosis; SC-1 expression increases over the time and seems to mediate p75^{NTR}-induced

growth arrest during glial development [98]. Interestingly, after traumatic brain injury, NGF stimulates the expression of biomarkers associated with neural stem cells characteristics, like Nestin [99] and induce stem cell migration and differentiation to developing and/or degenerating CNS regions. Altogether these results present p75^{NTR} as the center of a complex signaling driven by neurotrophins and Trk receptors. The neural stem cell system could therefore represent an ideal model to examine in depth how p75^{NTR} can switch from a biological response to another.

3.3.2. Mesodermal origin

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stromal cells present in adult marrow that have the potential to differentiate into lineages of mesenchymal tissues, including bone, cartilage, fat, tendon, muscle, and marrow stroma [100]. The staining of mesenchymal cells by anti-p75^{NTR} antibodies was first reported by Thomson *et al.* [101]. In these cells, p75^{NTR} acts as a key regulator of the maintenance of the undifferentiated status, with a pivotal role in the regulation of MSCs differentiation into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. To assess the effect of p75^{NTR} on universal mesenchymal differentiation, Mikami *et al.* constitutively expressed the human p75^{NTR} protein in murine multipotent MSCs (C3H10T1/2 cells). p75^{NTR} was shown to have a role by directly inhibiting the differentiation of MSCs into multiple cell types, probably through the inhibition of transcription factors, including Runx2 and OSX, which are essential for osteoblast differentiation and for expression of the chondrogenesis marker Sox9 and the myogenic marker Myf5 [87]. In hMSC the activation of the NgR-p75^{NTR} complex seems to lead to the p75^{NTR}-mediated cell differentiation, in a Trk and neurotrophin-independent manner [87]. Moreover, an increased expression of sortilin has been detected during early osteogenic differentiation, where sortilin overexpression enhances mineralization by hMSC-derived cells after osteogenic differentiation while it is not implicated in adipocyte commitment [102]. Thus the differentiation promoting or inhibiting effects of p75^{NTR} can be influenced by the absence or the presence of co-receptors. p75^{NTR} is highly expressed in freshly isolated bone marrow mesenchymal cells when maintained in non stimulated *in vitro* cultures and is rapidly down-regulated upon differentiation [103]. NGF was shown to drive bone marrow stem cells differentiation through regulation of Akt and MAPK signaling pathways [104].

Neurotrophins and their receptors are expressed in a differentiation-regulated and tissue compartment-regulated fashion during testicular and epididymal development in mouse, rat and human [105,106]. p75^{NTR} is expressed at a very early stage of gonadal formation in the

mouse (12.5 dpc), while no Trk receptor or neurotrophin immunoreactivity was detected [105]. Later on in development, p75^{NTR}/NT-3/truncated-TrkB co-expression leads to epididymal smooth muscle cell differentiation in mouse, while TrkA expression is connected to mesonephric tubules formation. In particular, a NGF gradient directly regulates proliferation and differentiation of Leydig stem cells and peritubular myoid cell lineage [107], demonstrating that neurotrophin and their receptors play a pivotal role in the regulation of cell differentiation in the developing testis and epididymis.

p75^{NTR} is displayed on human and rodent adult muscle stem cells *in vivo* (satellite cells) and is a key regulator of myogenesis and regenerative processes after injury in inflamed and dystrophic muscle [108]. It should be emphasized that in all cases, p75^{NTR} expression begins well before such embryonal structures become innervated and the receptor is down-regulated when embryo myoblasts differentiate into myotubes [109]. Interestingly, p75^{NTR} is found to regulate hepatocellular transdifferentiation into myofibroblasts and sustain fibrin deposition, thus favoring the generation of fibrotic tissue [110]. However, loss of p75^{NTR} signaling causes delayed fibrosis resolution and reduced apoptosis of hepatic myofibroblasts, suggesting that p75^{NTR} may promote recovery from fibrosis at later stages.

3.3.3. Endodermal origin

The implication of p75^{NTR} and neurotrophines signaling in tissues of endodermal origin has been less examined. The pseudostratified epithelium of the mouse trachea and human airways was shown to contain a population of basal cells functioning as stem cells, involved in tissue repair. A transcriptional profile performed by Rock and colleagues pointed out that basal cells are enriched in *Ngfr* as well as in *Ntf3* (encoding for the NT-3 neurotrophin) transcripts, suggesting the possibility of an autocrine loop within this population [111].

Precursors of hepatic stellate cells, whose endodermal origin is still elusive [112,113], express neurotrophins and their receptors including p75^{NTR} [114]. The function of p75^{NTR} on stellate cells is unknown and is hypothesized to support tissue growth, differentiation and/or migration of these cells [114,115]. In particular, p75^{NTR} seems to regulate hepatic stellate cellular (HSCs) transdifferentiation into myofibroblasts, apparently without neurotrophin ligands or co-receptor interaction and through the activation of Rho signaling, whereas p75^{NTR}^{-/-} HSCs exhibit significantly reduced differentiation [116].

3.4. p75^{NTR} in cancer stem cells

Tumors usually are heterogeneous and comprise cells with different capacities to proliferate and differentiate. This cellular heterogeneity depends on the presence of the so-called cancer stem cells, which are defined as cells that can induce *de novo* tumor formation, self-renewal *in vivo*, and re-establish the cellular composition of the parental tumor.

Most of these cells have been isolated from whole tumor cell populations based on the expression of markers that characterize the stem cell compartment in the normal tissue of origin. In the context of cancer, several studies describe a tight connection between cancer stem cells and p75^{NTR} expression, especially in melanoma, squamous cell carcinoma and breast cancer.

3.4.1 Melanoma

In the last decade many authors have raised the question about the existence of a tumorigenic cancer stem cell population in melanoma. In 2005, Fang *et al.* reported about a subpopulation of melanoma cells with characteristics of primitive progenitors for melanocytes that could give rise to a broad range of cell types [117]. Since then, these cells have been largely studied, even if existence of human melanoma stem cells is still debated [118]. Indeed, the tumorigenicity of melanoma cells has been posited to be variable depending on the degree of immunodeficiency in recipient mice, as well as on the extracellular environment into which melanoma cells are transplanted, leading to an overestimation of the tumorigenic potential of melanoma cells. Nevertheless, transplanted cells able to recapitulate melanoma heterogeneity are unlikely to be originating from non-tumorigenic or differentiated cells.

Melanocytes are from neural crest origin and all the neurotrophins and their receptors are expressed, in reverting to embryonic phenotype melanoma cells, while their expression is weak in normal melanocytes. The p75^{NTR}/NGF signaling is known to be implicated in melanoma cell proliferation and migration [119], and has been associated with an increased resistance of brain metastases [120,121]. Starting from the fact that malignant melanoma, like normal melanocytes, derive from the neural crest lineage, Boiko and colleagues in 2010 found that melanoma p75^{NTR}-positive cells were able to initiate and maintain tumor growth *in vivo* in fully immunocompromised mouse models (T, B, and NK deficient Rag2^{-/-} γ c^{-/-} mice (RG) mice). These cells were more metastatic and able to re-establish the original p75^{NTR} expression heterogeneity of the primary tumor, confirming the multilineage potency of these cells. However, the discovery that also a small p75^{NTR}-negative fraction was able to generate tumors in these mouse models may imply that the tumor-initiating ability is not exclusively a

feature of the p75^{NTR}-positive cells [122] or that both p75^{NTR}-positive and p75^{NTR}-negative cells characterize melanoma stem cells at different states. A phenotype switch appears to be a dominant phenomenon of melanoma stem cells and may be a major obstacle in their eradications [123–125]. Other teams confirmed that p75^{NTR}-positive melanoma cells have self-renewal capacity and sustain long-term tumor growth *in vivo*, and that the incidence of p75^{NTR}-positive cells in patient biopsies is associated with poor prognosis of melanoma [126], indicating that p75^{NTR} could really represent a marker of a stem/progenitor cells subset within melanoma cells.

3.4.2. Squamous cells carcinoma

In squamous cells carcinoma, p75^{NTR} is known to play a pro-tumoral role. It is, for instance, associated to bad prognosis and risk of local recurrence in oral cancers [127], where it is expressed in undifferentiated cell populations in oral leukoplakia and in oral squamous cell carcinoma (OSCC). This indicates that p75^{NTR} could be a useful prognostic marker of OSCC [128]. p75^{NTR} is correlated with perineural invasion in skin cancers [129] and is found in the 50% of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), where it is diffusely distributed in poorly differentiated tumors, suggesting that p75^{NTR} is expressed in the actively proliferating, undifferentiated cell component of each tumor [130]. In ESCC specimens, p63, a keratinocyte stem cell marker, was confined mainly to p75^{NTR}-positive cells which, furthermore, expressed lower levels of differentiation markers such as involucrin, cytokeratin 13, β 1-integrin and β 4-integrin [131]. p75^{NTR}-positive cells present self-renewal ability and chemotherapy resistance, suggesting that it may be necessary for survival and maintenance of ESCC.

3.4.3. Breast cancer

The involvement of neurotrophins in breast cancers is well documented. Indeed, breast cancer epithelial cells produce and secrete NGF, BDNF and NT4/5, which act on the same cells through an autocrine loop. Breast normal and cancer cells express both p75^{NTR} and TrkA but only cancer cells respond to NGF treatment with enhanced proliferation, survival and invasion [132–134]. p75^{NTR} in breast has been described as a marker of myoepithelial cells [135] and it has been used to identify a subset of cells with basal-like activity. Recent studies have shown that its overexpression increases survival of breast cancer cells by itself [136], or upon BDNF and NT-4/5 stimulation, recruiting the adapter TRADD to stimulate the NF- κ B pathway and cell survival [137]. A study by Kim J. and colleagues showed that cultures derived from p75^{NTR}-positive clones of MCF-7, BT474, BT549 cell lines, as well as of primary tumor-

derived cells, were able to recapitulate a pattern of heterogeneity similar to that of the global population, generating both basal-like and luminal-like compartments [138]. Moreover, we demonstrated that p75^{NTR}-positive cells exhibited higher sphere forming ability and expressed a higher proportion of stem cell markers comparing to their negative counterpart (data not published). In addition, the p75^{NTR}-positive cells presented enhances expression of miRNA 205, 221 and 222, which positively correlate with maintenance of mammary epithelial progenitor cells in mice [138,139].

3.4.4. Other cancers

Recently, p75^{NTR} has been shown to define a stem cell-like population in hypopharyngeal cancer, exhibiting tumor initiation, self-renewal and chemoresistance ability [140]. p75^{NTR} is also expressed by neuroblastoma stem cells (SH-SY5Y neuroblastoma clone), as cells expressing p75^{NTR} in association with c-kit and CD133 were found to display a highly clonogenic potency and a substantial plasticity [141].

4. Concluding remarks

Despite the great interest engendered by stem cells, the manipulation of these cells has remained challenging because of the lack of specific markers to univocally define stem cells with different potency and distinguish them from transit amplifying cells in each cellular model. With the exception of the hematopoietic system, molecular mechanisms underlying stem cells differentiation are still poorly known. Especially, the potential functions of numerous prospective stem cells markers remain to be determined.

A close relationship between expression of p75^{NTR} and pluripotency has been pointed out by increasing data. p75^{NTR} stands out for its wide expression by several cellular models bearing different degrees of plasticity. Although it has been shown that p75^{NTR} is expressed by embryonic stem cells, migrating neural crest stem cells, adult stem cells originating from different germ layers and by an increasing number of cancer stem cells (Table 1 and Figure 2), its real function in most of these cells remains enigmatic. The plethora of signaling pathways that are connected to p75^{NTR} and the absence of a catalytic activity in this receptor make difficult to define precisely how this receptor acts. As stated above, p75^{NTR} signaling can be modulated by its level of expression, dimerisation, ligand-binding, interaction with co-receptors, intracellular partners' recruitment and post-translational modifications. Thus, when considering the role of p75^{NTR} in biological process it is impossible to generalize a unique

way of action. Nevertheless, as we discussed above, p75^{NTR} is implicated in the regulation of stem cell differentiation in several cell models, including mesenchymal, dental pulp, testis and bone marrow stem cells. This action could be achieved through the induction of a quiescent state, as documented in neuronal and hematopoietic stem cells, or in breast cancer cells. We can hypothesize that p75^{NTR} could be a “fate decision” protein that enables stem cells to maintain their potency and to engage into differentiation according to molecular and cellular context. Indeed, p75^{NTR} is important for potency maintenance and its expression is often down-regulated as a cell engages into the differentiation program. An example of how p75^{NTR} may serve as a bi-directional switch in response to different stimuli is given by neuronal stem cells, where differentiation is strictly dependent on p75^{NTR} ligand expression. In these cells oligodendrocyte differentiation is induced by NGF and NT-3, and inhibited by proNGF in a p75^{NTR}-dependent manner [95,96]. A mechanism facilitating p75^{NTR} signal transduction could be its translocation in lipid raft as a consequence of its phosphorylation at Ser304 by cAMP-PKA, as it has been observed in cerebellar neurons [142]. Lipid rafts are cholesterol- and sphingolipid-rich microdomains in cell membranes that are believed to function in cellular signaling by concentrating or separating specific molecules in a unique lipid environment. They were shown to participate in the maintenance of embryonic stem self-renewal [143] as well as in hematopoietic stem cells activation from quiescence [144].

The interest of p75^{NTR} in stem cell biology comes also by the observation that these developmental cells (especially neural stem cells) produce neurotrophic factors that act on themselves and on surrounding tissues *via* autocrine and paracrine mechanisms [145].

Therefore, despite physiological complexity and technological challenges, elucidating the potential implication of p75^{NTR} as well as the underlying molecular mechanism in a context-defined manner will certainly shed new light on the biology of both normal and cancer stem cells.

Bibliography

1. Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7634–7638.
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145–1147.
3. 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.
4. Chen Y, Zeng J, Cen L, Chen Y, Wang X, Yao G, Wang W, Qi W, Kong K (2009) Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system. *J Int Med Res* **37**: 281–288.
5. Schor NF (2005) The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol* **77**: 201–214.
6. Jiang X, Gwyne Y, McKeown SJ, Bronner-Fraser M, Lutzko C, Lawlor ER (2009) Isolation and characterization of neural crest stem cells derived from in vitro-differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* **18**: 1059–1070.
7. He X-L, Garcia KC (2004) Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* **304**: 870–875.
8. Large TH, Weskamp G, Helder JC, Radeke MJ, Misko TP, Shooter EM, Reichardt LF (1989) Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system. *Neuron* **2**: 1123–1134.
9. Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Simi A, Karaca E, Reversi A, Choi S, Bothwell M, Mingarro I, Friedman WJ, et al. (2009) Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* **62**: 72–83.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Underwood CK, Coulson EJ (2008) The p75 neurotrophin receptor. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 1664–1668.
14. Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* **6**: 603–614.
15. Gentry JJ, Casaccia-Bonnett P, Carter BD (2000) Nerve growth factor activation of nuclear factor kappaB through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J Biol Chem* **275**: 7558–7565.

16. Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE (1993) Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* **261**: 345–348.
17. Yamashita T, Tucker KL, Barde YA (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* **24**: 585–593.
18. Notterpek L (2003) Neurotrophins in myelination: a new role for a puzzling receptor. *Trends Neurosci* **26**: 232–234.
19. Chittka A, Arevalo JC, Rodriguez-Guzman M, Pérez P, Chao MV, Sendtner M (2004) The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J Cell Biol* **164**: 985–996.
20. Herrmann JL, Menter DG, Hamada J, Marchetti D, Nakajima M, Nicolson GL (1993) Mediation of NGF-stimulated extracellular matrix invasion by the human melanoma low-affinity p75 neurotrophin receptor: melanoma p75 functions independently of trkA. *Mol Biol Cell* **4**: 1205–1216.
21. Johnston ALM, Lun X, Rahn JJ, Liacini A, Wang L, Hamilton MG, Parney IF, Hempstead BL, Robbins SM, Forsyth PA, et al. (2007) The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *PLoS Biol* **5**: e212.
22. Nakamura T, Endo K, Kinoshita S (2007) Identification of human oral keratinocyte stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p75 and the role of neurotrophin/p75 signaling. *Stem Cells* **25**: 628–638.
23. Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Reversi A, Klos-Applequist JM, Karaca E, Simi A, Spuch C, Choi S, Friedman WJ, et al. (2009) Ligand-independent signaling by disulfide-crosslinked dimers of the p75 neurotrophin receptor. *J Cell Sci* **122**: 3351–3357.
24. Barker PA (2004) p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* **42**: 529–533.
25. Bronfman FC, Fainzilber M (2004) Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep* **5**: 867–871.
26. Teng KK, Hempstead BL (2004) Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci* **61**: 35–48.
27. Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, Hempstead BL (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.
28. Iacaruso MF, Galli S, Martí M, Villalta JI, Estrin DA, Jares-Erijman EA, Pietrasanta LI (2011) Structural model for p75(NTR)-TrkA intracellular domain interaction: a combined FRET and bioinformatics study. *J Mol Biol* **414**: 681–698.
29. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemannel M, Schwarz E, Willnow TE, et al. (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**: 843–848.
30. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen Z-Y, Lee FS, et al. (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* **25**: 5455–5463.

31. Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z (2002) P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* **420**: 74–78.
32. Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, et al. (2004) LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* **7**: 221–228.
33. Niederöst B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE (2002) Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* **22**: 10368–10376.
34. Bertrand MJM, Kenchappa RS, Andrieu D, Leclercq-Smekens M, Nguyen HNT, Carter BD, Muscatelli F, Barker PA, De Backer O (2008) NRAGE, a p75NTR adaptor protein, is required for developmental apoptosis in vivo. *Cell Death Differ* **15**: 1921–1929.
35. Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, Suvanto P, Hanaoka T, Li Y, Irie S, Greene LA, et al. (2000) NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem* **275**: 17566–17570.
36. Linggi MS, Burke TL, Williams BB, Harrington A, Kraemer R, Hempstead BL, Yoon SO, Carter BD (2005) Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) is an essential mediator of apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* **280**: 13801–13808.
37. Geetha T, Zheng C, McGregor WC, Douglas White B, Diaz-Meco MT, Moscat J, Babu JR (2012) TRAF6 and p62 inhibit amyloid β -induced neuronal death through p75 neurotrophin receptor. *Neurochem Int* **61**: 1289–1293.
38. Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, Shin H, Wang JJ, Leo E, Zapata J, Hauser CA, et al. (1999) TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* **274**: 30202–30208.
39. Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV (2001) A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* **21**: 5854–5863.
40. Irie S, Hachiya T, Rabizadeh S, Maruyama W, Mukai J, Li Y, Reed JC, Bredesen DE, Sato TA (1999) Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation. *FEBS Lett* **460**: 191–198.
41. Sole C, Dolcet X, Segura MF, Gutierrez H, Diaz-Meco M-T, Gozzelino R, Sanchis D, Bayascas JR, Gallego C, Moscat J, et al. (2004) The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kapp B signaling. *J Cell Biol* **167**: 479–492.
42. El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Dollé 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.
43. Chan JR, Jolicoeur C, Yamauchi J, Elliott J, Fawcett JP, Ng BK, Cayouette M (2006) The polarity protein Par-3 directly interacts with p75NTR to regulate myelination. *Science* **314**: 832–836.
44. Sachs BD, Baillie GS, McCall JR, Passino MA, Schachtrup C, Wallace DA, Dunlop AJ, MacKenzie KF, Klussmann E, Lynch MJ, et al. (2007) p75 neurotrophin receptor regulates tissue

- fibrosis through inhibition of plasminogen activation via a PDE4/cAMP/PKA pathway. *J Cell Biol* **177**: 1119–1132.
45. Ito H, Morishita R, Iwamoto I, Mizuno M, Nagata K-I (2013) MAGI-1 acts as a scaffolding molecule for NGF receptor-mediated signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 2302–2310.
 46. 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.
 47. 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.
 48. Kommaddi RP, Thomas R, Ceni C, Daigneault K, Barker PA (2011) Trk-dependent ADAM17 activation facilitates neurotrophin survival signaling. *FASEB J* **25**: 2061–2070.
 49. Wang L, Rahn JJ, Lun X, Sun B, Kelly JJP, Weiss S, Robbins SM, Forsyth PA, Senger DL (2008) Gamma-secretase represents a therapeutic target for the treatment of invasive glioma mediated by the p75 neurotrophin receptor. *PLoS Biol* **6**: e289.
 50. Urra S, Escudero CA, Ramos P, Lisbona F, Allende E, Covarrubias P, Parraguez JI, Zampieri N, Chao MV, Annaert W, 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.
 51. 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.
 52. Parkhurst CN, Zampieri N, Chao MV (2010) Nuclear localization of the p75 neurotrophin receptor intracellular domain. *J Biol Chem* **285**: 5361–5368.
 53. Verbeke S, Tomellini E, Dhamani F, Meignan S, Adriaenssens E, Bourhis XL (2013) Extracellular cleavage of the p75 neurotrophin receptor is implicated in its pro-survival effect in breast cancer cells. *FEBS Lett.*
 54. Salama-Cohen P, Arévalo M-A, Meier J, Grantyn R, Rodríguez-Tébar A (2005) NGF controls dendrite development in hippocampal neurons by binding to p75NTR and modulating the cellular targets of Notch. *Mol Biol Cell* **16**: 339–347.
 55. Zhou F-Q, Zhou J, Dedhar S, Wu Y-H, Snider WD (2004) NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* **42**: 897–912.
 56. Arévalo JC, Chao MV (2005) Axonal growth: where neurotrophins meet Wnts. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 112–115.
 57. David MD, Yeramian A, Duñach M, Llovera M, Cantí C, de Herreros AG, Comella JX, Herreros J (2008) Signalling by neurotrophins and hepatocyte growth factor regulates axon morphogenesis by differential beta-catenin phosphorylation. *J Cell Sci* **121**: 2718–2730.
 58. Nelson WJ, Nusse R (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**: 1483–1487.

59. Chen B-Y, Wang X, Wang Z-Y, Wang Y-Z, Chen L-W, Luo Z-J (2013) Brain-derived neurotrophic factor stimulates proliferation and differentiation of neural stem cells, possibly by triggering the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Neurosci Res* **91**: 30–41.
60. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N (2000) Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11307–11312.
61. Pyle AD, Lock LF, Donovan PJ (2006) Neurotrophins mediate human embryonic stem cell survival. *Nat Biotechnol* **24**: 344–350.
62. Moscatelli I, Pierantozzi E, Camaioni A, Siracusa G, Campagnolo L (2009) p75 neurotrophin receptor is involved in proliferation of undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Exp Cell Res* **315**: 3220–3232.
63. Kawamura K, Kawamura N, Sato W, Fukuda J, Kumagai J, Tanaka T (2009) Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. *Endocrinology* **150**: 3774–3782.
64. Betters E, Liu Y, Kjaeldgaard A, Sundström E, García-Castro MI (2010) Analysis of early human neural crest development. *Dev Biol* **344**: 578–592.
65. Crane JF, Trainor PA (2006) Neural crest stem and progenitor cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 267–286.
66. Le Douarin NM, Calloni GW, Dupin E (2008) The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle* **7**: 1013–1019.
67. Delfino-Machín M, Chipperfield TR, Rodrigues FSLM, Kelsh RN (2007) The proliferating field of neural crest stem cells. *Dev Dyn* **236**: 3242–3254.
68. Dupin E, Sommer L (2012) Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev Biol* **366**: 83–95.
69. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ (1999) Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* **96**: 737–749.
70. Kléber M, Lee H-Y, Wurdak H, Buchstaller J, Riccomagno MM, Ittner LM, Suter U, Epstein DJ, Sommer L (2005) Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling. *J Cell Biol* **169**: 309–320.
71. Stemple DL, Anderson DJ (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* **71**: 973–985.
72. Sieber-Blum M (1998) Growth factor synergism and antagonism in early neural crest development. *Biochem Cell Biol* **76**: 1039–1050.
73. Li H-Y, Say EHM, Zhou X-F (2007) Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells* **25**: 2053–2065.
74. Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ (2002) Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* **35**: 657–669.

75. Becker L, Kulkarni S, Tiwari G, Micci M-A, Pasricha PJ (2012) Divergent fate and origin of neurosphere-like bodies from different layers of the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **302**: G958–965.
76. Chalazonitis A (2004) Neurotrophin-3 in the development of the enteric nervous system. *Prog Brain Res* **146**: 243–263.
77. Okumura T, Shimada Y, Imamura M, Yasumoto S (2003) Neurotrophin receptor p75(NTR) characterizes human esophageal keratinocyte stem cells in vitro. *Oncogene* **22**: 4017–4026.
78. Li X, Shen Y, Di B, Li J, Geng J, Lu X, He Z (2012) Biological and clinical significance of p75NTR expression in laryngeal squamous epithelia and laryngocarcinoma. *Acta Otolaryngol* **132**: 314–324.
79. Truzzi F, Marconi A, Atzei P, Panza MC, Lotti R, Dallaglio K, Tiberio R, Palazzo E, Vaschieri C, Pincelli C (2011) p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes. *Cell Death Differ* **18**: 948–958.
80. Di Girolamo N, Sarris M, Chui J, Cheema H, Coroneo MT, Wakefield D (2008) Localization of the low-affinity nerve growth factor receptor p75 in human limbal epithelial cells. *J Cell Mol Med* **12**: 2799–2811.
81. Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA, Pitaru S (2010) The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells* **28**: 984–995.
82. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Albers KM, Chen LH, Welker P, Paus R (2000) A role for p75 neurotrophin receptor in the control of apoptosis-driven hair follicle regression. *FASEB J* **14**: 1931–1942.
83. Botchkarev VA, Yaar M, Gilchrest BA, Paus R (2003) p75 Neurotrophin receptor antagonist retards apoptosis-driven hair follicle involution (catagen). *J Invest Dermatol* **120**: 168–169.
84. Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, Rochat A, Pietri T, Suter U, Zimmermann DR, Dufour S, Thiery JP, Meijer D, et al. (2006) Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol* **175**: 1005–1015.
85. Lambiase A, Aloe L, Mantelli F, Sacchetti M, Perrella E, Bianchi P, Rocco ML, Bonini S (2012) Capsaicin-induced corneal sensory denervation and healing impairment are reversed by NGF treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**: 8280–8287.
86. Martens W, Wolfs E, Struys T, Politis C, Bronckaers A, Lambrichts I (2012) Expression Pattern of Basal Markers in Human Dental Pulp Stem Cells and Tissue. *Cells, tissues, organs*.
87. Mikami Y, Ishii Y, Watanabe N, Shirakawa T, Suzuki S, Irie S, Isokawa K, Honda MJ (2011) CD271/p75(NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells Dev* **20**: 901–913.
88. Wen X, Liu L, Deng M, Zhang L, Liu R, Xing Y, Zhou X, Nie X (2012) Characterization of p75(+) ectomesenchymal stem cells from rat embryonic facial process tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **427**: 5–10.
89. Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J, Formstecher P, Bailliez Y, Polakowska RR (2008) Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev* **17**: 1175–1184.

90. Luukko K, Moshnyakov M, Sainio K, Saarma M, Sariola H, Thesleff I (1996) Expression of neurotrophin receptors during rat tooth development is developmentally regulated, independent of innervation, and suggests functions in the regulation of morphogenesis and innervation. *Dev Dyn* **206**: 87–99.
91. Mitsiadis TA, Couble P, Dicou E, Rudkin BB, Magloire H (1993) Patterns of nerve growth factor (NGF), proNGF, and p75 NGF receptor expression in the rat incisor: comparison with expression in the molar. *Differentiation* **54**: 161–175.
92. Cragolini AB, Huang Y, Gokina P, Friedman WJ (2009) Nerve growth factor attenuates proliferation of astrocytes via the p75 neurotrophin receptor. *Glia* **57**: 1386–1392.
93. Ibáñez CF, Simi A (2012) p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends Neurosci* **35**: 431–440.
94. Young KM, Merson TD, Sotthibundhu A, Coulson EJ, Bartlett PF (2007) p75 neurotrophin receptor expression defines a population of BDNF-responsive neurogenic precursor cells. *J Neurosci* **27**: 5146–5155.
95. Du Y, Fischer TZ, Clinton-Luke P, Lercher LD, Dreyfus CF (2006) Distinct effects of p75 in mediating actions of neurotrophins on basal forebrain oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* **31**: 366–375.
96. Guo J, Wang J, Liang C, Yan J, Wang Y, Liu G, Jiang Z, Zhang L, Wang X, Wang Y, et al. (2013) proNGF inhibits proliferation and oligodendrogenesis of postnatal hippocampal neural stem/progenitor cells through p75NTR in vitro. *Stem Cell Res* **11**: 874–887.
97. Hapner SJ, Boeshore KL, Large TH, Lefcort F (1998) Neural differentiation promoted by truncated trkC receptors in collaboration with p75(NTR). *Dev Biol* **201**: 90–100.
98. Kendall SE, Ryczko MC, Mehan M, Verdi JM (2003) Characterization of NADE, NRIF and SC-1 gene expression during mouse neurogenesis. *Brain Res Dev Brain Res* **144**: 151–158.
99. Lu J, Frerich JM, Turtzo LC, Li S, Chiang J, Yang C, Wang X, Zhang C, Wu C, Sun Z, et al. (2013) Histone deacetylase inhibitors are neuroprotective and preserve NGF-mediated cell survival following traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 10747–10752.
100. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**: 143–147.
101. Thomson TM, Rettig WJ, Chesa PG, Green SH, Mena AC, Old LJ (1988) Expression of human nerve growth factor receptor on cells derived from all three germ layers. *Exp Cell Res* **174**: 533–539.
102. Maeda S, Nobukuni T, Shimo-Onoda K, Hayashi K, Yone K, Komiya S, Inoue I (2002) Sortilin is upregulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization. *J Cell Physiol* **193**: 73–79.
103. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL (2002) Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* **30**: 783–791.
104. Yuan J, Huang G, Xiao Z, Lin L, Han T (2013) Overexpression of β -NGF promotes differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neurons through regulation of AKT and MAPK pathway. *Mol Cell Biochem*.

105. Russo MA, Giustizieri ML, Favale A, Fantini MC, Campagnolo L, Konda D, Germano F, Farini D, Manna C, Siracusa G (1999) Spatiotemporal patterns of expression of neurotrophins and neurotrophin receptors in mice suggest functional roles in testicular and epididymal morphogenesis. *Biol Reprod* **61**: 1123–1132.
106. Russo MA, Giustizieri ML, Farini D, Campagnolo L, De Felici M, Siracusa G (1996) Expression of the p75 neurotrophin receptor in the developing and adult testis of the rat. *Int J Dev Biol Suppl* **1**: 227S–228S.
107. Zhang L, Wang H, Yang Y, Liu H, Zhang Q, Xiang Q, Ge R, Su Z, Huang Y (2013) NGF induces adult stem Leydig cells to proliferate and differentiate during Leydig cell regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **436**: 300–305.
108. Colombo E, Romaggi S, Medico E, Menon R, Mora M, Falcone C, Lochmüller H, Confalonieri P, Mantegazza R, Morandi L, et al. (2011) Human neurotrophin receptor p75NTR defines differentiation-oriented skeletal muscle precursor cells: implications for muscle regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**: 133–142.
109. Mousavi K, Jasmin BJ (2006) BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation. *J Neurosci* **26**: 5739–5749.
110. Colombo E, Romaggi S, Blasevich F, Mora M, Falcone C, Lochmüller H, Morandi L, Farina C (2012) The neurotrophin receptor p75NTR is induced on mature myofibres in inflammatory myopathies and promotes myotube survival to inflammatory stress. *Neuropathol Appl Neurobiol* **38**: 367–378.
111. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, Randell SH, Hogan BLM (2009) Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 12771–12775.
112. Geerts A (2004) On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal? *J Hepatol* **40**: 331–334.
113. Rubbia-Brandt L, Mentha G, Desmoulière A, Alto Costa AM, Giostra E, Molas G, Enzan H, Gabbiani G (1997) Hepatic stellate cells reversibly express alpha-smooth muscle actin during acute hepatic ischemia. *Transplant Proc* **29**: 2390–2395.
114. Suskind DL, Muench MO (2004) Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34+ cytokeratin 7/8+ cells express markers for stellate cells. *J Hepatol* **40**: 261–268.
115. Cassiman D, Denef C, Desmet VJ, Roskams T (2001) Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* **33**: 148–158.
116. Passino MA, Adams RA, Sikorski SL, Akassoglou K (2007) Regulation of hepatic stellate cell differentiation by the neurotrophin receptor p75NTR. *Science* **315**: 1853–1856.
117. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M (2005) A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* **65**: 9328–9337.
118. Dirks P (2010) Cancer stem cells: Invitation to a second round. *Nature* **466**: 40–41.
119. Truzzi F, Marconi A, Lotti R, Dallaglio K, French LE, Hempstead BL, Pincelli C (2008) Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* **128**: 2031–2040.

120. Denkins Y, Reiland J, Roy M, Sinnappah-Kang ND, Galjour J, Murry BP, Blust J, Aucoin R, Marchetti D (2004) Brain metastases in melanoma: roles of neurotrophins. *Neuro-oncology* **6**: 154–165.
121. Marchetti D, McQuillan DJ, Spohn WC, Carson DD, Nicolson GL (1996) Neurotrophin stimulation of human melanoma cell invasion: selected enhancement of heparanase activity and heparanase degradation of specific heparan sulfate subpopulations. *Cancer Res* **56**: 2856–2863.
122. Boiko AD, Razorenova OV, van de Rijn M, Swetter SM, Johnson DL, Ly DP, Butler PD, Yang GP, Joshua B, Kaplan MJ, et al. (2010) Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* **466**: 133–137.
123. Eichhoff OM, Weeraratna A, Zipser MC, Denat L, Widmer DS, Xu M, Kriegl L, Kirchner T, Larue L, Dummer R, et al. (2011) Differential LEF1 and TCF4 expression is involved in melanoma cell phenotype switching. *Pigment Cell Melanoma Res* **24**: 631–642.
124. Touil Y, Zuliani T, Wolowczuk I, Kuranda K, Prochazkova J, Andrieux J, Le Roy H, Mortier L, Vandomme J, Jouy N, et al. (2012) The PI3K/AKT signaling pathway controls the quiescence of the low-Rhodamine123-retention cell compartment enriched for melanoma stem cell activity. *Stem Cells* **31**: 641–651.
125. Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, Basu D, Gimotty P, Vogt T, Herlyn M (2010) A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* **141**: 583–594.
126. Civenni G, Walter A, Kobert N, Mihic-Probst D, Zipser M, Belloni B, Seifert B, Moch H, Dummer R, van den Broek M, et al. (2011) Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Res* **71**: 3098–3109.
127. Søland TM, Brusevold IJ, Koppang HS, Schenck K, Bryne M (2008) Nerve growth factor receptor (p75 NTR) and pattern of invasion predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* **53**: 62–72.
128. Kiyosue T, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Hirano M, Jinno T, Toyoshima T, Kitamura R, Oobu K, Nakamura S (2011) Immunohistochemical location of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *International journal of clinical oncology / Japan Society of Clinical Oncology*.
129. Lewis Kelso R, Colome-Grimmer MI, Uchida T, Wang HQ, Wagner RF Jr (2006) p75(NGFR) immunostaining for the detection of perineural invasion by cutaneous squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg* **32**: 177–183.
130. Okumura T, Tsunoda S, Mori Y, Ito T, Kikuchi K, Wang TC, Yasumoto S, Shimada Y (2006) The biological role of the low-affinity p75 neurotrophin receptor in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**: 5096–5103.
131. Huang S-D, Yuan Y, Liu X-H, Gong D-J, Bai C-G, Wang F, Luo J-H, Xu Z-Y (2009) Self-renewal and chemotherapy resistance of p75NTR positive cells in esophageal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer* **9**: 9.
132. 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.

133. Descamps S, Pawlowski V, Révillion F, Hornez L, Hebbar M, Boilly B, Hondermarck H, Peyrat JP (2001) Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res* **61**: 4337–4340.
134. Dollé L, Oliveira M-J, Bruyneel E, Hondermarck H, Bracke M (2005) Nerve growth factor mediates its pro-invasive effect in parallel with the release of a soluble E-cadherin fragment from breast cancer MCF-7/AZ cells. *J Dairy Res* **72 Spec No**: 20–26.
135. Popnikolov NK, Cavone SM, Schultz PM, Garcia FU (2005) Diagnostic utility of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) as a marker of breast myoepithelial cells. *Mod Pathol* **18**: 1535–1541.
136. Verbeke S, Meignan S, Lagadec C, Germain E, Hondermarck H, Adriaenssens E, Le Bourhis X (2010) Overexpression of p75(NTR) increases survival of breast cancer cells through p21(waf1). *Cell Signal* **22**: 1864–1873.
137. Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V, Le Bourhis X, Boilly B, Peyrat JP, 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.
138. Kim J, Villadsen R, Sørli T, Fogh L, Grønlund SZ, Fridriksdottir AJ, Kuhn I, Rank F, Wielenga VT, Solvang H, et al. (2012) Tumor initiating but differentiated luminal-like breast cancer cells are highly invasive in the absence of basal-like activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 6124–6129.
139. Ibarra I, Erlich Y, Muthuswamy SK, Sachidanandam R, Hannon GJ (2007) A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. *Genes Dev* **21**: 3238–3243.
140. Imai T, Tamai K, Oizumi S, Oyama K, Yamaguchi K, Sato I, Satoh K, Matsuura K, Saijo S, Sugamura K, et al. (2013) CD271 defines a stem cell-like population in hypopharyngeal cancer. *PLoS ONE* **8**: e62002.
141. Biagiotti T, D’Amico M, Marzi I, Di Gennaro P, Arcangeli A, Wanke E, Olivotto M (2006) Cell renewing in neuroblastoma: electrophysiological and immunocytochemical characterization of stem cells and derivatives. *Stem Cells* **24**: 443–453.
142. 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.
143. Lee MY, Ryu JM, Lee SH, Park JH, Han HJ (2010) Lipid rafts play an important role for maintenance of embryonic stem cell self-renewal. *J Lipid Res* **51**: 2082–2089.
144. Yamazaki S, Iwama A, Morita Y, Eto K, Ema H, Nakauchi H (2007) Cytokine signaling, lipid raft clustering, and HSC hibernation. *Ann NY Acad Sci* **1106**: 54–63.
145. Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH (2003) Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* **181**: 115–129.
146. Campagnolo L, Russo MA, Puglianiello A, Favale A, Siracusa G (2001) Mesenchymal cell precursors of peritubular smooth muscle cells of the mouse testis can be identified by the presence of the p75 neurotrophin receptor. *Biol Reprod* **64**: 464–472.

147. Colombo E, Romaggi S, Mora M, Morandi L, Farina C (2012) A role for inflammatory mediators in the modulation of the neurotrophin receptor p75NTR on human muscle precursor cells. *J Neuroimmunol* **243**: 100–102.

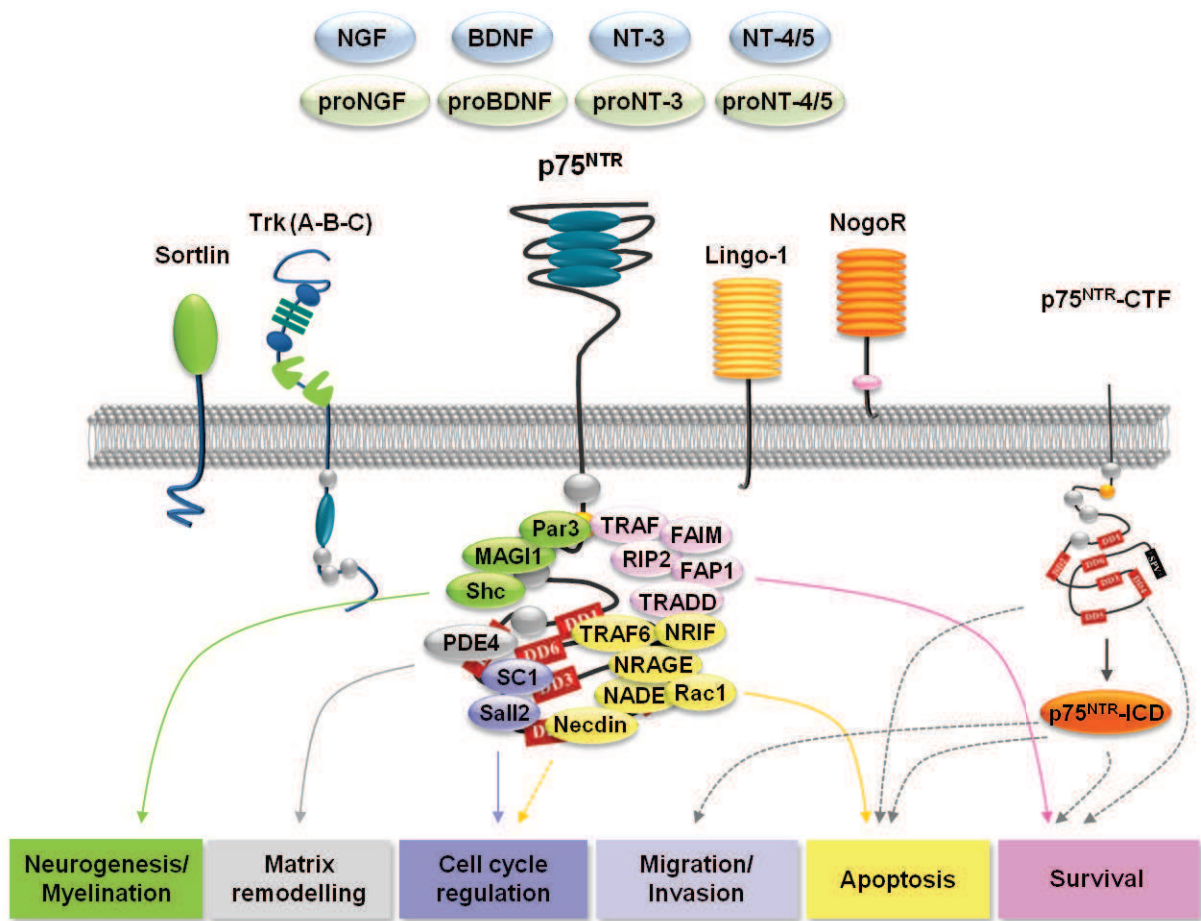


Figure 1. Schematic overview of p75^{NTR} interactions. p75^{NTR} can bind all neurotrophins and pro-neurotrophins, can dimerize, as well as interact with Trk receptors, sortilin, Nrg and Lingo1. The activation of different biological responses is mediated by intracellular proteins recruitment. p75^{NTR} cleavage may also induce a signalization mediated by the C-terminal fragment (CTF) or by the intracellular fragment (ICD) of the receptor, mainly leading to cell survival or apoptosis.

Table 1. p75^{NTR} expression and signaling in stem cells

Cell type	Model	Plasticity	Origin	Ligand	Co-receptor	Ref
Embryonic SC	mouse	totipotent	Blastocyst	NGF	TrkA	[62]
	human	totipotent	Blastocyst			TrkC
Neural crest	human	pluripotent	Neural crest	NGF, BDNF, NT-3		[64]
Esophageal keratinocytes SC	human	multipotent	Ectoderm			[130]
Laryngeal squamous SC	human	multipotent	Ectoderm			[78]
Epidermal keratinocytes	human	multipotent	Ectoderm			[79]
Corneal stromal and epithelial SC	mouse	multipotent	Neural crest			[80]
Oral mucosa SC	human	multipotent	Ectoderm			[81]
Dorsal Root Ganglion SC	rat	multipotent	Neural crest		NgR	[73]
Gut SC	human	multipotent	Neural crest			[74]
Sciatic nerve SC	rat	multipotent	Neural crest			[69]
Enteric neural SC	human, rodents	multipotent	Neural crest	NT-3	TrkC	[75]
Dental pulp SC	human	multipotent	Ectoderm	NGF		[87]
CNS neural SC	human, rat	multipotent	Ectoderm	NGF, NT-3, BDNF, proNGF		[94]
Mesenchymal SC	human, mouse	pluripotent/multipotent	Mesoderm		NgR, sortilin	[62]
Bone-marrow SC		multipotent	Mesoectoderm			[103]
Testis SC	human, mouse, rat	multipotent	Mesoderm	NGF, NT-3	TrkB	[146]
Skeletal muscle SC	human	multipotent	Mesoderm			[108,147]
Trachea epithelium SC	mouse	multipotent	Endoderm	NT-3		[111]
Hepatic stellate SC	human, rat	multipotent	Endoderm	NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5	TrkB, -C	[115]
Melanoma CSC	human	multipotent	Ectoderm	NGF		[122]
Oral squamous CSC	human	multipotent	Ectoderm			[127]
Esophageal squamous CSC	human	multipotent	Ectoderm			[130]
Breast CSC	human	multipotent	Ectoderm			[138]
Hypopharyngeal CSC	human	multipotent	Ectoderm			[140]
Neuroblasoma CSC	human	multipotent	Ectoderm			[141]

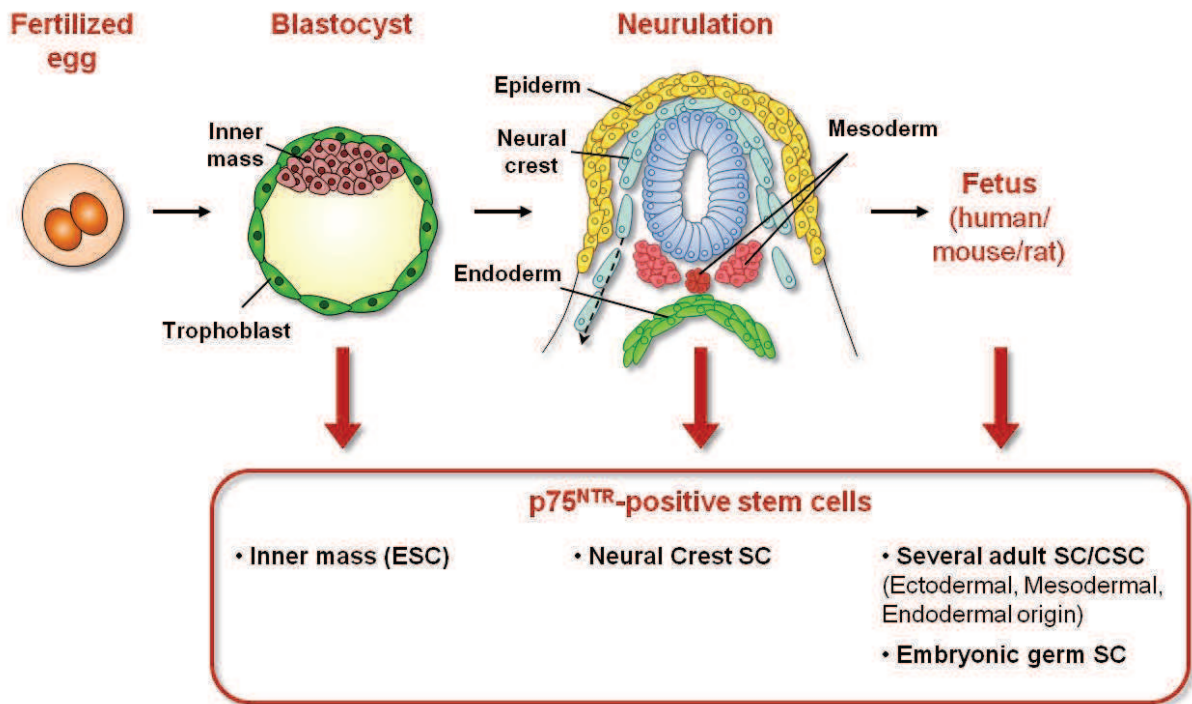


Figure 2. p75^{NTR}-positive stem cells are present in many cellular models, with different degrees of commitment. The fusion of gametes and formation of a diploid zygote determines the establishment of a multicellular embryo. Cells from the inner cell mass of the blastocyste (embyonic stem cells) present p75^{NTR} transcripts. p75^{NTR}-positive cells are present in multipotent migrating neural crest stem cells (here represented during neurulation stage), as well as in many fetal and post-natal tissues. It is worth noting that not only neural crest-derived tissues present a subset of p75^{NTR}-positive stem cells, demonstrating a more primitive origin of these cells.

D. Objectifs de la thèse

La thématique générale de l'unité 908 est d'étudier le rôle des neurotrophines dans le cancer du sein. Ces dernières années, notre laboratoire a pu démontrer que plusieurs neurotrophines et proneurotrophines, dont le NGF, le proNGF, le BDNF et la NT4/5, sont surexprimées et sécrétées par les cellules cancéreuses mammaires. Ces facteurs exercent des actions autocrines sur les cellules de cancer du sein. En particulier, le NGF exerce des effets mitogènes, anti-apoptotiques et pro-invasifs *in vitro* comme *in vivo* par l'intermédiaire des récepteurs TrkA et p75^{NTR} (Adriaenssens et al., 2008; Com et al., 2007; Descamps et al., 1998, 2001a). De la même façon, le proNGF peut stimuler l'invasion des cellules de cancer du sein (Demont et al., 2012).

Les études récentes ont permis d'octroyer un rôle grandissant aux cellules souches cancéreuses (CSC) dans le développement tumoral. Ces cellules, résistantes aux agents thérapeutiques, sont une des causes principales des métastases et des récives chez les patients atteints de cancer. Ce travail est réalisé grâce à l'interaction entre l'Inserm U908 et l'équipe 4 de l'Unité 837, portant sur le ciblage moléculaire et cellulaire des cellules souches tumorales dormantes dans le mélanome malin (Touil et al., 2012). En effet, nous avons formulé l'hypothèse que le NGF et/ou le proNGF pouvaient constituer une partie intégrante de la niche des cellules souches cancéreuses de sein, avec une action directe sur le développement et le phénotype tumoral.

Lorsque j'ai démarré ma thèse le phénotype des CSC de sein peu était connu et rien n'était décrit sur l'implication des neurotrophines sur les cellules souches cancéreuses. Cependant, p75^{NTR}, récepteur commun aux neurotrophines et aux proneurotrophines, avait déjà été identifié comme un facteur clé dans le maintien des cellules souches dans plusieurs modèles, notamment dans les cellules souches de la crête neurale. L'expression de p75^{NTR} par les cellules souches laissait ouverte l'hypothèse du rôle potentiel des neurotrophines dans ce compartiment cellulaire. Dans ce contexte, le premier axe de mon travail de thèse consistait à caractériser *in vitro* et *in vivo* les effets du NGF et du proNGF sur les deux populations composant le compartiment des cellules souches : les cellules quiescentes (*long-term stem cells*) et les cellules souches activées (*short term stem cells*). Nos travaux ont permis de mettre en évidence que le NGF et le proNGF agissent sur les CSC en régulant la balance entre quiescence et prolifération. De plus, le NGF, et non le proNGF,

Introduction

est capable d'induire une transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules cancéreuses après injection chez la souris.

Enfin, une deuxième partie de ma thèse a contribué à mettre en lumière le rôle du clivage du récepteur p75^{NTR} dans le mécanisme de survie cellulaire. p75^{NTR} est un récepteur complexe dont toutes les fonctions n'ont sûrement pas été découvertes. Ici, nous avons pu démontrer qu'un premier clivage du récepteur, réalisé par l'enzyme ADAM17/TACE, est fondamental dans l'effet anti-apoptotique de p75^{NTR}.

Résultats

A. Etude des effets du NGF et du proNGF sur les cellules souches cancéreuses de sein

Dans le but d'évaluer les effets du NGF et de son précurseur, le proNGF, sur les cellules souches cancéreuses mammaires nous avons analysé l'action de ces neurotrophines sur différentes propriétés biologiques intrinsèques aux cellules souches, dont la capacité d'autorenouvellement et la quiescence.

- *Analyse de l'autorenouvellement des CSC mammaires par la culture en mammosphères*

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la formation de sphères est une méthode de culture *in vitro* couramment utilisée pour évaluer le pourcentage des cellules souches dans une population et, en parallèle, pour enrichir la population cellulaire en cellules souches et empêcher leur différenciation. En effet, seules les cellules souches sont capables de survivre dans ces conditions très sélectives (milieu dépourvu de sérum, absence d'ancrage) et de proliférer sous forme de sphères. En théorie, une sphère se forme à partir d'une cellule souche. Ainsi, le pourcentage de sphères obtenu par rapport au nombre de cellulesensemencées représente de façon indirecte le pourcentage des cellules souches dans la population initiale.

Ces conditions de culture sélectives ont été optimisées à l'origine pour la culture des cellules souches neuronales. En particulier, l'ajout de l' EGF et du bFGF dans le milieu a montré des effets positifs sur le maintien de l'autorenouvellement des cellules souches, alors que leurs absence induit la différenciation (Reynolds and Weiss, 1996). Depuis, ce milieu de culture contenant de l'EGF et du bFGF représente la condition « standard » pour la formation de sphères dans de nombreux modèles cellulaires, dont les cellules mammaires normales et cancéreuses (Dontu et al., 2003b; Smart et al., 2013).

Nous avons donc comparé les effets du NGF et du proNGF sur la formation de mammosphères à celui de la condition « standard ». Ces analyses nous ont permis de montrer que le NGF, tout comme le proNGF, favorisent la formation de mammosphères et par conséquent, l'enrichissement de la population de cellules cancéreuses en CSC.

- *Analyse des effets sur la population quiescente des CSC mammaires*

Pour étudier l'action du NGF et du proNGF sur les différentes populations des cellules souches, nous avons développé un outil d'analyse cellulaire permettant l'individualisation et l'isolement des cellules quiescentes. Notre approche est basée sur une sélection après transfection des cellules cancéreuses de sein exprimant stablement une protéine de fusion entre l'histone 2B (H2B) et la GFP (*Green Fluorescent Protein*). L'expression de cette protéine est induite par un traitement de 24h à la tétracycline et nous permet de suivre les divisions cellulaires qui se traduisent par une perte progressive de la fluorescence. Ainsi nous avons pu observer l'action du NGF et du proNGF sur la mise en place d'un équilibre entre la quiescence et la prolifération.

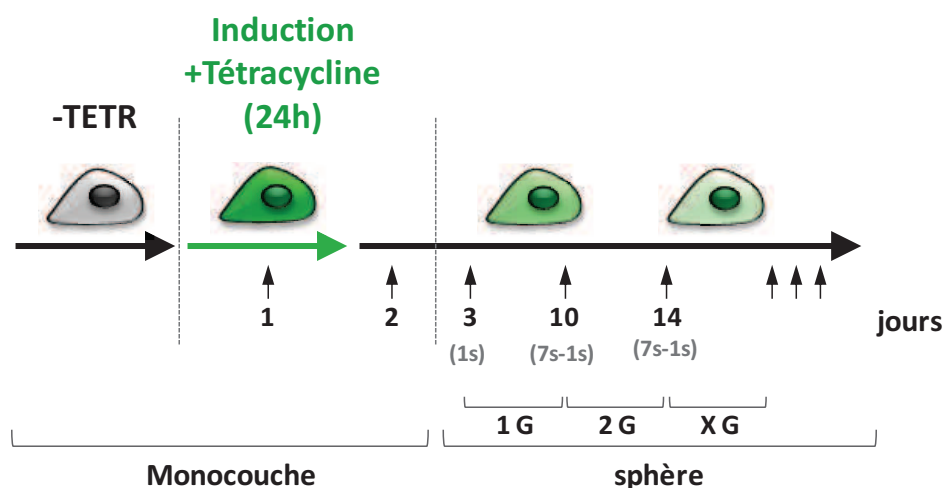


Figure 28. L'outil d'analyse cellulaire histone 2B-GFP

Les cellules des lignées de cancer du sein exprimant de façon stable une protéine de fusion entre l'histone 2B et la GFP ont été établies. Un traitement de 24 h à la tétracycline induit l'expression de cette protéine de fusion en toutes les cellules, ce qui permet de suivre les divisions cellulaires et d'isoler les cellules n'ayant peu ou pas proliféré (cellules en lente prolifération ou cellules quiescentes). L'induction est faite en monocouche et la dilution de la GFP a été évaluée, selon l'expérience, après 7 jours en monocouche ou après une semaine en culture de sphères (cellules ensemencées 2 jours après l'induction en monocouche).

- *Analyse de la signalisation induite par le NGF et le proNGF dans les CSC mammaires*

Pour comprendre par quels mécanismes moléculaires le NGF et le proNGF induisent leurs effets, nous avons d'abord évalué leur action sur l'expression de plusieurs marqueurs des CSC, impliqués dans la résistance (ALDH), dans le maintien de la pluripotence (Sox-2, Oct-4, Nanog, c-Myc), ainsi que des marqueurs des CSC mammaires (CD44⁺/CD24⁻). De

plus, nous nous sommes attachés à déterminer l'implication du récepteur p75^{NTR} dans la signalisation du NGF et du proNGF.

Pour approfondir l'étude sur l'action du NGF et du proNGF nous avons ensuite comparé les effets induits par un traitement à court terme (une semaine) aux effets induits par cinq mois de traitement au NGF et au proNGF. Le choix de ces deux traitements est lié au fait que les cellules souches demeurent pour la plupart dans un état de quiescence, probablement lié à une inactivation de l'appareil transcriptionnel et à la présence des marques épigénétiques particulières (Liu et al., 2013). C'est pourquoi, lorsqu'on évalue les effets de certains composés sur ces cellules, on peut supposer qu'un traitement plus long puisse représenter de façon plus physiologique ce qui se passe dans l'organisme.

Ces résultats sur la signalisation induite par le NGF et son précurseur sur le CSC mammaires constituent une partie des résultats de mon article principal et le reste est présenté sous forme de résultats complémentaires à l'article.

- *Analyse des effets in vivo du prétraitement au NGF et au proNGF*

Le test fonctionnel le plus répandu pour valider un enrichissement en CSC consiste en leur injection dans des modèles *in vivo*. Pour cela, nous avons injecté 2×10^5 cellules de chaque condition de traitement en souris SCID et nous avons évalué leur action sur la tumorigenèse, sur la croissance tumorale, sur le développement de métastases ainsi que sur le phénotype tumoral.

**Article 1 : p75^{NTR} is involved in NGF- and proNGF-induced breast cancer
stem cell enrichment**

p75^{NTR} is involved in NGF- and proNGF-induced breast cancer stem cell enrichment

Elisa Tomellini^{1,2}, Yasmine Touil³, Chann Lagadec^{1,2}, Nathalie Ziental-Gelus^{1,2}, Justine Legrand^{1,2}, Eric Adriaenssens^{1,4}, Renata Polakowska^{3*} and Xuefen Le Bourhis^{1,2*}

¹Université Lille 1, 59650, Villeneuve d'Ascq, France

²Inserm U908, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

³Inserm U837 Jean-Pierre Aubert Research Center, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), 59045 Lille, France

⁴CNRS UMR 8161, Institut Pasteur de Lille, 59800 Lille, France

***Corresponding authors:** Xuefen Le Bourhis, Inserm U908, Batiment SN3, Université Lille 1, 59650 Villeneuve d'Ascq, France. Phone: 33 (0)3 20 43 40 97; Fax: 33 (0)3 20 43 40 38; Email: xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr and Renata Polakowska INSERM U837, 1 Place de Verdun, 59045 Lille, France; Phone:33(0)320622062; Fax: 33(0) 320169229 ; E-mail: renata.polakowska@inserm.fr

Key words: NGF, proNGF, p75^{NTR}, breast cancer stem cells.

ABSTRACT

The discovery of cancer stem cell (CSC) is giving a fundamental benefit to understand the mechanisms of breast cancer development. However, stimuli that control breast CSC self-renewal and differentiation are still poorly detailed and the multifactorial nature of breast carcinogenesis as well as the cellular and molecular diversity within tumors, have prevented the development of targeted strategies that can be widely applied to CSC. We have previously shown that Nerve Growth Factor (NGF) and its active precursor proNGF can stimulate breast cancer cell growth and invasion in an autocrine manner. In this study, we investigated whether NGF and proNGF have any effect on the breast CSC compartment. We demonstrated that NGF or proNGF induced an enrichment of CSC in several breast cancer cell lines. Inhibition of p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) by siRNA drastically reduced NGF- and proNGF-induced sphere formation. Moreover, CSC enrichment by NGF and pro-NGF was associated with an increase of quiescent subset. Tumorigenicity assays in SCID mice showed that cells derived from mammospheres pre-treated with NGF or proNGF affect tumor growth more than the control condition. Interestingly, mice injected with cells pre-treated with NGF developed more metastases in brain, lung and liver than pro-NGF or EGF/bFGF conditions. EMT analysis for cells from dissociated primary tumors showed that only NGF pre-treated cells injected in mice went through the transition, suggesting that NGF and proNGF might select for different breast CSC subtypes.

Together, our results suggest that NGF and proNGF could act on the CSC pool, by regulating the balance between quiescence and proliferation *via* different signaling pathways, both implicating p75^{NTR} receptor.

INTRODUCTION

Despite advances in early detection of cancer, relapse still occurs in a significant percentage (20-30 %) of patients with early stage of breast cancer. In general, an incomplete elimination of tumoral cells is the cause of relapse after treatment. These data highlight the necessity of new therapeutic approaches based on a better comprehension of the mechanisms controlling tumorigenesis, metastasis and drug resistance. In the last few years, numerous experiments demonstrated the existence of a hierarchical organisation of cells within tumours [1]. “Cancer stem cells” (CSC) are at the origin of tumour development, and compose a subset of cells with unlimited self renewal ability and relative resistance to classical therapies, which usually target highly proliferating cells [2,3]. Development, homeostasis and cancerogenesis of the mammary epithelium are controlled by several factors including growth factors, playing an important role by modulating proliferation, survival and migration of epithelial cells [4,5]. Nerve growth factor (NGF), the prototypical member of the neurotrophin family, is well known for its role in the development and regeneration of the sympathetic and sensory nervous systems. More recently, we have shown that NGF is overexpressed in the majority of human breast tumors, where it exerts pro-mitotic, anti-apoptotic and pro-invasive effects [6–8]. Consistently, the inhibition of NGF expression can results in a reduced tumour growth in SCID mice [9]. NGF is generated from the enzymatic processing of its precursor (proNGF), intracellularly by furin, or extracellularly by plasmin and by several matrix metalloproteases [10]. However, proNGF is also able to exert its own biological effects [11,12]. ProNGF was shown to induce neuronal death by apoptosis whereas mature NGF induced survival and differentiation [11]. More recently, we have shown that proNGF is secreted as well by breast cancer cells and exerts a pro-invasive effect [13]. NGF and proNGF initiate different responses by their binding to both common and different receptors. NGF exerts its biological

effect *via* p75^{NTR} and TrkA receptors. In neuronal cells, proNGF has been shown to induce its effects through trimeric complexes formed mainly with p75^{NTR} and sortilin [14], and less frequently with TrkA and sortilin [15]. In breast cancer cells, we showed that the pro-invasive effect of proNGF is mediated by TrkA and sortilin but not p75^{NTR} [13].

Given that NGF and proNGF are both secreted by breast cancer cells, they could therefore be important components of the breast CSC niche to regulate breast CSC biology. Indeed, p75^{NTR}, the common receptor of neurotrophins and pro-neurotrophins, is expressed in various types of stem cells and is used alone or in combination with other markers to enrich for neural crest stem cells [16], mesenchymal stem cells [17] as well as for stem cells in several regenerative epithelia, like esophageal keratinocytes [18], laryngeal squamous epithelial cells [19], oral [20], epidermal [21] and corneal keratinocytes [22]. Moreover, p75^{NTR} was recently shown to mark cells endowed with self-renewal and multipotent capacity in some breast cancer cell lines and primary tumor-derived cells [23]. However, nothing is known about how NGF and proNGF affect breast cancer stem cell fate. In this work, we evaluated the influences of NGF and proNGF on the stem cell compartment as well as the consequences on tumor development. We found that both NGF and proNGF could extend CSCs compartment *via* p75^{NTR}. However, analysis of cells from dissociated tumors regrafted in mice showed that only NGF pre-treated cells underwent epithelial-to-mesenchymal transition, suggesting that NGF and proNGF might select for different breast CSC subtypes.

RESULTS

NGF and proNGF enrich for breast cancer stem cells (CSC)

NGF and proNGF are secreted by breast cancer cells [13,24], on which they act through an autocrine loop to promote survival, proliferation and invasion. With the objective to determine whether these growth factors influence breast cancer stem cells biology we have grown MCF-7, T47D and BT-20 breast cancer cell lines under anchorage-independent conditions in a serum-free defined media as previously described [25,26]. In these conditions, CSCs are able to proliferate and grow as spheres (mammospheres). Cells were cultured in spheres in presence of neurotrophins at a concentration of 200 ng/ml (NGF) or 12.5 ng/ml (proNGF), concentrations generally used to elicit an effect from neurotrophins-responsive cells. Non-cleavable proNGF (from Alomone lab) was used here to ensure that no NGF would be generated from proNGF. We showed that NGF and proNGF increased the percentage of MCF-7 cells able to form stem cell-derived spheres, when compared to the control culture grown in standard condition without serum but supplemented with EGF and bFGF (Figure 1A). The increase of CSC pool was confirmed by 3 consecutive generations of sphere forming capacity. Similar results were obtained for BT-20 and T47D cell lines (supplementary data Figure S1). We then analyzed the ability of cells derived from spheres to form colonies in monolayer conditions (serum-containing media), a functional assay reflecting the fraction of both stem cells and more-lineage restricted progenitors, able to initiate a colony. No significant difference was observed in cells derived from spheres of first generation (supplementary data Figure S2a). However, more colonies were formed by cells from spheres of second and third generations cultured in the presence of NGF or proNGF. In addition, large size colonies seemed to be more numerous under proNGF treatment. As the size of a colony reflects the

proliferative potential of colony-initiating cells, it can suggest that proNGF might mainly enrich for CSC while NGF mainly for their progenitors (supplemental Figure S2b).

A complementary approach to quantify the stem cell population is the evaluation of aldehyde dehydrogenase-1 (ALDH1) activity, a detoxifying enzyme involved in intracellular retinoic acid production, highly active in mammary normal and cancer stem cells [27,28]. ALDH enzyme has been shown to play important functional roles in breast normal and cancer stem cells and is considered a good marker of activated (Ki67⁺) breast cancer stem cells [29]. In addition, high ALDH1 expression has been shown to correlate with poor prognosis in breast cancer patients [30]. ALDH1 activity was assessed using the ALDEFLUOR flow cytometry assay in 3 spheres generations of MCF-7, BT-20 and T47D breast cancer cell lines. NGF and proNGF increased the ALDH1 activity in all the three tested cell lines (Figure 1B, Supplementary Figure S3). In particular, in the second generation of spheres NGF and proNGF increased 2-4 times the number of ALDH1 positive cells, shifting from 0.2-0.5 % in EGF bFGF-treated cells to 0.8-1 %.

Given the CSC enrichment induced by NGF and proNGF, we then studied the expression of stem cell markers in the first generation of spheres formed by MCF-7 cells. Sox2, Nanog and Oct3/4 are transcription factors that act cooperatively to maintain embryonic stem cells, by blocking differentiation and controlling the expression of a set of target genes required for stem cell pluripotency [31,32]. Several tumor cell types have been shown to express various embryonic stem cell markers as well, indicating that the interaction of the same transcription factors is required for CSC regulation [33,34].

As shown in Figure 1C, both NGF and proNGF increased the protein levels of Sox2 and ALDH1. The increase of ALDH1 well correlates with the increased enzymatic activity evaluated by ALDEFLUOR assay. Moreover, phosphorylation of β -catenin at Ser675 was also increased by NGF and proNGF; consistently with the findings that phospho β -catenin is

accumulated in the nucleus to exert its transcriptional activity to control stem cells fate [35,36]. Expression of other pluripotency factors, c-Myc and Nanog, was only slightly modified by NGF and proNGF treatment, while no effect was observed on Oct3/4 expression (Figure 1C).

p75^{NTR} is involved in CSC enrichment

As stated before, NGF and proNGF can partially mediate their regulatory effects through a common p75^{NTR} receptor, a known neural crest stem cell marker, also defining stem cell population in several other human tissues [17,18]. These observations make p75^{NTR} a valuable mediator of NGF and proNGF effects on breast CSC. In order to evaluate how NGF and proNGF regulate the CSCs population, we investigated the effects of p75^{NTR} on sphere forming capacity and stem cell markers expression by using siRNA approach. As shown in Figure 2A, 48h after transfection of cells with siRNA against p75^{NTR}, p75^{NTR} was strongly down-regulated. We then grew cells in mammosphere culture conditions for 7 days to evaluate their sphere forming capacity. p75^{NTR} knock-down totally abolished the NGF and proNGF-enhanced sphere forming capacity of MCF-7 cells and also significantly reduced this capacity in the control culture (EGF bFGF) (Figure 2B). This indicate that p75^{NTR} could be involved in CSC enrichment even in the absence of exogenous neurotrophins.

We then collected RNAs from 1-week old mammospheres to analyze the expression of pluripotency factors including Sox2, Oct3/4, c-Myc and Nanog (Figure 2C). While NGF increased the expression of Sox2, c-Myc, and Nanog, inhibition of p75^{NTR} by siRNA prevented it. Interestingly, proNGF induced an increased of Sox2, but this increased seemed to be independent from p75^{NTR} (Figure 2C). Consistently, with Western blot results, Oct3/4 expression doesn't seem to be affected by NGF and proNGF treatments. Furthermore, NGF treatment increased the expression of the EMT-associated transcription factor Slug in a p75^{NTR}-dependent manner (Figure 2C).

Together, these results suggest that although p75^{NTR} is involved in CSC enrichment, it might elicit different molecular events *via* the activation of different signalling pathways, dependent of its ligands.

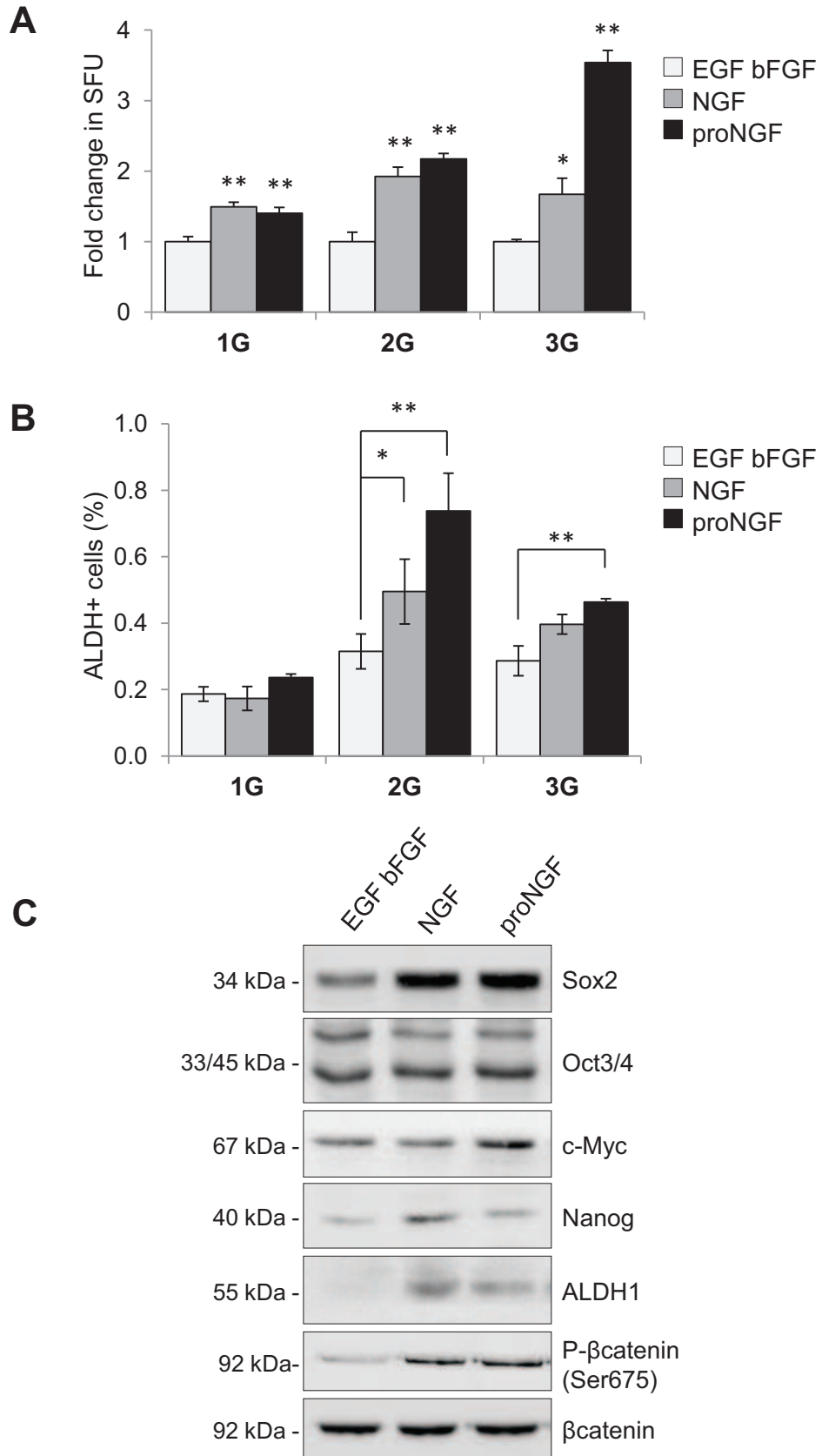


Figure 1

FIGURE LEGEND

Figure 1. Effects of NGF and proNGF on breast cancer stem cells. (A): Fold increase in mammosphere formation relative to control EGF bFGF. Fraction of MCF-7 breast cancer cells capable to form mammospheres for 3 spheres generations (G). The analysis was performed in triplicate in 3 independent experiments, counted spheres with a size higher than 40 μm . **(B):** Graphs illustrating flow cytometry analysis of ALDH activity assessed by ALDEFLUOR[®] assay kit using MCF-7 breast cancer cells from first, second and third generations of MCF-7 spheres. The analysis revealed an increase in the ALDH⁺ fraction in response to NGF and proNGF treatment. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. **(C):** Cells from first generation of MCF-7 spheres were lysed and subjected to Western blot analysis using the indicated primary antibodies.

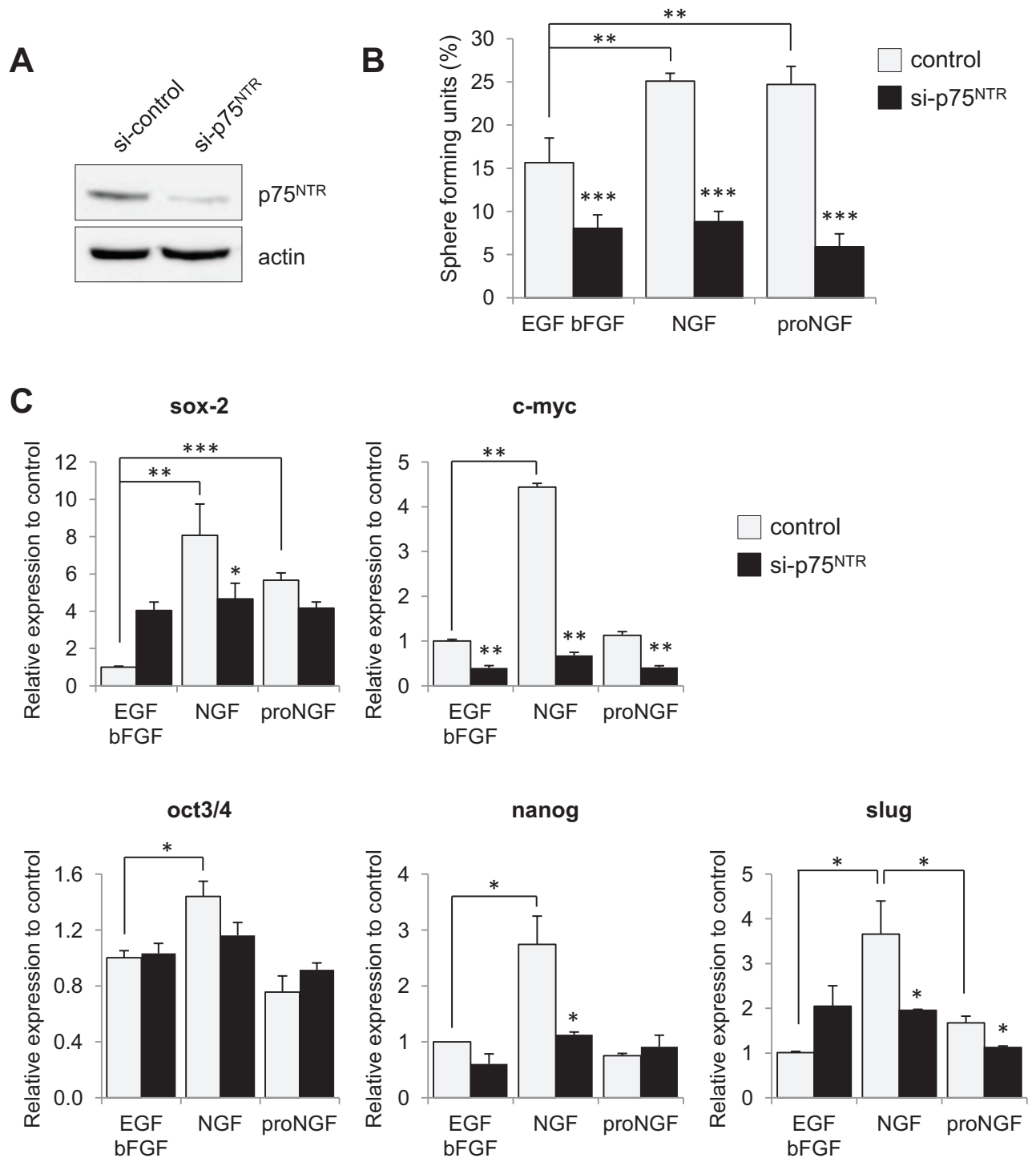


Figure 2

FIGURE LEGEND

Figure 2. p75^{NTR} implication in sphere formation and expression of stem cell markers.

(A): Endogenous p75^{NTR} was selectively knocked down by siRNA. Efficiency of siRNA against p75^{NTR} (48h after transfection on monolayer cells) was shown by Western blot. **(B):** si-p75^{NTR} cells were seeded in suspension culture for one week and the percentage of sphere forming units in presence of EGF bFGF, NGF or proNGF was compared to the control condition (si-GFP). **(C):** Sox2, c-Myc, Oct3/4, Nanog and Slug expression evaluated by RT-qPCR on RNA from si-p75^{NTR} and si-control mammospheres, grown in EGF bFGF, NGF or proNGF for one week. * p<0.05; ** p<0.001; *** p<0.0001.

NGF and proNGF can regulate the balance between quiescence and proliferation in breast CSC

To investigate the mechanisms by which NGF and proNGF could modulate the CSCs compartment, we used a cellular tool allowing the identification and the isolation of quiescent and slow-proliferating CSCs. Quiescence is a prerequisite for maintenance of the CSC pool necessary for tumor development and persistence, as well as one of the leading features conferring CSC resistance to conventional chemotherapy [37] and radiotherapy [38], targeting mainly proliferating cells. This *in vitro* approach is based on similar principles used by Tumber et al. in their *in vivo* studies and described elsewhere (manuscript in preparation). This approach, which relies on a tetracycline-inducible expression of histone 2B-GFP (Green Fluorescent Protein) fusion protein (“pulse”) and a progressive loss of GFP fluorescence with each cell division during the “chase” period, monitors a division history of a cell. Retention of GFP fluorescence translates into lack of proliferation. We determined that 24 h of tetracycline treatment induced GFP expression in >95% of cells. In order to evaluate if NGF and proNGF might have an action on the quiescent CSC compartment, an equal amount of GFP^{high} and GFP^{neg} cells were FACS-sorted from monolayer MCF7-H2B cells 7 days after tetracycline-induction. We first sought to correlate GFP^{high} phenotype with stemness by comparative study of mRNA encoding stem cell markers extracted from GFP^{high} and GFP^{neg} sorted cells. We confirmed that slow-cycling (GFP^{high}) cells were enriched Sox2, Oct3/4 and CD44 (Figure 3A). Interestingly, GFP^{high} cells also expressed higher levels of p75^{NTR} transcripts, but not TrkA when compared to the GFP^{neg} counterparts, suggesting that this receptor, and apparently not TrkA, may mediate NGF and proNGF signals to the quiescent CSC compartment. Sphere formation assay with sorted cells revealed that in contrast to GFP^{neg} cells, the GFP^{high} fraction had markedly high capacity to form spheres. NGF and proNGF significantly increased the sphere forming unit values in the GFP^{high} subset, when compared to the control condition

(Figure 3B), implying that GFP^{high} cells have CSC attributes and that NGF and proNGF could expand their pool.

Cells with highly different intensities of GFP fluorescence were observed in dissociated first generation spheres after 10 days of chase without tetracycline, suggesting the presence of different sub-populations with different proliferative rates within spheres. Flow cytometry analysis of sphere cells revealed that NGF and proNGF treated cultures maintained twice as much GFP highly positive cells than control cultures (20% vs 10% in first sphere generation) (Figure 3C and D). Similar results were obtained with BT-20 and T47D cell lines (Figure 3C). Cell cycle analysis of double propidium iodide and Ki67 stained cells showed that NGF and, especially, proNGF treatments increased the percentage of quiescent, Ki67-negative cells within spheres (Supplementary figure S4). These results indicate that NGF and proNGF treatments enrich for the quiescent CSC subpopulation.

Asymmetric cell divisions is a key features of stem cells, which guarantees the generation of a differentiated progeny with the simultaneous maintenance of a stem cell pool [39,40]. This pool can expand by stem cell symmetric division during development or if tissue homeostasis is lost after injury. A tight regulation of asymmetrical/symmetrical stem cells divisions operating in normal tissue is apparently perturbed in cancer [41]. An important asymmetry and cell fate determinant is Numb, an inhibitor of Notch signalling [42]. Numb is down-regulated in NGF and proNGF treated cultures, as revealed by Western blot and flow cytometry analysis (Figure 3E and F). Also expression of Cyclin D2, another asymmetrically portioned during stem cell division factor [43,44], was equally decreased (Figure 3E). This confirms perturbation in expression of asymmetric cell division (ACD)-related genes by NGF and proNGF in breast cancer cell lines and suggests that NGF and proNGF promote expansion of the CSC pool by symmetric self renewal.

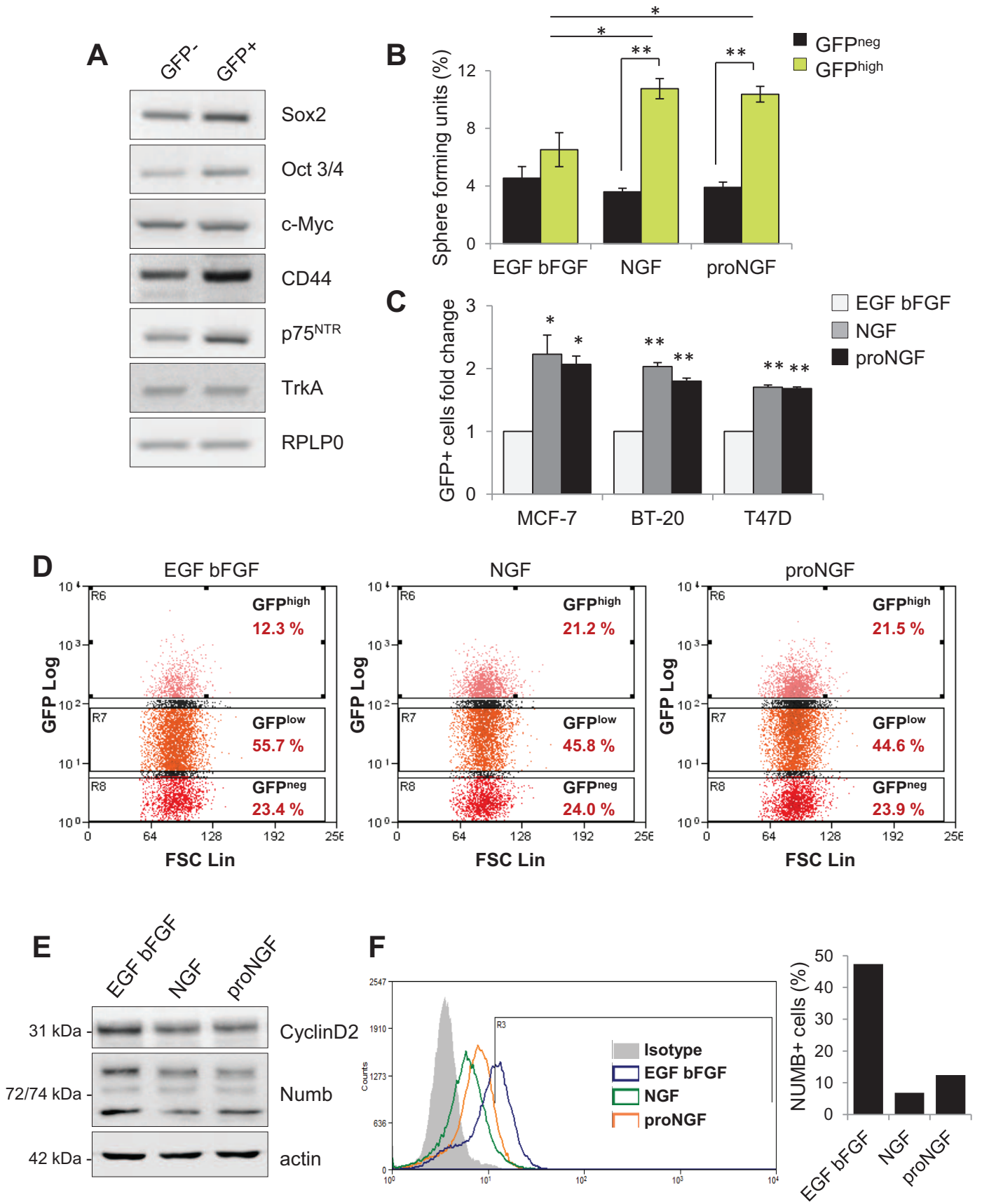


Figure 3

FIGURE LEGEND

Figure 3. Effects of NGF and proNGF on the balance between quiescence and proliferation of breast CSCs. (A): RT-PCR analysis of mRNA from sorted GFP^{high} and GFP^{low} MCF-7 cells cultured in monolayer for 7 days after GFP induction by Tetracyclin. **(B):** Sphere forming unit assay of FACS sorted GFP^{high} and GFP^{low} cells from monolayer MCF-7 cells, 2 weeks after tetracycline pulse (one week in monolayer and one week in suspension). **(C):** Fold change in GFP^{high} proportion of cells in MCF-7, BT-20 and T47D cells from the first generation of spheres, 10 days after tetracycline pulse (3 days in monolayer and 7 days in suspension). **(D):** FACS distribution of GFP^{high}, GFP^{low} and GFP^{neg} MCF-7 cells. Note an accelerated H2B-GFP loss in EGF bFGF treated spheres. **(E):** Western blot analysis of protein extracts from first generation of MCF-7 spheres. **(F):** Flow cytometry evaluation of Numb expression in first generation of MCF-7 spheres. * p<0.05; ** p<0.001.

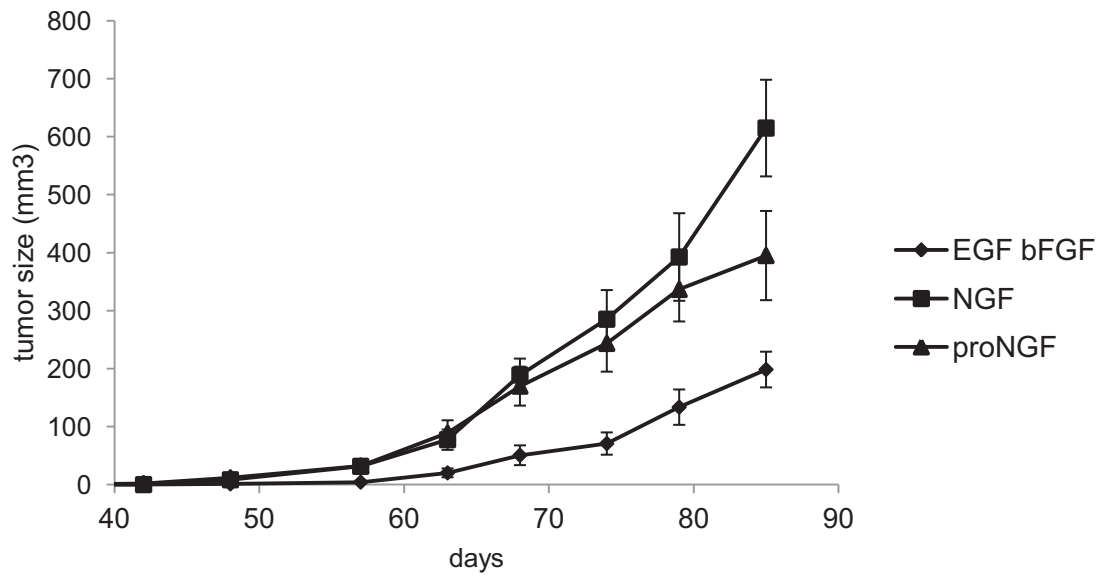
NGF and proNGF differentially affect tumor growth and metastasis in SCID mice

In order to investigate whether NGF and proNGF enrichment in CSC observed *in vitro* is correlated with an increased tumor growth *in vivo* in SCID mice, we subcutaneously injected 2×10^5 MCF-7 cells derived from first generation spheres. From day 50, tumors derived from NGF or proNGF pre-treated cells grew significantly faster than the control. Tumor latency seemed to be decreased as well (Figure 4A and B). We then evaluated distant metastasis formation by RT-qPCR analysis of human $\beta 2$ -microglobulin of brain, lung and liver [45]. Cells pre-treated with NGF more readily develop metastases in brain, lung and liver compared to cells in other conditions (Figure 4B). Taken together, these results showed that although NGF and proNGF exerted similar effects in primary tumor formation, NGF was more efficient in promoting metastasis.

NGF pre-treatment selects for CD44^{high}/CD24^{low} cells

To evaluate if the enhanced metastatic phenotype induced by NGF was due to the selection of a specific subset of the mammary CSC, we analyzed cells from dissociated tumors originating from EGF bFGF, NGF or proNGF treated mammospheres, from now on called, respectively, t-EGF FGF, t-NGF and t-proNGF. Cells from all tumors maintained their ability to form spheres (Figure 5A and B); t-NGF cells formed more and bigger spheres than t-EGF FGF and t-proNGF (Figure 5A and B). Moreover, t-NGF cells exhibited a more spindle-like shape in monolayer cultures (Figure 5A). Previous studies have shown that breast cancer stem cells have CD44^{high}/CD24^{low} phenotype [1]. This phenotype highly correlates with enhanced metastatic potential and poor prognosis for patients with breast cancer [46]. We therefore determined the potential modification of CD44^{high}/CD24^{low} phenotype of MCF-7 breast cancer cells following tumor formation in mice. In agreement with previous reports [47],

spheres of native MCF-7 cells contained less than 1% of CD44^{high}/CD24^{low} cells, independently from the culture condition. On the contrary, spheres formed by xenograft-derived tumor cells exhibited an increased CD44^{high}/CD24^{low} subpopulation in all the three conditions with the strongest increase observed in t-NGF cells-derived spheres (45 % of CD44^{high}/CD24^{low} cells vs 20 % in t-EGF FGF and t-proNGF) (Figure 5C). These results indicate that NGF pretreatment of cells grown in spheres favors the selection of a more aggressive CD44^{high}/CD24^{low} subpopulation.

A**B**

Condition	Frequency of tumor outgrowth	Latency (days)	Lung metastasis	Liver metastasis	Brain metastasis
EGF bFGF	6/6	65 ± 9.6	1/3	0/3	2/3
NGF	6/6	51 ± 6	3/3	2/3	3/3
proNGF	6/6	47.5 ± 3.6	1/3	0/3	1/3

Figure 4

FIGURE LEGEND

Figure 4. NGF and proNGF pre-treated cells favour tumor growth in SCID mice. (A): Size of tumors generated in SCID mice by cells dissociated from spheres of first generation under different conditions (EGF bFGF, NGF or proNGF). **(B):** tumor latency of injected cells. and evaluation of metastatic cells in lung, liver and brain. Human cells among mouse tissues were detected by qPCR using human specific β -microtubulin probes as described [45].

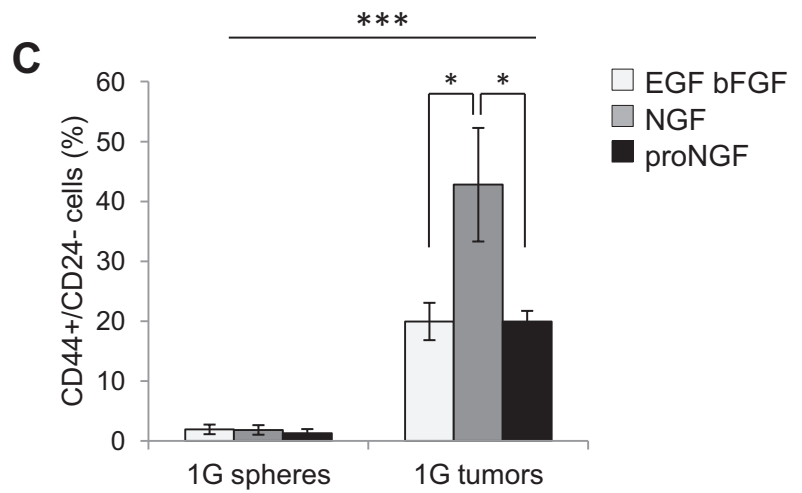
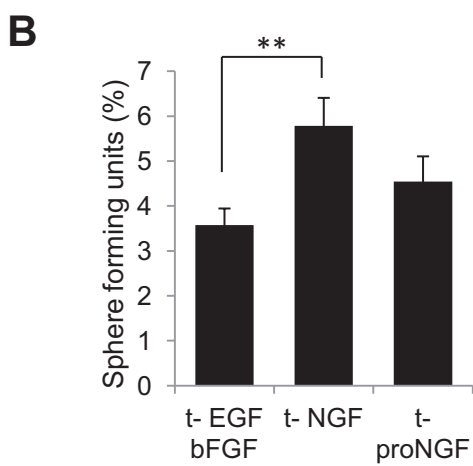
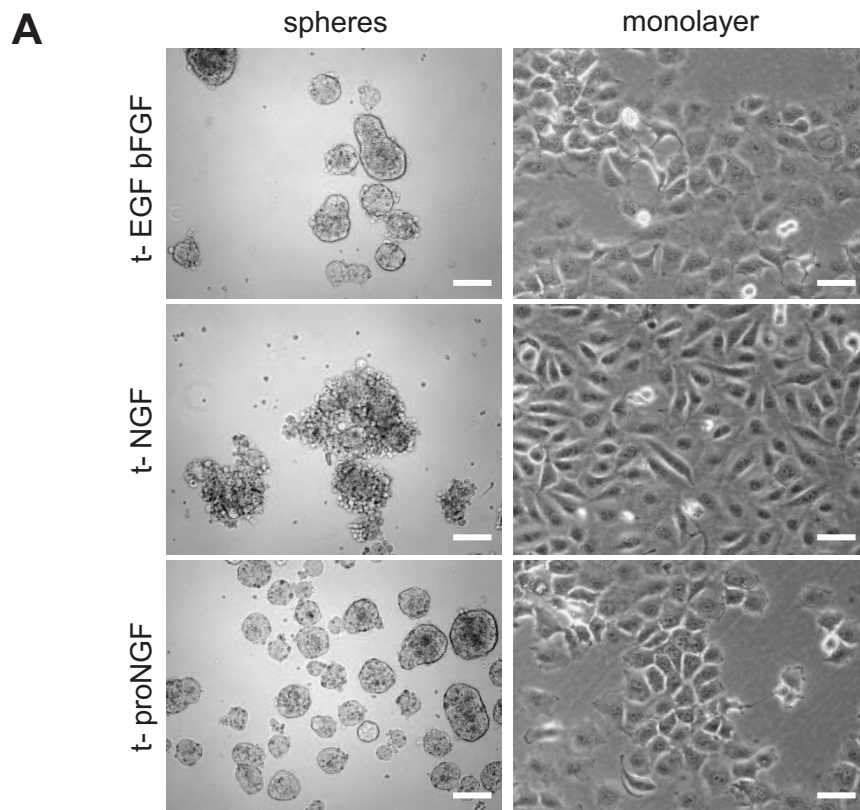


Figure 5

FIGURE LEGEND

Figure 5. Analyse of stem cell-like properties of cells derived from xenografted tumors. Cells were dissociated from tumors and then cultured in suspension (sphere formation) or in monolayer. **(A):** Morphologies of tumor-derived cells grown in suspension or on monolayer. **(B):** Tumor-derived cells were cultured in suspension for one week before the evaluation of sphere forming capacity. **(C):** Native MCF-7 cells (1G spheres) or tumor-derived cells (1G tumors) were cultured for one week in suspension before flow cytometry analysis of cells with CD44⁺/CD24⁻ phenotype. The results for tumor cells are given as the mean of the percentage of cells with the CD44⁺/CD24⁻ phenotype present in total population of cells dissociated from 5 tumors. * p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001.

NGF treatment selects for more primitive basal-like CSC through the induction of an EMT-like phenotype

A metastatic behaviour and the CD44^{high}/CD24^{low} phenotype are more connected to a basal-like rather than luminal (MCF-7 cells) breast cancer type. The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) mechanism converting normal and neoplastic epithelial cells into a mesenchymal phenotype is widely documented to play a key role in metastasis [48]. We therefore investigated if NGF and proNGF induced EMT in MCF-7 cell line grown in monolayer and sphere cultures as well as in 2 randomly chosen tumors for each treatment condition. RT-qPCR analysis was performed to determine the expression of a few EMT-associated genes, including E-cadherin, generally expressed by epithelial cells, vimentin, marking mesenchymal cells and EMT-associated transcription factor Slug. Indeed, t-NGF sphere cells did not express E-cadherin but overexpressed vimentin and Slug, suggesting that they converted to a more mesenchymal phenotype (Figure 6B).

Consistently, immunostaining with epithelial markers, keratin 18, keratin 19 and E-cadherin determined that globally, t-EGF FGF and t-proNGF sphere cells maintained their epithelial phenotype, while t-NGF cells clearly stopped expressing epithelial markers (Figure 6A). The presence of a few Keratin18⁺, Keratin19⁺ and E-cadherin⁺ cells in t-NGF samples led us infer that NGF treatment may select for bipotential progenitors with both luminal-epithelial and basal-mesenchymal lineage potential. To further verify the EMT phenotype of t-NGF cells, migration of tumor-derived cells and of MCF-7 monolayer cells was evaluated by wound healing assay. As shown in Figure 6C and D, t-NGF cells exhibited a strong increase of migration capacity, compared to other conditions. Altogether, these data indicate that NGF but not proNGF preselects for CD44^{high}/CD24^{low} breast cancer stem cells and stimulates the metastasis-prone EMT.

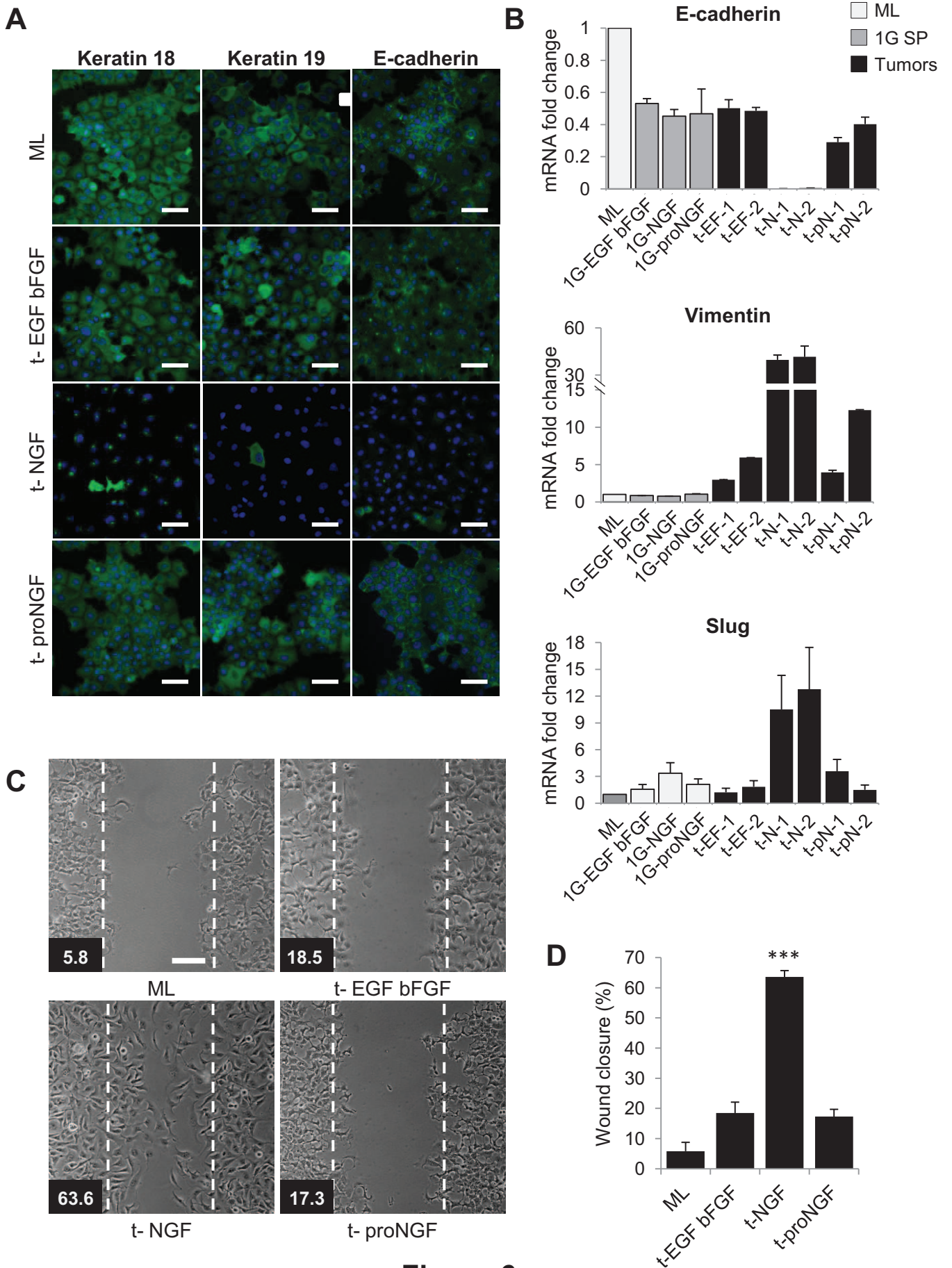


Figure 6

FIGURE LEGEND

Figure 6. Analysis of EMT phenotype of tumor-derived cells. **(A):** Immunocytochemistry assay evaluating keratin 18, keratin 19 and E-cadherin expression in cells dissociated from tumors (t) compared with monolayer MCF-7 by. Scale bar, 50 μm . **(B):** E-cadherin, vimentin and Slug detection by RT-qPCR in MCF-7 cultured in monolayer (ML), or in sphere condition (first generation) in the presence of EGF bFGF (1G EGF bFGF) or NGF (1G NGF) or proNGF (1G proNGF), and in cells from two randomly chosen tumors (t) for each condition (t-EF: t-EGF bFGF; t-N: t-NGF; t-pN: t-proNGF). **(C):** Migration assay of MCF-7 cells and tumor-derived cells on type 1 collagen for 4 h in 0.1% FBS. Scale bar, 100 μm . Dotted lines correspond to the wound at T0. **(D):** Percentage of wound closure of the experiment represented in C: experiments have been performed independently on cells from three randomly chosen tumors/conditions, in triplicate. Bar diagram represents the mean of wound healing experiments (***: $p < 0.001$). The percentage of wound closure calculated by T-scratch software.

DISCUSSION

NGF and proNGF are expressed and secreted by breast cancer cells [13,24]. Our data provide evidence that these factors are valuable messengers in the dialog between environment and the breast cancer stem cell counterpart. NGF and its precursor proNGF efficiently substituted the EGF bFGF supplements commonly used to maintain cancer stem cell sphere culture and even improved sphere forming efficiency of breast cancer cell lines [25,49]. We demonstrated that both NGF and proNGF enriched the cancer stem cell subset in MCF-7, BT-20 and T47D breast cancer cell lines. They increased the sphere forming units, the ALDH1⁺ and breast cancer stem cell CD44⁺/CD24⁻ subpopulations and the expression of Sox-2 and Nanog pluripotency transcription factors. Interestingly, although enhanced tumor growth in SCID mice was observed with both NGF and proNGF pretreated cells, NGF pre-treated cells were found to be more metastatic. The enhanced metastatic capacity is correlated with the ability of NGF to induce an epithelial-to-mesenchymal transition, as highlighted by acquisition of migratory properties, a spindle-like morphology and downregulation of epithelial cell-specific E-cadherin, keratin 18 and keratin 19, as well as upregulation of mesenchymal cell-specific vimentin and Slug markers. Interestingly, upregulation of Slug expression by NGF treatment already started after one sphere generation *in vitro*, leading us to hypothesize that NGF-induced Slug expression could be the first step in this phenotype switch. Both NGF and proNGF treatments increased the expression of several stem cell markers responsible for the breast cancer stem cell self renewal and maintenance of their multipotency, suggesting that these factors are involved in the control of the stem cell compartment and CSC specification in breast cancer. This is likely to be associated with the ability of NGF and, in particular, proNGF to induce cellular quiescence that protects stem cells from premature differentiation and exhaustion. Interestingly, NGF and proNGF not only stimulate breast CSC quiescence but also act directly on the quiescent CSC pool as evidenced by the increased sphere forming

ability. These results suggest that NGF and proNGF may regulate the balance between quiescence and proliferation of breast CSC. The molecular machinery controlling this balance appears to be dependent on p75^{NTR} signalling, since siRNA-mediated knock-down of this receptor abolishes sphere forming ability of control and NGF or proNGF treated breast cancer cells. Interestingly, both NGF and proNGF decreased the expression of Numb. Numb is reported to be downregulated in ~50% of breast cancers, this downregulation is correlated with the loss of cellular quiescence and polarity, resulting in an increased EMT properties of CSC [42] This suggests that NGF and proNGF by downregulating Numb may affect all these processes, particularly asymmetric division. These results, however, seem to indicate that a shift from an asymmetrical to a, at least partially, symmetrical division could be at the basis of NGF and proNGF-induced CSC enrichment.

Interestingly, although NGF and proNGF seem to control cellular behaviour in the stem cell compartment by p75^{NTR}, the molecular changes associated with self-renewal and multipotency induced by proNGF are p75^{NTR}-independent, suggesting that NGF and proNGF signals diverged and that the observed expansion of the CSC compartment is achieved through different cellular events clearly demonstrated by *in vivo* results. NGF treatment induces the expression of Sox2, Nanog c-Myc and β -catenin, factors that are necessary for CSC propagation. On the other hand, proNGF appears more efficient in the induction of cellular quiescence. We therefore propose that NGF may stimulate self renewal and block differentiation of breast CSC while proNGF may promote their entry into a quiescent state. The outcome in both cases will be an enrichment of the CSC pool. Our data, suggest that the stem cell fate specification regulated by NGF and proNGF may involve Numb, a tumor suppressor that, depending on the cell intrinsic background, may either control cellular quiescence or stimulate differentiated fate.

Taking into account the difference in receptors and co-receptors recruitment by NGF and proNGF we can likely affirm that a p75^{NTR}-dependent mechanism can elicit different cellular responses and differentially regulate mammary CSC pool. The exact mechanisms involved still remain elusive and awaits further study.

In conclusion, our results for the first time implicate that NGF and its precursor proNGF regulate the breast cancer stem cell compartment and CSC fate determination. Both these factors enrich the CSC compartment in p75^{NTR}-dependent manner but use different strategy and molecular machinery to achieve this endpoint. Both these factors are secreted by breast cancer cells, therefore likely CSC create their own regulatory network to highjack developmental stem cell machinery to sustain their propagation, prevent differentiation and promote survival. Differential effects of NGF and proNGF imply that breast CSC can adapt to environment by regulating the balance between self-renewal and quiescence of CSC.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Epidermal Growth Factor (EGF) was purchased from Sigma (E9644), bFGF from R&D System (233-FB), NGF from Scil proteins, proNGF (Mutated-human) from Alomone labs (N-285).

Cell and mammosphere culture

MCF-7, BT20 and T47D breast cancer cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and routinely grown as a monolayer. They were cultured in Minimal Essential Medium (MEM) (MCF-7, BT-20) or in RPMI 1640 Medium Glutamax (T47D) (Gibco®), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% non-essential amino acids, 5 mg/ml insulin (MCF-7, T47D), 40 U/ml penicillin-streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Mammospheres were generated seeding cells at 1000 cells/ml density in polyHEMA(Poly (2-hydroxyethylmethacrylate) coated tissue culture plates or flasks as previously described [26]. Mammosphere culture medium comprised DMEM-F12 media (Gibco®), supplemented with B27 (Gibco®), 0.4% BSA, 2.5 mg/ml insulin and 40 U/ml penicillin-streptomycin and was supplemented with either EGF/bFGF (20 ng/mL each) or NGF (200 ng/ml) or proNGF (12.5 ng/ml). Spheres forming units (SFU) (n° of spheres/n° of seeded cells x 100) was estimated after 7 days of culturing, by counting spheres reaching minimum a diameter >40 µm. For successive generations, primary spheres were recovered, dissociated by Accutase (Gibco®) and replated at the same conditions as the first generation.

Aldefluor Assay

ALDH-1 activity was assessed by using the ALDEFLUOR™ kit (StemCell Technologies, Durham, NC). Briefly, 1×10⁶ cells were resuspended in ALDEFLUOR assay buffer

containing ALDH1 substrate (BAAA, 1 μ mol/L). Half of this suspension was used as a negative control and transferred into another tube containing 50 mmol/L of the specific ALDH-1 inhibitor diethylaminobenzaldehyde (DEAB). Cells were incubated for 45 min at 37°C in the dark and then analyzed on a Beckman Coulter CyAn™ ADP Analyzer FACS.

Cell Extracts Preparation

First generations of MCF7 spheres were collected by centrifugation, rinsed with PBS and lysed in 120 nM NaCl, 40 mM HEPES, 1mM EDTA, 10 mM NAPPi, 50 mM NaF, 1.5 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 1 mM PMSF, PIC, 10% Glycerol. After centrifugation (12000 xg, 15 min) the supernatant was frozen until immunoblotting. The same protocol was used for subconfluent monolayer breast cancer cells.

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 for 1 h at room temperature. Membranes were incubated with antibodies against Sox2 (Santa Cruz, CA, sc-365823), Oct3/4 (sc-5279), c-Myc (sc-789), Nanog (sc-30331), Cyclin D2 (sc-181), Numb (sc-25668), ALDH1 (BD Transduction Laboratories, 611194), P- β -catenin-Ser675 (CS-4176) or β -catenin (CS-8480, both from Cell Signalling) in saturation buffer (overnight, 4°C). Actin detection (A2066, Sigma-Aldrich) was used for an equal-loading control. 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.

Cell transfection and si-RNA

Stable cell lines were obtained by electroporation using the Amaxa Cell Line Nucleofector kit V (Lonza) according to the manufacturer's recommendations, with 1.5 µg of plasmids bearing si-RNA p75^{NTR} (si-p75) AUGCCUCCUUGGCACCUCCTT. The decrease in targeted protein level was assessed by immunoblotting with anti-p75^{NTR} (clone D8A8, Cell Signaling Technology).

Reverse-transcription-PCR and quantitative real-time-PCR (qPCR)

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen), following the manufacturer's recommendations. Total RNA (1 µg) was reverse transcribed using oligodT with the Superscript First Strand Synthesis System (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. PCR was performed using 2 µl of the reverse transcriptase reaction in a volume of 25 µl using Syber Green (Invitrogen). Sox2: 5'-AACCCCAAGATGCACAACCTC-3', 5'-CGGGGCCGGTATTTATAATC-3'; c-Myc: 5'-TTCTCTCCGTCCTCGGATTCTCTG-3', 5'-TCTTCTTGTTCCCTCCTCAGAGTCG-3'; Oct4: 5'-GAAGGATGTGGTCCGAGTGT-3', 5'-GTGAAGTGAGGGCTCCCATA-3'; Nanog: 5'-TTCAGTCTGGACACTGGCTG-3', 5'-CTCGCTGATTAGGCTCCAAC-3'; Slug: 5'-GACCCTGGTTGCTTCAAGGA-3', 5'-TGTTGCAGTGAGGGCAAGAA-3'; CD44: 5'-AGACATCTACCCCAGCAAC-3', 5'-GTTGAGTCCACTTGGCTTTC-3'; p75^{NTR}: 5'-GCCGTTGGATTACACGGTCC-3', 5'-CCTACTCCAACAGCCACCAC-3'; TrkA: 5'-GTGGACACTAACAGCACATC-3', 5'-CGTCCACATTTGTTGAGCAC-3'; RPLP0: 5'-TGTCTGCTCCCACAATGAAA-3', 5'-ACAGACGAGGGTGTTCGTT-3'; Microglobulin: 5'-CCAGCAGAGAATGGAAAGTC-3', 5'-GATGCTGTCTACATGTCTCG-3'; E-cadherin: 5'-GTCAGTTCAGACTCCAGCCC-3', 5'-AAATTCACTCTGCCCAGGACG-3'; Vimentin: 5'-TCTACGAGGAGGAGATGCGG-3', 5'-GGTCAAGACGTGCCAGAGAC-3'.

H2B-GFP

MCF-7, BT-20 and T-47-D cell lines were stably transfected with pcDNA-6/TR (selection with Blasticidin 10 µg/mL - Invitrogen) containing a Tet-repressor expression construct, and with pT-REX DEST-Histone 2B-GFP vector (selection with Neomycin 600 µg/mL - Invitrogen). pTREX vector drives the expression of an H2B-GFP fusion protein under the control of a tetracycline-regulated promoter. Cell transfections were done using Amaxa (Lonza) according to the manufacturer's instructions.

Cell cycle analysis

Cell suspension of monolayer cells or of dissociated sphere cells was rinsed with PBS and fixed with 70% ethanol and kept at -20°C for at least 16h. To determine the percentage of cells in the G0 phase of the cell cycle, cells were rinsed with PBS and incubated with anti-human Ki67-FITC conjugated antibody (Abcam, France) or matching isotype for 30 min on ice. Cells were then incubated for 15 min in PBS 5 µg/mL RNase and for 30 min in PBS containing 30 µg/mL propidium iodide (PI). Cell cycle was analyzed on a Beckman Coulter CyAn™ ADP Analyzer.

Flow Cytometry analysis

Single cell suspension from parental monolayer culture and mammospheres was subjected to direct immunofluorescence staining followed by flow cytometry analysis. Briefly, the cells were harvested and washed with PBS. 5×10^5 cells were incubated for 30 min on ice with anti-CD44-FITC conjugated (clone C26), anti-CD24-PE conjugated (clone ML5), or matching isotypes (all from BD Pharmingen) in PBS 5% bovine serum albumin for 30 min. Analysis was performed using a Beckman Coulter CyAn™ ADP Analyzer FACS.

Tumor xenograft growth in immunodeficient mice

Six-week-old female severe combined immunodeficient (SCID) mice were from Institut Pasteur de Lille, France. Mice were maintained in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee procedures and guidelines. MCF-7 cells (2×10^5) cultured for one week with either EGF/bFGF, or NGF or proNGF in sphere condition were subcutaneously injected into flanks of the animals in a matrigel/PBS mix. The tumor volume was determined regularly by measuring length (l) and width (w) and then calculating the volume as $\pi/6 \times l \times w \times (l+w)/2$. Six mice were injected per each condition.

Tumor dissociation

Mice were sacrificed 12 weeks after the injection and tumors were collected. Half of each tumor was wash with PBS, cut under sterile conditions and dissociated by the addition of enzymatic solution consisting of collagenase I (8 mg/ml) and dispase (5 mg/ml), incubated 3h at 37 °C. Thereafter, tumors were incubated with 0.5% EDTA Trypsin (15 min at 37°C), filtered on a 40 µm nylon cell strainer, centrifuged and harvested.

Immunocytochemistry

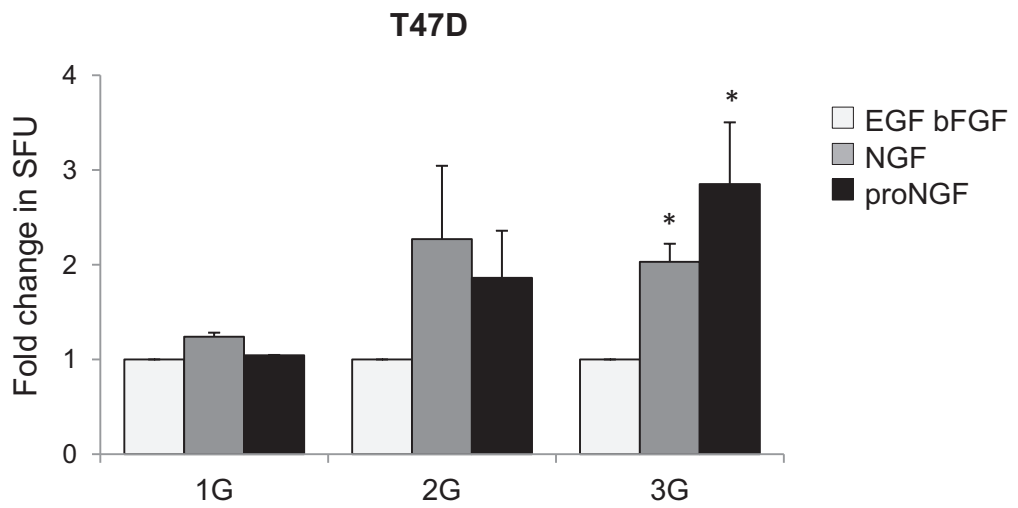
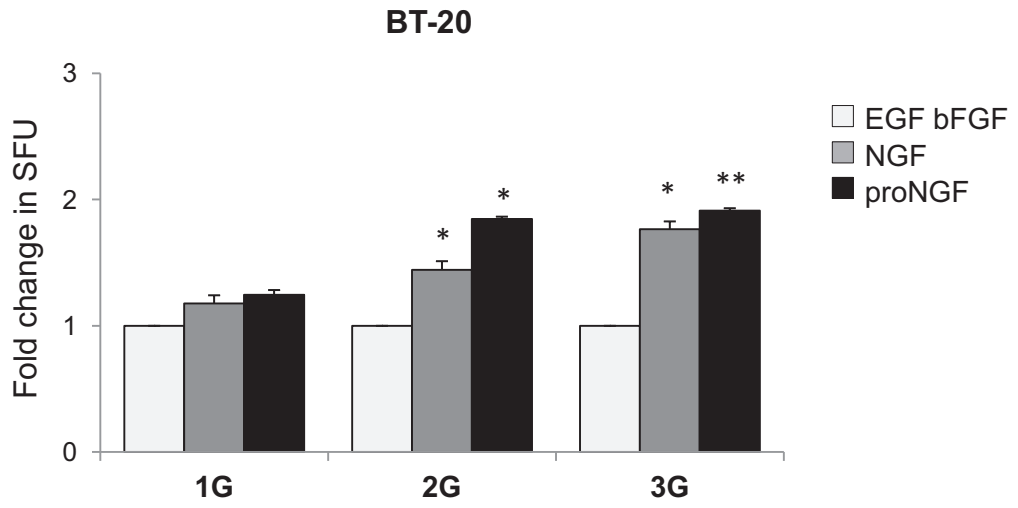
Cells (1×10^4) were grown on type I collagen-coated Labtek dishes in culture medium containing 10% FBS until 60% of confluency was reached. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and permeabilized with PBS/5% BSA/0.02% Triton X-100 for 10 min at RT and unspecific binding was blocked using PBS 5% goat serum for 90 min at RT. Cover slips were incubated with rabbit anti-human CK18, CK19, E-cadherin antibodies (1:200, Sigma-Aldrich) or normal rabbit immunoglobulin G (AB-105-C, R&D systems) as a control, overnight at 4°C in PBS–5% goat serum. Cells were rinsed with PBS, incubated for 1 h at RT in the blocking solution containing 1/2000 Alexa Fluor 488 anti-rabbit immunoglobulin G (Invitrogen) and incubated with DAPI for nuclear staining. Slides were

mounted using mounting solution (dako, sigma or what,) and observed at a 494-nm wavelength through a fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti-U).

Migration Assay (Wound healing assay)

Wound healing assays were performed using culture-insert-Dish (Ibidi, Martinsried, Germany) composed of two chambers (growth area per well 0.22 cm²) separated by a wall (width of 500 μm). Culture inserts were put in 12-well plates precoated with type I collagen. 10, 000 MCF-7 and tumor-dissociated cells were seeded into the chambers. After cell attachment overnight at 37 °C, cells were starved in serum-free MEM medium for 4 h, and culture-inserts were gently removed to form the cell-free gap. For each condition, pictures were taken at a precise localization at 0, 4, 8 and 24 h to monitor the healing of the cell-free gap. To calculate the percentage of closure of the wound, image analysis was performed with T-scratch software [50]. Cells were localized by edge detection. Percentage of closure was obtained by sub-tracting the area at a given time by the original area at T0 in each condition.

S1

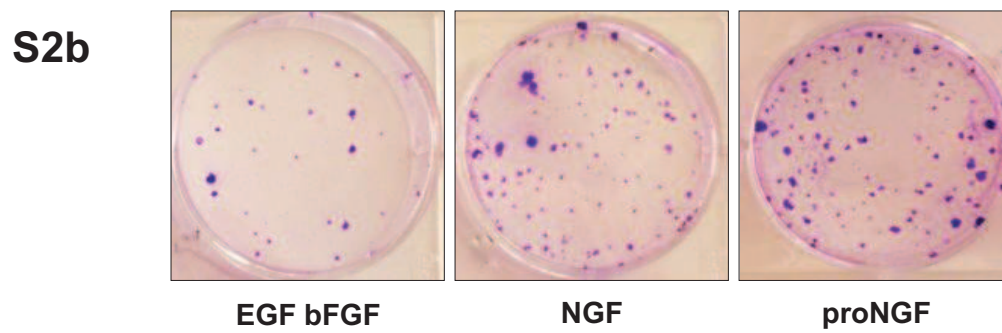
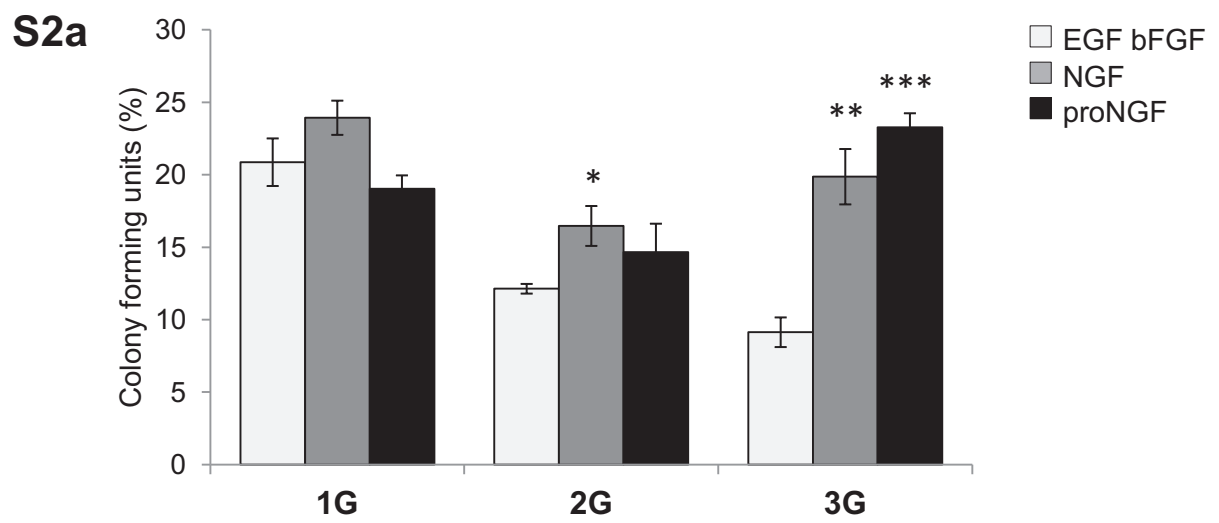


Supplementary data

FIGURE LEGEND

Supplementary Figure S1. NGF and proNGF effect on breast cancer stem cells self renewal.

(a). Mammosphere formation rates of BT-20 and T47D breast cancer cell lines on 3 generations (G) of spheres. The analysis was performed in triplicate in 3 independent experiments, counted spheres with a size higher than 40 μm .

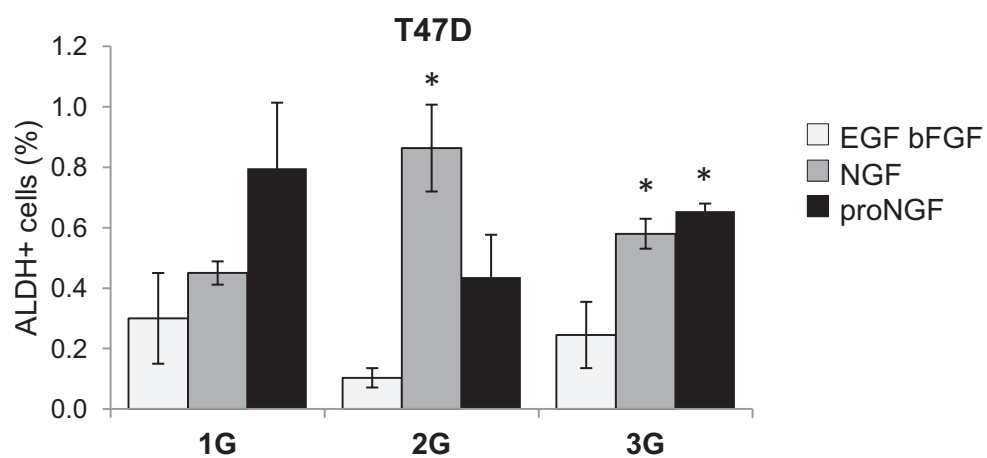
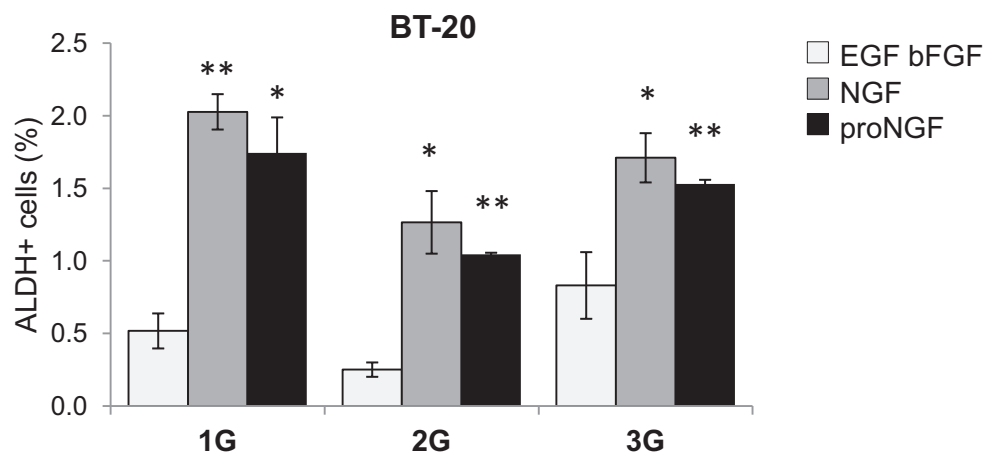


Supplementary data

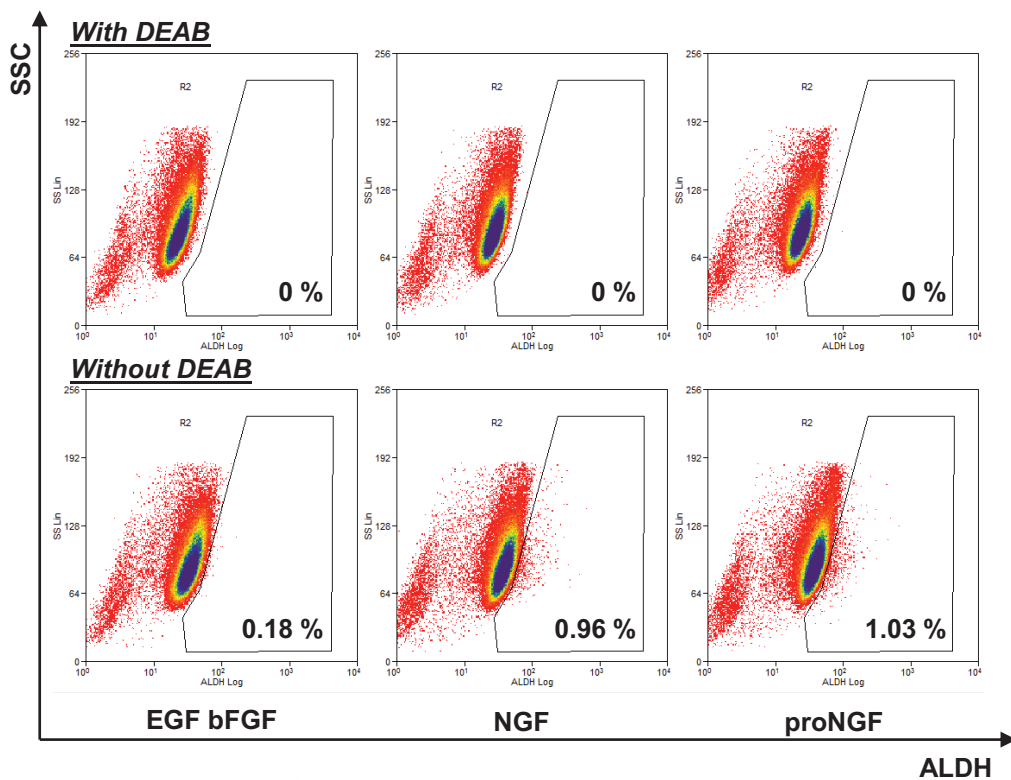
FIGURE LEGEND

Supplementary Figure 2: (a) Colony forming unit assay of cells from dissociated spheres. 3 generations of MCF-7 spheres were here tested for colony forming ability. Cells were seeded at low density (500 cells/60 mm dish) in monolayer culture and the percentage of colony forming units was estimated after 7 days of culturing in standard monolayer conditions (n° of colonies/ n° of seeded cells x 100). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. **(b)** Colonies were visualised after crystal violet staining.

S3a



S3b



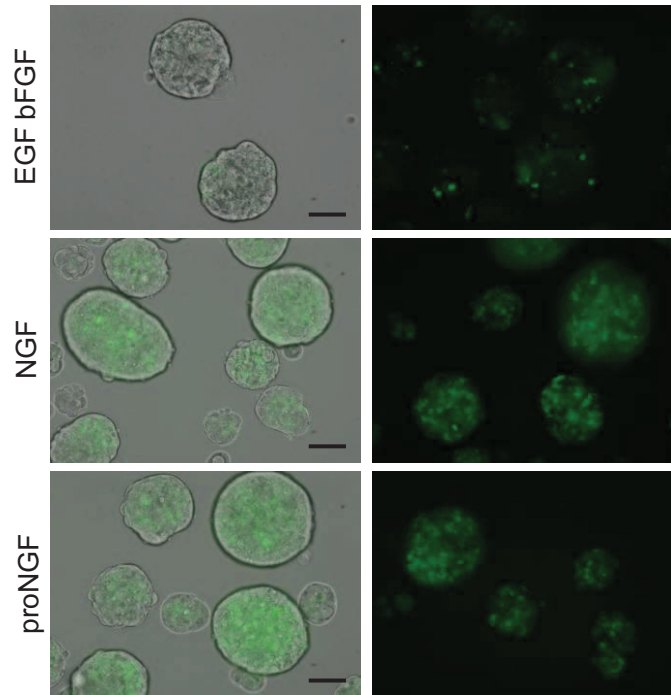
Supplementary data

ALDH

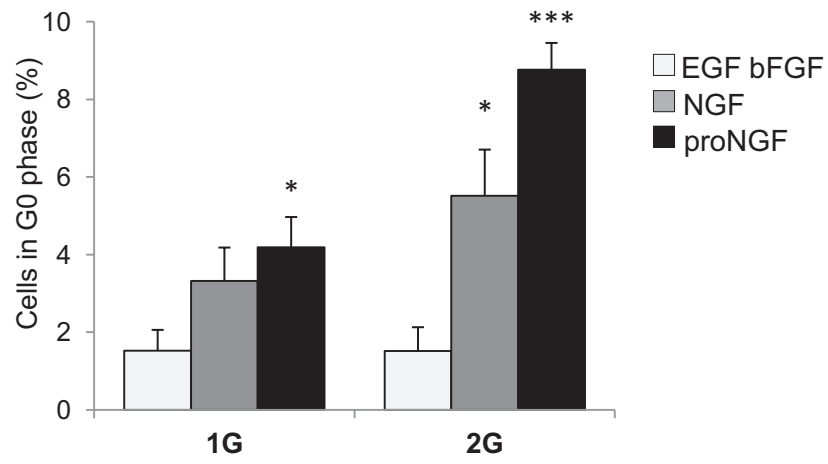
FIGURE LEGEND

Supplementary Figure S3a: Graphs illustrating flow cytometry analysis of ALDH activity assessed by ALDEFLUOR[®] assay kit using cells from first, second and third generations of spheres from BT-20 and T47D breast cancer cell lines. The analysis revealed an increase in the ALDH+ fraction in response to NGF and proNGF treatment. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. **S3b:** Example of ALDEFLUOR assay on BT-20 cell line (One of the three replicates of the 2nd generation of spheres).

S4



S5



Supplementary data

FIGURE LEGEND

Supplementary Figure S4: Representative photographs showing first generation of spheres obtained with MCF-7 cells stably transfected with histon 2B-GFP fusion protein cultured in different conditions (two weeks after GFP induction with Tetracyclin).

Supplementary Figure S5: Cell cycle analysis of first and second generations of MCF-7 spheres. Double staining with propidium iodide and Ki67 determined that the NGF and, especially, the proNGF treatment increased the percentage of quiescent, Ki67-negative cells within spheres.

REFERENCES

1. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 3983–3988.
2. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Birnbaum D (2009) Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer* **9**: 202.
3. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu M-F, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, et al. (2008) Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* **100**: 672–679.
4. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646–674.
5. Polyak K (2007) Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* **117**: 3155–3163.
6. 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.
7. Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V, Le Bourhis X, Boilly B, Peyrat JP, 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.
8. Com E, Lagadec C, Page A, El Yazidi-Belkoura I, Slomianny C, Spencer A, Hammache D, Rudkin BB, Hondermarck H (2007) Nerve growth factor receptor TrkA signaling in breast cancer cells involves Ku70 to prevent apoptosis. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1842–1854.
9. Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, Mougél A, Page A, Romon R, Nurcombe V, Le Bourhis X, Hondermarck H (2008) Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* **68**: 346–351.
10. Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chrétien M, Murphy RA (1996) Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* **314** (Pt 3): 951–960.
11. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**: 1945–1948.
12. Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Mörl K, Meyer M, Hempstead BL, Yoon SO, Giehl KM (2004) Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 6226–6230.
13. Demont Y, Corbet C, Page A, Ataman-Önal Y, Choquet-Kastylevsky G, Fliniaux I, Le Bourhis X, Toillon R-A, Bradshaw RA, Hondermarck H (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.
14. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, et al. (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**: 843–848.
 15. Vaegter CB, Jansen P, Fjorback AW, Glerup S, Skeldal S, Kjolby M, Richner M, Erdmann B, Nyengaard JR, Tessarollo L, et al. (2011) Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat Neurosci* **14**: 54–61.
 16. Betters E, Liu Y, Kjaeldgaard A, Sundström E, García-Castro MI (2010) Analysis of early human neural crest development. *Dev Biol* **344**: 578–592.
 17. Mikami Y, Ishii Y, Watanabe N, Shirakawa T, Suzuki S, Irie S, Isokawa K, Honda MJ (2011) CD271/p75(NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells Dev* **20**: 901–913.
 18. Okumura T, Shimada Y, Imamura M, Yasumoto S (2003) Neurotrophin receptor p75(NTR) characterizes human esophageal keratinocyte stem cells in vitro. *Oncogene* **22**: 4017–4026.
 19. Li X, Shen Y, Di B, Li J, Geng J, Lu X, He Z (2012) Biological and clinical significance of p75NTR expression in laryngeal squamous epithelia and laryngocarcinoma. *Acta Otolaryngol* **132**: 314–324.
 20. Nakamura T, Endo K, Kinoshita S (2007) Identification of human oral keratinocyte stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p75 and the role of neurotrophin/p75 signaling. *Stem Cells* **25**: 628–638.
 21. Truzzi F, Marconi A, Atzei P, Panza MC, Lotti R, Dallaglio K, Tiberio R, Palazzo E, Vaschieri C, Pincelli C (2011) p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes. *Cell Death Differ* **18**: 948–958.
 22. Di Girolamo N, Sarris M, Chui J, Cheema H, Coroneo MT, Wakefield D (2008) Localization of the low-affinity nerve growth factor receptor p75 in human limbal epithelial cells. *J Cell Mol Med* **12**: 2799–2811.
 23. Kim J, Villadsen R, Sørlie T, Fogh L, Grønlund SZ, Fridriksdottir AJ, Kuhn I, Rank F, Wielenga VT, Solvang H, et al. (2012) Tumor initiating but differentiated luminal-like breast cancer cells are highly invasive in the absence of basal-like activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 6124–6129.
 24. Dollé 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.

25. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS (2003) In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* **17**: 1253–1270.
26. Touil Y, Zuliani T, Wolowczuk I, Kuranda K, Prochazkova J, Andrieux J, Le Roy H, Mortier L, Vandomme J, Jouy N, et al. (2012) The PI3K/AKT signaling pathway controls the quiescence of the low-Rhodamine123-retention cell compartment enriched for melanoma stem cell activity. *Stem Cells* **31**: 641–651.
27. Moreb JS (2008) Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* **3**: 237–246.
28. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, et al. (2007) ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**: 555–567.
29. Morimoto K, Kim SJ, Tanei T, Shimazu K, Tanji Y, Taguchi T, Tamaki Y, Terada N, Noguchi S (2009) Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci* **100**: 1062–1068.
30. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, Houvenaeghel G, Extra J-M, Bertucci F, Jacquemier J, et al. (2010) Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res* **16**: 45–55.
31. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, et al. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**: 947–956.
32. Kim J, Chu J, Shen X, Wang J, Orkin SH (2008) An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* **132**: 1049–1061.
33. Bareiss PM, Paczulla A, Wang H, Schairer R, Wiehr S, Kohlhofer U, Rothfuss OC, Fischer A, Perner S, Staebler A, et al. (2013) SOX2 Expression Associates with Stem Cell State in Human Ovarian Carcinoma. *Cancer Res*.
34. Zhang J, Espinoza LA, Kinders RJ, Lawrence SM, Pfister TD, Zhou M, Veenstra TD, Thorgeirsson SS, Jessup JM (2012) NANOG modulates stemness in human colorectal cancer. *Oncogene*.
35. Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D, Dulin NO (2006) Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **281**: 9971–9976.
36. Saito-Diaz K, Chen TW, Wang X, Thorne CA, Wallace HA, Page-McCaw A, Lee E (2013) The way Wnt works: components and mechanism. *Growth Factors* **31**: 1–31.
37. Harmes DC, DiRenzo J (2009) Cellular quiescence in mammary stem cells and breast tumor stem cells: got testable hypotheses? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **14**: 19–27.

38. Che S-M, Zhang X-Z, Liu X-L, Chen X, Hou L (2011) The radiosensitization effect of NS398 on esophageal cancer stem cell-like radioresistant cells. *Dis Esophagus* **24**: 265–273.
39. Clevers H (2005) Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nat Genet* **37**: 1027–1028.
40. Knoblich JA (2010) Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 849–860.
41. Morrison SJ, Kimble J (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**: 1068–1074.
42. Pece S, Confalonieri S, Romano P, Di Fiore PP (2011) NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH. *Biochim Biophys Acta* **1815**: 26–43.
43. Tsunekawa Y, Osumi N (2012) How to keep proliferative neural stem/progenitor cells: a critical role of asymmetric inheritance of cyclin D2. *Cell Cycle* **11**: 3550–3554.
44. Tsunekawa Y, Britto JM, Takahashi M, Polleux F, Tan S-S, Osumi N (2012) Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates. *EMBO J* **31**: 1879–1892.
45. Van der Pluijm G, Sijmons B, Vloedgraven H, Deckers M, Papapoulos S, Löwik C (2001) Monitoring metastatic behavior of human tumor cells in mice with species-specific polymerase chain reaction: elevated expression of angiogenesis and bone resorption stimulators by breast cancer in bone metastases. *J Bone Miner Res* **16**: 1077–1091.
46. Wicha MS (2012) Migratory gene expression signature predicts poor patient outcome: Are cancer stem cells to blame? *Breast Cancer Res* **14**: 114.
47. Fillmore CM, Kuperwasser C (2008) Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* **10**: R25.
48. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**: 871–890.
49. Reynolds BA, Weiss S (1996) Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* **175**: 1–13.
50. Gebäck T, Schulz MMP, Koumoutsakos P, Detmar M (2009) TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *BioTechniques* **46**: 265–274.

Résultats complémentaires

1. Expression des isoformes du récepteur CD44 dans les CSC de sein

Les travaux présentés dans l'article précédent sont les résultats d'un projet de recherche qui a démarré avec mon arrivée en thèse. A cette époque, il existait peu des connaissances sur les marqueurs propres aux cellules souches cancéreuses de sein et sur les techniques vraiment fiables pour détecter ces cellules. D'ailleurs, le rôle de certains marqueurs considérés comme acquis pour l'étude des CSC mammaires n'était pas (et n'est toujours pas) bien clair. Un exemple est représenté par CD44, récepteur principal de l'acide hyaluronique, surexprimé par les CSC mammaires et utilisé en association avec l'absence du récepteur CD24 (population CD44⁺/CD24⁻) pour isoler ces cellules. Cependant, CD44 est un récepteur bien trop complexe pour pouvoir se limiter à évaluer sa présence/absence. En effet, bien que CD44 soit issu d'un seul gène (locus 11p13), il existe de nombreuses isoformes de CD44, produites par épissage alternatif de l'ARNm suite à l'activation des voies de transduction (e.g. voie des MAP-kinases) par des signaux extracellulaires aboutissant à l'activation de facteurs d'épissage (comme sam68, ESRP1, ...) (Matter et al., 2002; Warzecha et al., 2009; Weg-Remers et al., 2001). L'ARN messager de CD44 contient 20 exons, dont 10 constants (exons de 1 à 5 et de 16 à 20) et 10 variables (exons de 6 à 15). Ces exons variables, nommées v1-v10, constituent la partie extracellulaire du récepteur en sa forme mature (Figure 29) (Ponta et al., 2003).

La forme standard de CD44 (CD44s) est constituée par les 10 exons constants et représente la forme la plus répandue du récepteur. Les autres isoformes peuvent dériver de différentes combinaisons des exons variants, conduisant à une vingtaine d'isoformes ayant des propriétés différentes. En effet, les formes variantes de CD44 sont exprimées spécifiquement dans certaines cellules et lors de certains processus physiologiques (développement embryonnaire, invasion, activation des lymphocytes,...) et une expression aberrante des isoformes variantes de CD44 a également été observée dans les cellules cancéreuses (Li et al., 2013; Olsson et al., 2011).

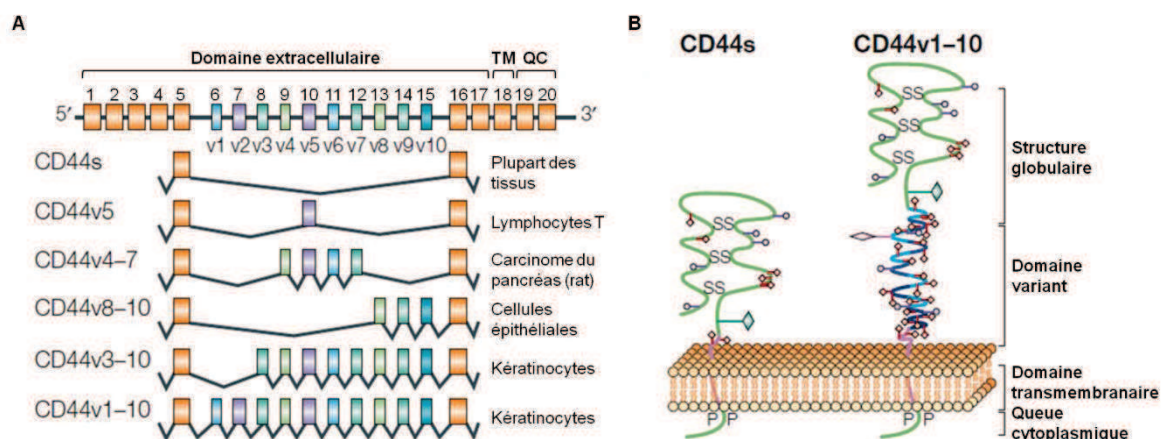


Figure 29. Structure de l'ARN messager et structure protéique de CD44

(A) L'ARNm de CD44 est codé par 20 exons, dont 10 peuvent être produits par épissage alternatif (v1 à v10) en différentes combinaisons pour former de nombreuses isoformes appelées CD44-variant. (B) La structure protéique de la forme standard est comparée à celle de la variante v1-v10, contenant tous les exons variants dans la partie extracellulaire (Ponta et al., 2003).

Bien que CD44 soit considéré comme un marqueur des CSC mammaires, peu de données sont présentes à l'heure actuelle sur le rôle des formes variantes de CD44 sur ces cellules. Ces dernières années, de plus en plus d'équipes cherchent à discriminer les différents rôles des isoformes.

Nous avons comparé l'expression de CD44 par RT-PCR dans des cellules quiescentes ou à faible prolifération (GFP⁺) et cellules en division active (GFP⁻). Nous avons montré que les cellules GFP⁺ présentaient une surexpression de la forme standard de CD44 (données présentées dans l'article). De plus, les deux populations différaient dans l'expression de formes de tailles très différentes. Nous avons donc réalisé des RT-PCR supplémentaires en utilisant une amorce sens localisée sur l'exon 5, dans la partie standard, et plusieurs amorces anti-sens localisées sur chaque exon variant. Nous avons observé une expression plus importante des exons variantes 3, 6, 8 et 10 dans les cellules GFP⁺ (Figure 30).

Résultats

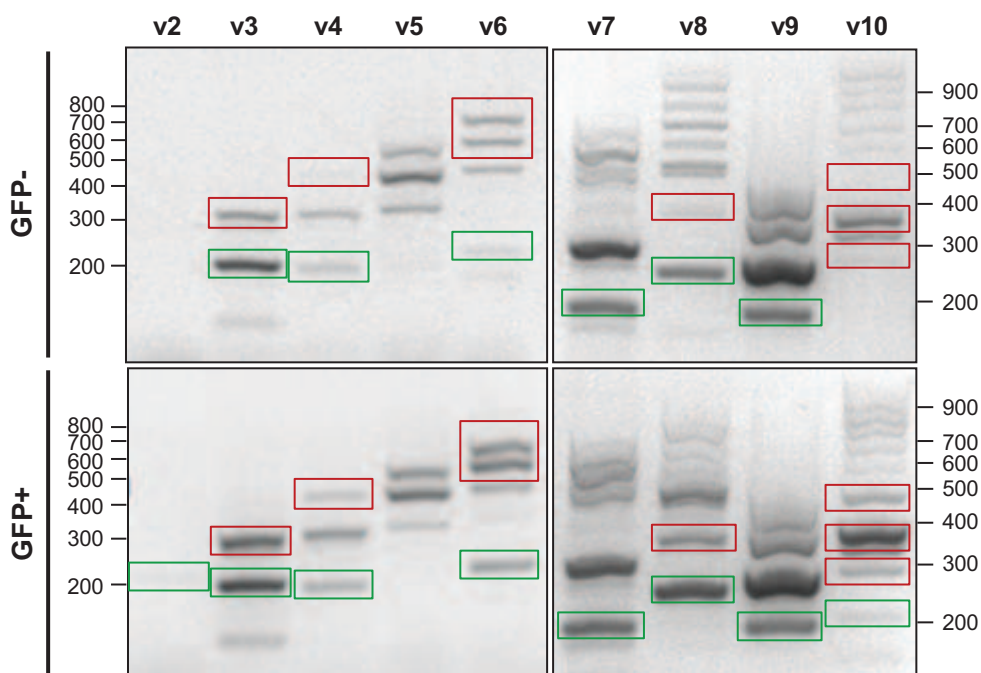


Figure 30. Expression des isoformes de CD44 dans les cellules GFP⁻ et GFP⁺

Analyse par RT-PCR des ARNm issus des fractions GFP⁺ (cellules quiescentes ou en prolifération lente) et GFP⁻ (cellules en prolifération active). Les cellules MCF-7 H2B-GFP sont cultivées en monocouche, 7 jours après l'induction de l'expression de la GFP par la tétracycline, les cellules sont lysées et l'ADN extrait en vue de la PCR. En utilisant des amorces qui amplifient chaque exon variant de CD44, nous avons vérifié la présence des formes variantes de CD44.. La présence de plusieurs bandes au niveau des exons variantes indique la présence de plusieurs isoformes contenant cet exon, ainsi que d'autres combinaisons d'exons, ce qui donne lieu à des amplifications de taille très différente.

In vivo, l'expression de différents isoformes de CD44 par les cellules quiescentes pourrait être corrélée à une différente interaction entre ces cellules et leur niche. Dans le système hématopoïétique, il a été montré que les cellules souches quiescentes résident dans une niche particulière (la niche endostéale), différente de la niche des cellules souches activées (plus souvent une niche ostéoblastique). Les cellules quiescentes sont en relation étroite avec cette niche, grâce à l'expression de molécules d'adhésion comme la N-cadhérine, CD44 et plusieurs types d'intégrines (Trumpp et al., 2010). Par ailleurs, l'expression de ces différentes isoformes pourrait être corrélée à des différences dans l'interaction avec la matrice extracellulaire ou avec différents ligands.

Pour évaluer l'effet du NGF et du proNGF sur l'expression des différentes variantes de CD44, nous avons utilisé la même approche décrite pour les cellules GFP⁺, mais sur des extraits des sphères de première et de deuxième génération traitées avec ces

Résultats

neurotrophines. L'expression des variantes 3, 6 et 8, ainsi que l'expression de la forme standard ont été comparées à la condition contrôle et aux cellules MCF-7 en monocouche. De façon intéressante, nous avons pu constater que le traitement au proNGF induit l'expression de l'exon variant 3, apparemment au détriment de l'expression de la forme standard. Le NGF, quant à lui, semble induire un effet similaire à celui du proNGF, mais à un moindre degré (Figure 31 A).

Nous avons en suite voulu confirmer l'induction de la variante CD44v3 par le proNGF par un marquage en cytométrie en flux, en utilisant un anticorps dirigé contre l'exon v3. L'analyse a été réalisée sur des cellules issues des sphères de première génération MCF-7 vivantes, sans fixation ni perméabilisation préliminaires, dans le but d'évaluer la quantité des récepteurs à la membrane cellulaire. Ainsi, nous avons pu confirmer que le traitement au proNGF augmente la forme variante CD44v3, alors qu'aucun effet ne semble se produire sur l'expression (ni sur la localisation) de la variante v6 (Figure 31 B).

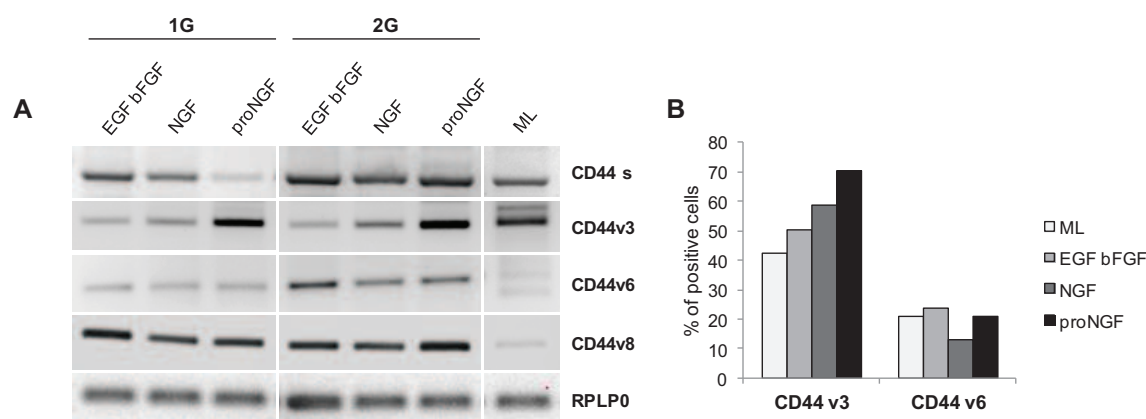


Figure 31. Expression des isoformes de CD44 induites par les traitements au NGF et au proNGF

A. Analyse par RT-PCR des ARNm issus des MCF-7 monocouches (ML) et des sphères de première (1G) et de deuxième (2G) génération, traitées avec du NGF, du proNGF ou avec la combinaison du EGF et bFGF. Les bandes correspondent aux exons 3, 6, et 8 de CD44 et à la forme standard du gène (CD44s). Le RPLP0 est utilisé comme contrôle interne. B. Analyse en cytométrie en flux de l'expression membranaire de formes variantes CD44v3 et CD44v6. Les cellules MCF-7 issues des sphères de première génération ou de culture en monocouche ont été analysées sans fixation ou perméabilisation préalables.

Un article publié en 2012 par l'équipe de Bourguignon décrit l'implication de la forme variante CD44v3 dans l'induction de l'autorenouvellement des CSC dans le cancer de la tête et du cou, ainsi que dans leur résistance au traitement à la cisplatine (Bourguignon et al., 2012). Dans ce modèle, l'isoforme CD44v3, en réponse à l'acide hyaluronique, induit

le recrutement au niveau de sa queue cytoplasmique des facteurs de transcription Sox-2, Oct-4 et Nanog. Ces facteurs de transcription s'assemblaient ainsi en un complexe qui, une fois transloqué dans le noyau, induit la transcription du microRNA-302 (miR-302). L'expression du miR-302 induit ensuite la suppression de plusieurs régulateurs épigénétiques (comme AOF1/AOF2 et DNMT1) et l'activation des voies de survie régulées par cIAP1 et c-IAP2. Cette cascade de signalisation stimulerait ainsi l'autorenouvellement des CSC (évalué par la capacité des cellules à former des sphères) et la résistance à la cisplatine (Bourguignon et al., 2012).

Nos résultats préliminaires suggèrent l'implication potentielle des variants de CD44 dans les effets différentiels du NGF et du proNGF sur les cellules souches.

2. Evaluation des effets du NGF et du proNGF sur la culture à long terme des mammosphères

La première partie de ma thèse a eu comme but l'évaluation des effets du NGF et du proNGF sur les CSC de sein, en traitant les mammosphères avec ces facteurs de croissance pour une semaine (1^{ère} génération de sphères) et en comparant les modifications observées avec la condition contrôle. Cependant, l'observation de la présence d'une fraction de cellules quiescentes au sein de notre population ainsi que l'action de ces neurotrophines sur la régulation de la balance entre quiescence et prolifération, nous a conduits à évaluer les effets du NGF et du proNGF sur une culture à plus long terme. Pour cela, nous avons cultivé des sphères MCF-7 pour plus de 20 générations (équivalent à 5 mois de culture), en dissociant les sphères toutes les semaines et en réensemencant les cellules dans les mêmes conditions de culture. Cette expérience visait à déterminer si une des nos conditions de culture pouvait favoriser ou épuiser des cellules capables de former des sphères. Cependant, cela n'a pas été le cas, et une certaine homogénéité dans la formation des sphères s'est mise en place entre les différentes conditions. Les cellules issues de ces sphères présentent un fort pourcentage des cellules en phase G0 du cycle cellulaire (Figure 32 A), ce qui se reflète dans la petite taille des sphères, par rapport aux premières générations. De plus, les cellules cultivées en mammosphère à long terme expriment moins de facteurs de pluripotence tels que Sox-2, Nanog, alors qu'elles expriment beaucoup plus de CD44 avec des poids moléculaires différents (Figure 32 B).

Résultats

Mis à part son rôle dans la biologie de cellules souches, le récepteur CD44 est connu pour son implication dans la migration et dans l'invasion des cellules cancéreuses. En effet, nous avons observé que les cellules issues d'une culture de mammosphère à long terme (dans toutes les conditions de culture) présentent une capacité migratoire homogène et beaucoup plus élevée comparée à celle des cellules issues de culture en monocouche (Figure 32 C).

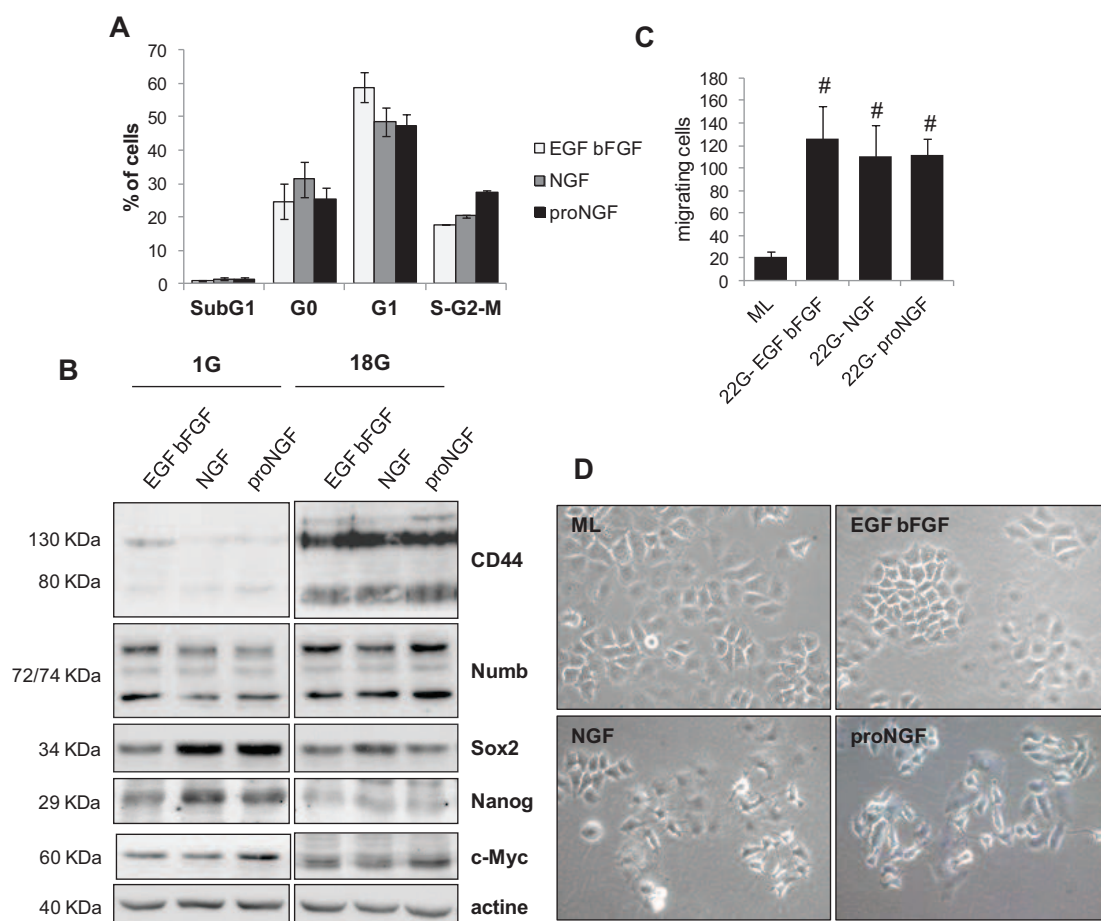


Figure 32. Caractérisation de cellules obtenues par une culture à long terme des mammosphères

A. Analyse du pourcentage de cellules quiescentes dans les sphères de 22^{ème} génération par double marquage à l'iodure de propidium et Ki67. **B.** Western blot réalisé sur des extraits protéiques des sphères MCF-7 en première et en 18^{ème} génération. **C.** Test de migration en Transwell® des cellules issues des sphères de 22^{ème} génération, comparées aux cellules MCF-7 monocouche. # $p < 0.001$. **D.** Phénotype en monocouche des cellules issues de la dissociation des sphères de 22^{ème} génération.

Résultats

De façon intéressante, quand les cellules issues de mammosphères sont cultivées en condition adhérente, une morphologie fibroblastique est observée dans les cellules cultivées en présence de NGF et surtout de proNGF, alors que les cellules cultivées en condition standard (EGF, bFGF) présentent encore une morphologie de cellules épithéliales (Figure 32 D).

L'acquisition des propriétés migratoires par les cellules est généralement associée à un phénotype plus agressif *in vivo*. Pour évaluer ceci, nous avons injecté des cellules issues de la culture à long terme dans des souris SCID immunodéficientes, selon le même protocole utilisé lors de l'injection des sphères à court terme. Bien que le phénotype des trois conditions de traitement soit analogue *in vitro*, leur comportement *in vivo* diffère énormément (Figure 33). Globalement, les cellules de 22^{ème} génération sont caractérisées par une courte latence et par une croissance tumorale condition-dépendante. En effet, les cellules issues de la condition EGF bFGF montrent ici des capacités prolifératives élevées, comparées aux autres conditions et comparées aux résultats de la première injection (culture à court terme). De façon étonnante, les cellules issues de la condition proNGF, bien que phénotypiquement modifiées par la culture à long terme *in vitro*, ne présentent pas de différences en termes de croissance tumorale par rapport à l'injection des sphères de première génération.

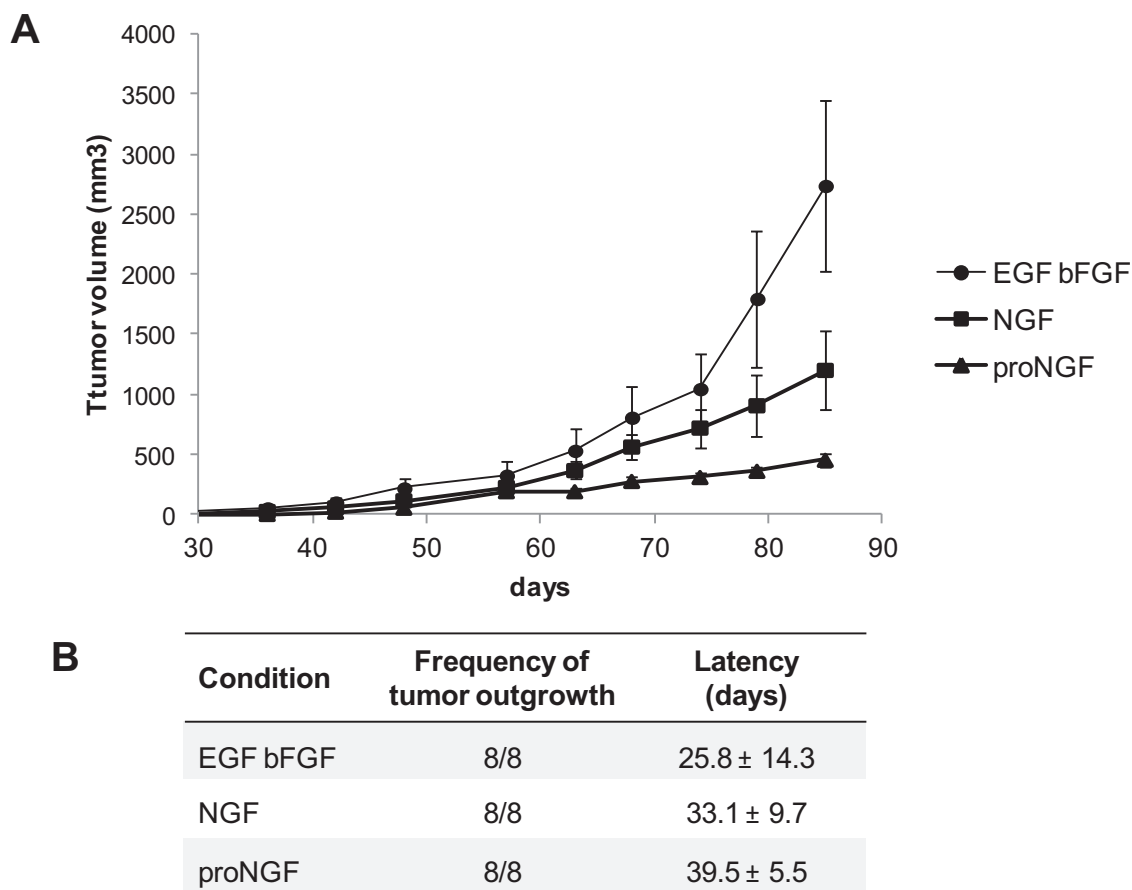


Figure 33. Injection des cellules issues de la culture à long terme en souris SCID

A. Evaluation de la taille de tumeurs formées à partir de cellules issues des sphères de 22^{ème} génération. **B.** Incidence tumorale et latence tumorale.

Pour mieux caractériser ces cellules, nous avons dissocié les tumeurs obtenues et nous avons évalué leur phénotype cellulaire. En monocouche, les cellules issues des tumeurs « EGF bFGF » et « NGF » présentent une morphologie allongée (Figure 33 A), similaire à celle des cellules basales (e.g. les cellules de la lignée de cancer du sein MDA-MB-231) et comparable à la morphologie observée suite à la dissociation des tumeurs obtenues des sphères de 1^{ère} génération dans la condition NGF (voire article). De façon surprenante, les cellules issues de tumeurs « proNGF » présentent une très grande hétérogénéité, allant de cellules fibroblastiques aux cellules probablement sénescents. En condition de sphères, les cellules issues des tumeurs « EGF bFGF » forment des sphères assez lâches et de petite taille, alors que les cellules issues des tumeurs « proNGF » forment des sphères compactes et de grande taille (Figure 34 A). La capacité de ces cellules à former des sphères est maintenue dans toutes les conditions, bien que ce soit statistiquement plus important dans les cellules issues des tumeurs « NGF » (Figure 34 B).

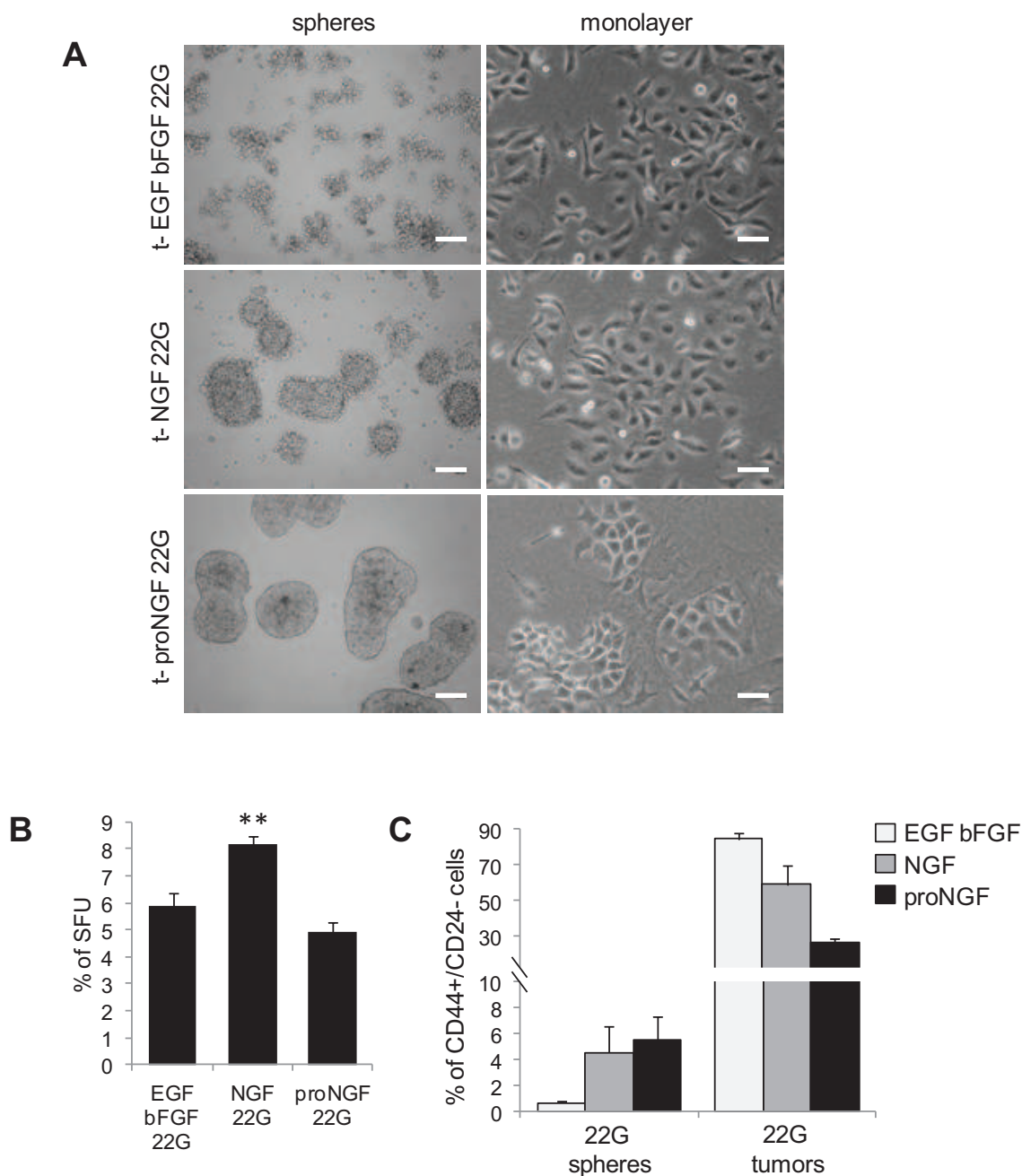


Figure 34. Analyse phénotypique des cellules issues des tumeurs

*A. Les tumeurs obtenues après l'injection des cellules issues des sphères de 22^{ème} génération ont été dissociées et remises en culture en condition de sphères et en monocouche. B. Evaluation de la capacité des cellules à former des sphères. ** $p < 0.01$. C. Pourcentage des cellules CD44⁺/CD24⁻ dans les cellules de 22^{ème} génération avant l'injection chez la souris (à gauche) et après le passage chez la souris (à droite).*

De façon intéressante, nous observons que dans les cellules de 22^{ème} génération, le NGF et le proNGF augmentent la proportion des cellules CD44⁺/CD24⁻, comparée à la condition de culture standard (EGF, bFGF). Il est à rappeler que les cellules parentales MCF-7,

Résultats

cultivées en monocouche, ne présentent pas de sous-population CD44⁺/CD24⁻. La sous-population CD44⁺/CD24⁻ est étonnamment surreprésentée dans les cellules issues de tumeurs en conditions « EGF bFGF » (90% de cellules CD44⁺/CD24⁻) et « NGF » (70% de cellules CD44⁺/CD24⁻). Le phénotype CD44⁺/CD24⁻ a été corrélé par des travaux précédents au sous-type basal du cancer du sein (Honeth et al., 2008), donc l'enrichissement observé pourrait être corrélé à une sélection des cellules ayant un phénotype basal lors de l'injection chez la souris. Cependant, la présence d'une proportion plus importante de cellules CD44⁺/CD24⁻ dans la condition proNGF dans les cellules de 22^{ème} génération avant l'injection met en doute ce concept de sélection (Figure 34 C).

En conclusion, les résultats obtenus sur les cellules issues de la culture à long terme des sphères sont encore préliminaires et nécessitent d'une meilleure caractérisation de ces cellules. Néanmoins, ces résultats prouvent que des populations cellulaires présentant un phénotype comparable en condition standard peuvent répondre de façon très différente dans un contexte de stress ou dans un microenvironnement plus complexe.

B. Le clivage de p75^{NTR} dans le cancer du sein

Le récepteur p75^{NTR} est un récepteur à multiples facettes : ne présentant pas d'activité catalytique propre, ce récepteur doit sa signalisation à l'interaction avec des partenaires membranaires ou au recrutement de protéines intracellulaires. Cela rend sa signalisation difficile à décrypter. Dans le cancer du sein, le récepteur p75^{NTR} présente une action anti-apoptotique (Verbeke et al., 2010).

Dans les neurones, p75^{NTR} subit une protéolyse appelée RIP, pour *Regulated Intramembrane Proteolysis*, qui consiste en deux clivages successifs du récepteur. Un premier clivage est produit dans la partie juxtamembranaire extracellulaire par l'enzyme ADAM17/TACE. Ce clivage libère l'ectodomaine de p75^{NTR} pour laisser un fragment attaché à la membrane, appelé p75^{NTR}-CTF. Ce fragment subit un clivage dans son domaine transmembranaire par la presenilin-1, qui fait partie du complexe γ -sécrétase. Ce deuxième clivage permet la libération dans le cytoplasme de la partie intracellulaire du récepteur, appelée p75^{NTR}-ICD.

Nous avons donc cherché à évaluer si un mécanisme analogue de protéolyse avait lieu dans les cellules cancéreuses mammaires et si ceci pouvait être impliqué dans la résistance à l'apoptose induite par ce récepteur. En effet, nous avons montré que le p75^{NTR}-CTF ancré à la membrane permet la survie cellulaire, probablement en agissant comme plateforme d'interaction pour des partenaires intracellulaires. Nos résultats montrent que les voies PI3-K/Akt, MAPK et NF- κ B ne sont pas impliquées dans les effets de survie médiés par p75^{NTR}-CTF.

Article 2 : Extracellular cleavage of the p75 neurotrophin receptor is implicated in its pro-survival effect in breast cancer cells.



Extracellular cleavage of the p75 neurotrophin receptor is implicated in its pro-survival effect in breast cancer cells



Stéphanie Verbeke^{a,b,1}, Elisa Tomellini^{a,b,1}, Fatima Dhamani^{a,c}, Samuel Meignan^{a,b}, Eric Adriaenssens^{a,c}, Le Bourhis Xuefen^{a,b,*}

^a Université Lille 1, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2013

Revised 14 June 2013

Accepted 24 June 2013

Available online 4 July 2013

Edited by Lukas Huber

Keywords:

p75^{NTR}

Regulated proteolysis

Survival

Breast cancer cell

ABSTRACT

The p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) undergoes sequential proteolytic cleavages leading to the generation of a carboxyl-terminal fragment (p75^{NTR}-CTF) and an intracellular domain (p75^{NTR}-ICD) in many cellular models. We have previously shown that p75^{NTR} is involved in the survival of breast cancer cells. Here, we demonstrated that p75^{NTR} cleavage occurs also in these cells. Surprisingly, p75^{NTR}-CTF increased cell survival, whereas p75^{NTR}-ICD had no effect. The pro-survival effect of p75^{NTR}-CTF was associated with a decrease of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced PARP and caspase 3 cleavages. Finally, our findings indicate that p75^{NTR} could favor cell survival via its carboxyl-terminal fragment, independently of PI3-kinase, NF-κB, or MAP kinase signaling pathways.

© 2013 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

p75 Neurotrophin receptor (p75^{NTR}) is the common receptor for all the neurotrophins (NGF, BDNF, NT-3 and NT-4) and their precursors. It is a member of the TNF receptor superfamily that includes the Fas (CD95) antigen, CD30, and CD40. This family of receptors is distinguished with multiple cysteine-rich domains for ligand binding, a single transmembrane sequence, and a non-catalytic cytoplasmic domain containing a death domain sequence [1]. Since its identification and cloning in the 1980s, p75^{NTR} has been reported to be involved in diverse and often contradictory functions such as survival, apoptosis, neurite outgrowth, differentiation, proliferation and migration, depending on the cell type and cellular context [1,2]. In some cases, p75^{NTR} is an inducer of apoptosis, even without NGF stimulation [3], whereas in other cases the activation of p75^{NTR} by NGF results in a protection from

cell death [4]. p75^{NTR}, through a neurotrophin-dependent mechanism, dramatically enhances migration and invasion of melanoma and glioma cells [5,6]. We have shown that p75^{NTR} favors survival of breast cancer cells [7–9].

p75^{NTR} exerts its diverse effects through several signaling pathways including Ras homolog gene family, member A (RhoA), Jun N-terminal kinase (JNK), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor kappa B (NFκB) [2]. These pathways are shown to be activated by upstream proteins that directly associate with various regions of the p75^{NTR} intracellular domain. For example, guanine nucleotide dissociation inhibitor, ribosome-inactivating protein-2 (RIP-2), is able to associate with the death domain of p75^{NTR}; tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF), can associate with the juxtamembrane region of p75^{NTR}; PDZ-containing protein Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) can associate with the C-terminal Ser-Pro-Val [10]. In addition to associating with signaling molecules, p75^{NTR}, like an increasing number of proteins including β-amyloid precursor protein (APP) and Notch, undergoes regulated two-step proteolysis. Full-length p75^{NTR} is initially cleaved in its extracellular juxtamembrane domain, leading to the release of the neurotrophin-binding extracellular domain and the production of a membrane-bound carboxyl-terminal fragment (CTF) [11]. The enzyme responsible for this cleavage is the tumor necrosis factor-α-converting enzyme

Abbreviations: FBS, fetal bovine serum; CTF, carboxyl-terminal fragment; ICD, intracellular domain; RIP, regulated intramembrane proteolysis; PS, presenilin; ADAM, a disintegrin and metalloprotease; TAPI, tumor necrosis factor-α protease inhibitor; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand

* Corresponding author. Address: INSERM U908, Batiment SN3, University of Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France. Fax: +33 (0)3 20 43 40 38.

E-mail address: xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr (L.B. Xuefen).

¹ These authors contributed equally to this work.

(TACE/ADAM-17), a disintegrin metalloprotease [12]. Following the first cleavage, the transmembrane domain is then cleaved by presenilin-dependent γ -secretase activity, yielding a soluble intracellular fragment (ICD) [11]. These cleavages may regulate the abilities of the membrane bound C-terminal fragment and the intracellular domain to interact with downstream partners, explaining the diversity of functions mediated by p75^{NTR} [13].

In this work, we first determined if p75^{NTR} underwent regulated proteolysis in breast cancer cells and then evaluated the impact of p75^{NTR} proteolysis in p75^{NTR}-mediated cellular survival. Our results indicate that p75^{NTR} proteolysis does occur in breast cancer cells. Moreover, the product of first cleavage (CTF) is involved in p75^{NTR}-mediated survival while the product of second cleavage (ICD) has no effect.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Tumor necrosis factor- α protease inhibitor 1 (TAPI-1), compound E, LY294002, PD98059, BAY117082 and MG132 were purchased from Calbiochem. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and hepatocyte growth factor (HGF) were purchased from R&D system.

2.2. Cell culture and transfection

MDA-MB-231 and BT-20 breast cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were routinely maintained in monolayer cultures in minimal essential medium (MEM) (Gibco®) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Perbio). The inducible p75^{NTR} overexpressing MDA-MB-231 cells were established as described previously [8], and p75^{NTR} overexpression was induced by treating cells with ponasterone A (PA; Sigma Aldrich®) 10 μ M for 24 h. To test the effect of p75^{NTR} cleavages, breast cancer cells were transfected by nucleofection (Amaxa®) with siRNA against ADAM17 5'-GGAAGCUGACCGUU-ACAACUCAU-3', or presenilin 1 (PS1) 5'-AAGGUCCACUUCGUAUG-CUGGT-3', or control siRNA 5'-GCUGACCCUGAAGUUAUC-3' according to manufacturer's instructions. Cells were then cultured for 24 h before PA induction. For transient expression experiments, MDA-MB-231 cells (3×10^5 cells/well) were seeded in six-well dishes. Transfections were performed using Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. For luciferase activity assay, 100 ng of κ B luciferase reporter construct and 25 ng of normalizing vector pRLnull was cotransfected with 1 μ g of DNA of interest. Cells were incubated with the reagents for 5 h at 37 °C before the culture medium was replaced with fresh one for further culture. To measure the reporter activity, cells were harvested 24 h after transfection using a passive lysis buffer (Promega) and lysates were clarified by centrifugation. Luciferase assay was performed using a Luciferase assay system (Promega) and Luciferase activities were measured using a lumat LB 9501 (Berthold). Triplicate samples were performed in each experiment, and standard deviations (S.D.) are shown.

2.3. Plasmids

Vectors containing full length p75^{NTR} (p75^{NTR} wt), a chimeric receptor in which the transmembrane domain of the FasR was introduced into p75^{NTR} (P3) were generous gifts of Dr. Moses V. Chao [11]. The p75^{NTR}-ICD encoding vector was a generous gift of Dr. Philip A Barker [14]. p75^{NTR}-CTF was performed as following: CTF fragment was fused to GFP (green fluorescent protein) in pEGFP C1 vector (Promega) and GFP-CTF was cloned in phase with

transmembrane domain of p75^{NTR} in PCDNA3 vector. The normalizing vector pRLnull has no promoter sequence to drive expression of the Renilla luciferase gene and was purchased from Promega. The κ B luciferase reporter construct has five NF- κ B-responsive elements in tandem and was purchased from Stratagene.

2.4. Western blot

Cells were lysed in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100) and western blot was performed as previously described [8]. Anti-actin (sc-47778), anti-ERK2 (sc-154), anti-PARP (sc-7150) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti-PS1 (#3622), anti-TACE/ADAM17 (#3976), anti-cleaved caspase 3 (#9664), anti-AKT (#2920), anti-phosphoAKT (#4060), anti-phosphoERK (#91065) antibodies were purchased from Cell Signalling Technology. Anti-p75^{NTR} (G323A) antibody was purchased from Promega.

2.5. Measurement of cell survival or cell death

(i) Hoechst staining. After treatment by TRAIL (4 ng/ml for 4 h) or transfection, cells were fixed with ice-cold methanol (-20 °C) for 10 min and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) before incubation with 1 mg/ml Hoechst 33258 for 10 min at room temperature in the dark. Cells were then washed with PBS and mounted with coverslips using Glycergel (Dako). The apoptotic cells exhibiting condensed and fragmented nuclei were counted under an Olympus-BH2 fluorescence microscope in randomly selected fields. (ii) Flow cytometry analysis. 48 h after transfection of p75^{NTR} derived-vectors, cells were treated with TRAIL, washed and stained with 50 μ g/ml propidium iodide (PI) (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Cell death was

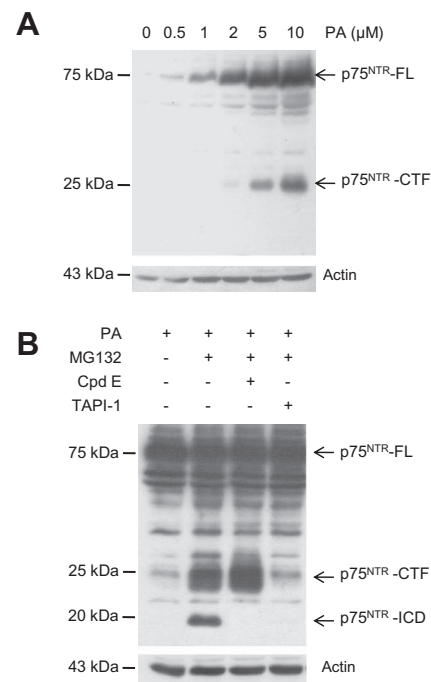


Fig. 1. Western blot detection of p75^{NTR} proteolytic processing in MDA-MB-231 breast cancer cells. (A) Cells were treated with different concentrations of pronasterone A (PA) during 24 h for the detection of p75^{NTR}-FL and p75^{NTR}-CTF. (B) Effect of MG132 (proteasome inhibitor), compound E (γ -secretase inhibitor) and TAPI-1 (MMPs/ADAMs inhibitor) on p75^{NTR} processing. Cells were treated with 10 μ M PA for 24 h and then treated for 1 h with 5 μ M MG132, 1 μ M compound E, or 10 μ M TAPI-1. Actin was used as a loading control.

measured by flow cytometry analysis (CyAn™ ADP Analyzer-Beckman Coulter) of PI positive cells.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using unpaired Student's *t*-test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. p75^{NTR} is sequentially cleaved in breast cancer cells

The regulated intramembrane proteolysis (RIP) of p75 receptor has been widely described in neurons. It involves two sequential cleavages of full length p75^{NTR}, generating a membrane-bound C-terminal fragment (CTF) and a soluble intracellular fragment ICD [13]. We previously established a p75^{NTR} overexpressing breast cancer cell model in which p75^{NTR} functions to promote cell survival [8]. We therefore wanted to determine whether intramembrane proteolysis of p75^{NTR} could occur in these cells. We performed Western blot using a p75^{NTR} cytoplasmic-specific antibody. As shown in Fig. 1A, treatment of cells with PA induced the expression of full length p75^{NTR} protein (p75^{NTR}-FL) in a dose dependent manner. Moreover, the levels of 25 kDa CTF fragment were also increased in parallel (Fig. 1A). In order to detect the

intracellular domain, which ordinarily undergoes rapid proteasome degradation, we treated cells with a proteasome inhibitor (MG132) as previously described [15]. As shown in Fig. 1B a 20 kDa fragment corresponding to the p75^{NTR}-ICD was detected upon MG132 treatment. Next, we verified that these fragments were the results of sequential cleavages by using an inhibitor of metalloproteases and a disintegrin and metalloproteases (ADAMs) (TAPI-1) and a γ -secretase inhibitor (compound E). Western blot analysis revealed that treatment of cells with compound E led to the disappearance of the 20 kDa fragment (p75^{NTR}-ICD) with a concomitant accumulation of the 25 kDa fragment (p75^{NTR}-CTF), whereas TAPI-1 (impairing the first cleavage) treatment resulted to the lack of both p75^{NTR}-CTF and p75^{NTR}-ICD (Fig. 1B). These results demonstrate that extracellular cleavage of p75^{NTR} in MDA-MB-231 breast cancer cells precedes intracellular cleavage as it has been previously shown in neurons [13].

3.2. Extracellular cleavage is involved in p75^{NTR}-induced survival of breast cancer cells

Proteolytic processing of p75^{NTR} generates an ICD fragment, which is involved in the activation of downstream events and the biological functions of p75^{NTR} [13]. To test whether the processing of p75^{NTR} has a functional role in breast cancer cell survival, we pre-treated MDA-MB-231 cells with PA to induce

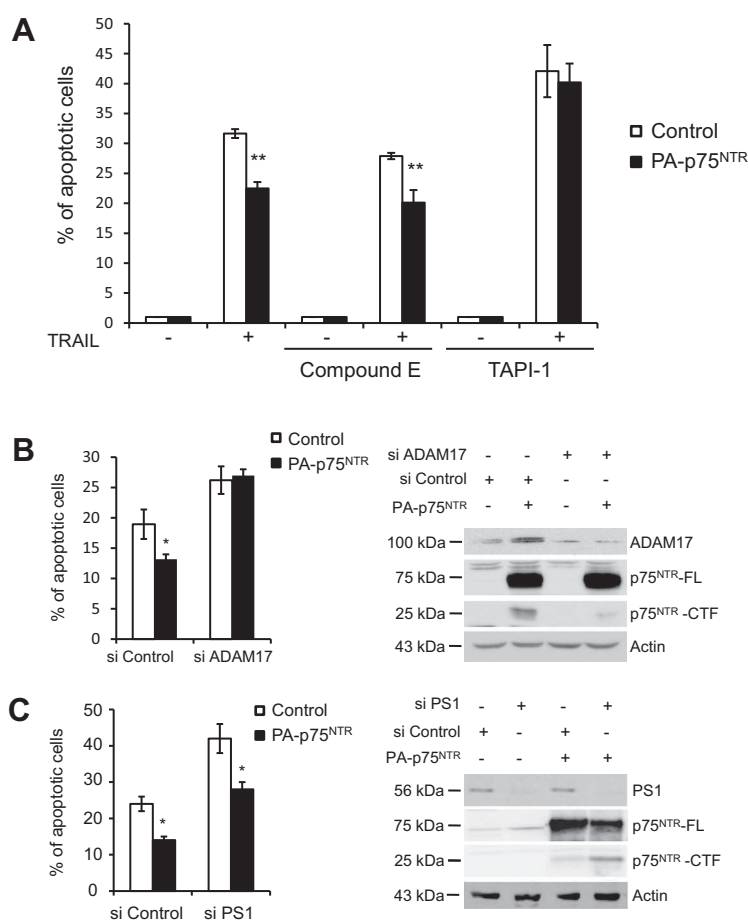


Fig. 2. Effect of cleavage inhibitors on p75^{NTR} antiapoptotic activity. (A) MDA-MB-231 cells were treated with PA for 24 h and then treated with compound E or TAPI-1 for 1 h before induction of apoptosis with TRAIL (4 ng/ml, 4 h). Apoptosis was detected as described in materials and methods. Experiments were performed in triplicate and results are expressed as the means \pm S.D. of three separate experiments. Significance was determined using the student *t*-test (** $P < 0.01$). (B and C) Cells were transfected with siRNAs against ADAM17 or presenilin 1 (PS1) and then treated with PA as described in materials and methods. Apoptosis was detected as described above. Significance was determined using the student *t*-test (* $P < 0.05$). Efficiency of siRNAs was verified by Western blot.

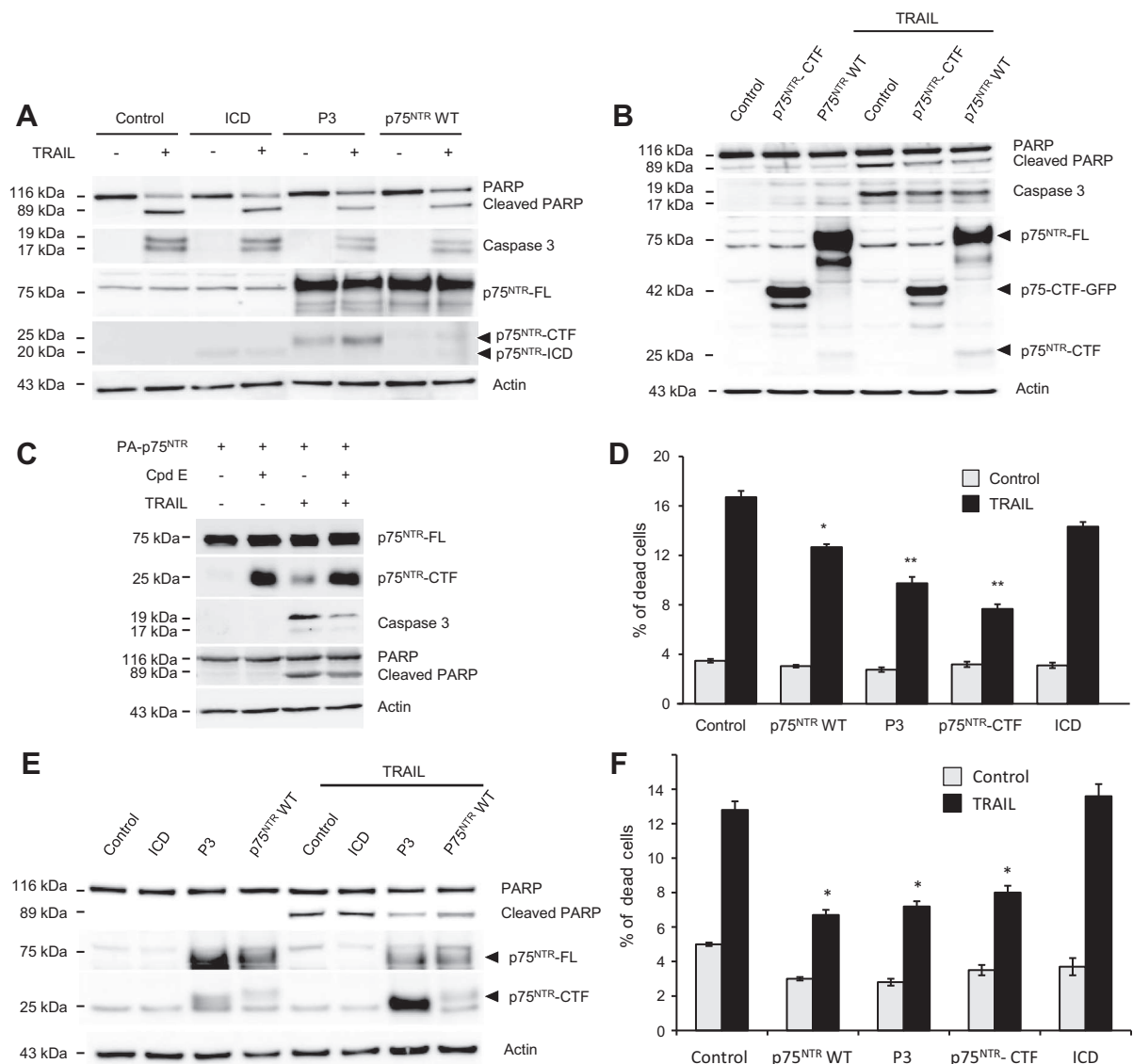


Fig. 3. Effects of p75^{NTR} fragments on TRAIL-induced cell death. (A and B) MDA-MB-231 cells were transfected with control vector, ICD, P3, p75^{NTR} wt or p75^{NTR}-CTF encoding vectors. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with 4 ng/ml TRAIL for 4 h. PARP and caspase 3 cleavages were analyzed by Western blot. Actin was used as loading control. (C) MDA-MB-231 cells were treated with PA for 24 h and then treated with compound E for 1 h before induction of apoptosis with TRAIL (4 ng/ml, 4 h). Western blot analysis was performed to detect the cleavage of PARP and caspase 3. (D) MDA-MB-231 cells were transfected with different forms of p75^{NTR}. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with 4 ng/ml TRAIL for 4 h before analysis of cell death (PI-positive cells) by flow cytometry. Experiments were performed in triplicate and results are expressed as the means \pm S.D. of two separate experiments. Significance was determined using the student *t* test (**P* < 0.05; ***P* < 0.01). (E) Western blot analysis of PARP cleavage in BT-20 breast cancer cells. Cells were transfected with indicated vectors and then treated with TRAIL before Western blot analysis. (F) Evaluation of cell death in BT-20 cells. Experiments were performed as described in Fig. 3D.

p75^{NTR} overexpression (PA-p75^{NTR}) before apoptosis induction with TRAIL, with or without inhibition of PA-p75^{NTR} cleavage. Apoptosis induction by TRAIL is measured after Hoechst staining. As shown in Fig. 2A, inhibition of γ -secretase by compound E had no effect on the pro-survival effect of PA-p75^{NTR} whereas TAPI-1 abolished this effect. To further confirm these results, we attempted to specially inhibit ADAM17 or presenilin 1 (PS1), a member of γ -secretase multiprotein complex, by using siRNAs.

As shown in Fig. 2B, knock-down of ADAM17 by specific siRNA decreased p75^{NTR}-CTF and abolished the anti-apoptotic effect of PA-p75^{NTR} in MDA-MB-231 cells. On the other hand, knock-down of PS1 increased p75^{NTR}-CTF and preserved PA-p75^{NTR}-mediated cell survival (Fig. 2C). The efficacy of siRNAs was verified by Western blot (Fig. 2B and C). These results showed that inhibition of the first cleavage abolished the pro-survival effect of PA-p75^{NTR} whereas inhibition of the second cleavage had no effect.

3.3. p75^{NTR}-CTF is able to protect breast cancer cells against TRAIL-induced cell death

To further prove that p75^{NTR} proteolysis is involved in breast cancer cell survival, we transfected MDA-MB-231 cells with p75^{NTR} wt encoding vector, a p75^{NTR} chimeric construct containing Fas transmembrane region (P3), a p75^{NTR}-ICD or p75^{NTR}-CTF encoding vector. After transfection, cell lysates were analyzed by Western blot. A reduction of PARP and caspase 3 cleavages was observed in cells transfected with p75^{NTR}, P3, or p75^{NTR}-CTF (Fig. 3A and B), suggesting that these cells were more resistant to TRAIL-induced apoptosis. Similarly, when PA-induced p75^{NTR} overexpressing cells are treated with compound E to avoid CTF cleavage into ICD fragment, a reduction of PARP and caspase 3 cleavages was also observed (Fig. 3C). In contrast, ICD expression did not modify the cleavage of either PARP or caspase 3 (Fig. 3A). We then quan-

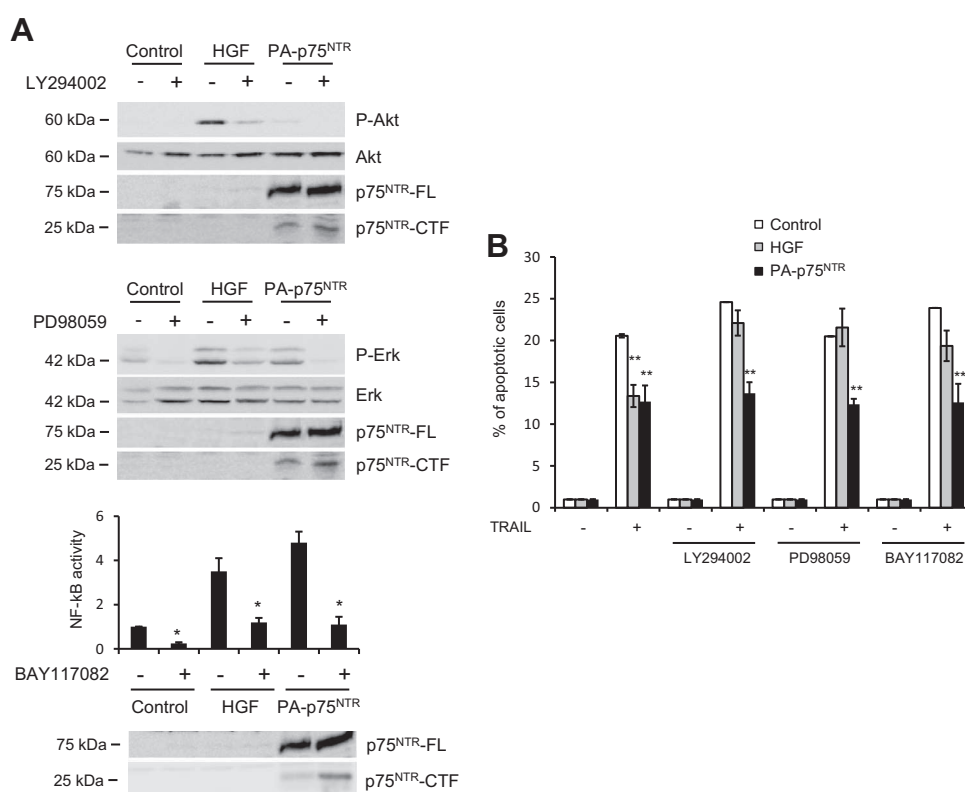


Fig. 4. Implication of PI3-kinase, MAP kinase and NF- κ B pathways on the pro-survival effect of p75^{NTR}. (A) MDA-MB-231 cells were treated PA for 24 h to induce p75^{NTR} expression. Cells treated with HGF were used as positive controls. The efficiency of inhibitors of PI3-kinase (LY294002), MAP kinase (PD98059) and NF- κ B (BAY117082) was assessed by Western blot or *luciferase* activity as described in Section 2. Luciferase activity was measured and reported to cells cultured in the absence of BAY117082. Experiments were performed in triplicate and results are expressed as the means \pm S.D. (B) MDA-MB-231 cells were treated with TRAIL in the presence or absence of pharmacological inhibitors. Experiments were performed in triplicate and results are expressed as the means \pm S.D. of three separate experiments. Significance was determined using the student *t* test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

tified cell death by flow cytometry analysis after incorporation of propidium iodide (Fig. 3D). We found that p75^{NTR} WT, P3 (unable to generate ICD) and p75^{NTR}-CTF decreased cell death whereas ICD had no effect. When another BT-20 breast cancer cell line was analyzed after transfection with different p75^{NTR} encoding vectors, similar results were obtained in terms of both PARP cleavage (Fig. 3E) and cell survival (Fig. 3F) upon TRAIL treatment. Together, these findings indicated that p75^{NTR}-CTF alone could exert the pro-survival effect in breast cancer cells.

3.4. Pro-survival effect of p75^{NTR} is independent of PI3-kinase, MAP kinase and NF- κ B pathways

p75^{NTR} has been described to exert its diverse biological effects by activating several pathways including PI3-kinase, MAP kinase and NF- κ B pathways [2]. To precise the mechanism of action of p75^{NTR} in our model, we pre-treated MDA-MB-231 cells with PA to induce p75^{NTR} overexpression (PA-p75^{NTR}) before addition of pharmacological inhibitors of PI3-kinase (LY294002), MAP kinase (PD98059), or NF- κ B (BAY117082). HGF (hepatocyte growth factor), well described for the activation of the above signaling pathways and pro-survival effect [16], was used as a positive control. As shown in Fig. 4A, PA-p75^{NTR} overexpression *per se* slightly increased the phosphorylation of Akt and Erk, but increased NF- κ B activity in a similar degree to the positive control (HGF). Treatment of cells with pharmacological inhibitors of PI3-kinase, MAP kinase or NF- κ B pathways efficiently abolished both PA-p75^{NTR} overexpression- and HGF-induced phosphorylation of Akt and Erk, as well as NF- κ B activation. p75^{NTR}-CTF was detected whatever the presence of pharmacological inhibitors. We then tested the anti-apop-

otic effect of PA-p75^{NTR} by treating MDA-MB-231 cells with TRAIL in the presence of specific signaling pathway inhibitors (Fig. 4B). Both PA-p75^{NTR} overexpression and HGF treatment were able to diminish TRAIL-induced apoptosis. Interestingly, inhibition of PI3-kinase, MAP kinase and NF- κ B pathways abolished the pro-survival effect of HGF but did not modify the pro-survival effect of PA-p75^{NTR}. Moreover, in cells transfected with different p75^{NTR} encoding vectors, no modification of pAkt or pErk was detected whatever the expressed forms of p75^{NTR} (data not shown). These results, together with the above results shown in Fig. 3, indicate that the pro-survival effect of p75^{NTR} was due to p75^{NTR}-CTF, which could act in a manner independent of PI3-kinase, MAP kinase and NF- κ B pathways.

4. Discussion

The role of p75^{NTR} in tumorigenesis is still controversial. It has been proposed as a potential tumor suppressor in carcinomas of prostate, bladder, stomach and liver. In these cancers, p75^{NTR} is downregulated and ectopic re-expression of p75^{NTR} inhibits cell proliferation [17] and induces apoptosis [18]. In other cancers including melanoma, pancreatic carcinoma, glioma and breast cancer, p75^{NTR} exerts rather a tumor-promoting function by favoring survival and invasion of cancer cells [9,19,20]. We have previously demonstrated that neurotrophins (NGF, BDNF and NT-4/5) and their common receptor p75^{NTR} are overexpressed in breast cancers [7,9,21]. Ectopic overexpression of p75^{NTR} increases cell survival *in vitro* and tumor growth in xenograft mouse model [8], while inhibition of p75^{NTR} decreases cell survival *in vitro* and tumor growth in xenograft mouse model [9].

To further investigate the role of p75^{NTR} in breast cancer cell growth, we established a model of inducible expression of p75^{NTR} using MDA-MB-231 breast cancer cells [8]. We demonstrated here that p75^{NTR} underwent regulated two-step proteolysis in breast cancer cells as described in other types of cells. Moreover, we found that the product of the first cleavage (CTF) was involved in p75^{NTR}-mediated survival while the product of the second cleavage (ICD) had no effect. Our findings are consistent with the increasing data reporting the importance of regulated proteolysis of p75^{NTR} in the diverse functions of p75^{NTR} [13]. In general, the CTF fragment is considered as an intermediary product which is converted to the soluble ICD fragment, able to activate different signaling pathways to promote survival, cell death or even cell invasion. For example, it has been shown that the p75^{NTR}ICD increases basal Akt phosphorylation in PC12 cells if highly overexpressed [22]. More recently, it has been described that in PC12 cells and in primary cerebellar granule neurons, NGF activation of TrkA leads to ADAM17 phosphorylation and generation of the p75^{NTR}ICD, which in turn activates Erk and Akt survival signaling [23].

However, it has been also reported that the membrane-associated CTF can promote cell death in neurons when over-expressed in a form that cannot be cleaved to generate the ICD [24]. In these cases, CTF is found to be translocated to cholesterol-rich domains of the plasma membrane, where CTF exerts its death-inducing effect due to the presence of the cytoplasmic juxtamembrane region known as the 'Chopper domain'. The second cleavage by γ -secretase avoids cell death in these conditions [25].

p75^{NTR} exerts its diverse effects through several signaling pathways include Ras homolog gene family, member A (RhoA), Jun N-terminal kinase (JNK), mitogen-activated protein kinase (MAPK), NF- κ B [2]. However, in our model, inhibition of well-known survival pathways such as PI3-kinase, NF- κ B, MAP kinase did not impair the pro-survival effect of p75^{NTR}.

Although more basic studies are clearly needed to understand the mechanism of action of p75^{NTR}, our results emphasized the crucial role of p75^{NTR} processing in its pro-survival function. To our knowledge, this is the first report describing a survival role of p75^{NTR}-CTF. The ADAM metalloproteinase disintegrins, including ADAM17 and ADAM10, have been described as prominent sheddases for p75^{NTR} as well as other transmembrane type-1 receptors. In this study, we observed that ADAM17 inhibition by siRNA approach or pharmacological inhibitor abolished the pro-survival effect of p75^{NTR} in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells. Interestingly, ADAM17 is found to be overexpressed in triple-negative breast cancer [26]. We can hypothesize that co-expression of both ADAM17 and p75^{NTR} would favor the generation of p75^{NTR}-CTF and enhance tumor resistance to drugs. Our results provide thus a rationale to consider p75^{NTR} as a potential target for the future design of innovative therapeutic strategies.

Acknowledgements

This study was supported by Grants from l'INSERM, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, l'Association de Recherche Contre le Cancer, la Ligue Contre le Cancer du Septentrion, La Région Nord-Pas-de-Calais and Siric OncolLille.

References

- [1] Roux, P.P. et al. (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* 67, 203–233.
- [2] Dollé, L. et al. (2004) Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 4, 463–470.
- [3] Rabizadeh, S. et al. (1993) Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261, 345–348.
- [4] Gentry, J.J. et al. (2000) Nerve growth factor activation of nuclear factor kappaB through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J. Biol. Chem.* 275, 7558–7565.
- [5] Herrmann, J.L. et al. (1993) Mediation of NGF-stimulated extracellular matrix invasion by the human melanoma low-affinity p75 neurotrophin receptor: melanoma p75 functions independently of trkA. *Mol. Biol. Cell* 4, 1205–1216.
- [6] Johnston, A.L. et al. (2007) The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *PLoS Biol.* 5, e212.
- [7] Descamps, S. 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.
- [8] Verbeke, S. et al. (2010) Overexpression of p75(NTR) increases survival of breast cancer cells through p21(waf1). *Cell. Signal.* 22, 1864–1873.
- [9] Vanhecke, E. 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.
- [10] Underwood, C.K. et al. (2008) The p75 neurotrophin receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1664–1668.
- [11] Zampieri, N. et al. (2005) Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains. *J. Biol. Chem.* 280, 14563–14571.
- [12] Weskamp, G.W. 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.
- [13] Skeldal, S. et al. (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.
- [14] Ceni, C. et al. (2010) The p75NTR intracellular domain generated by neurotrophin-induced receptor cleavage potentiates Trk signaling. *J. Cell Sci.* 123, 2299–2307.
- [15] Foveau, B. et al. (2009) Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Mol. Biol. Cell* 20, 2495–2507.
- [16] Tulasne, D. et al. (2008) The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ.* 15, 427–434.
- [17] Jin, H. et al. (2007) P75 neurotrophin receptor inhibits invasion and metastasis of gastric cancer. *Mol. Cancer Res.* 5, 423–433.
- [18] Khwaja, F.S. et al. (2008) Carprofen induction of p75NTR-dependent apoptosis via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3539–3545.
- [19] Marchetti, D. et al. (2004) P75 neurotrophin receptor functions as a survival receptor in brain-metastatic melanoma cells. *J. Cell. Biochem.* 91, 206–215.
- [20] Wang, L. et al. (2008) Gamma-secretase represents a therapeutic target for the treatment of invasive glioma mediated by the p75 neurotrophin receptor. *PLoS Biol.* 6, e289.
- [21] Adriaenssens, E. et al. (2008) Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 68, 346–351.
- [22] Roux, P.P. et al. (2001) The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 23097–23104.
- [23] Kommaddi, R.P. et al. (2011) Trk-dependent ADAM17 activation facilitates neurotrophin survival signaling. *FASEB J.* 25, 2061–2070.
- [24] Underwood, C.K. et al. (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.
- [25] Coulson, E.J. 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.
- [26] McGowan, P.M. et al. (2013) ADAM-17: a novel therapeutic target for triple negative breast cancer. *Ann. Oncol.* 24, 362–369.

Discussion et Perspectives

Discussion

Malgré les progrès considérables dans la compréhension des mécanismes moléculaires du développement du cancer du sein, la nature multifactorielle de la cancérogenèse mammaire, ainsi que la diversité cellulaire et moléculaire au sein des tumeurs, ont empêché le développement de stratégies ciblées qui peuvent être appliquées à une large gamme de tumeurs. Le taux de rechutes à 10 ans du traitement reste important et, en général, une élimination incomplète des cellules tumorales en est la cause. La découverte du rôle des cellules souches cancéreuses dans les phénomènes de résistance et de dormance tumorale a démontré la nécessité de nouvelles approches thérapeutiques basées sur une meilleure compréhension des mécanismes liées aux phénomènes de tumorigenèse, de métastase et de quiescence cellulaire (Kakarala and Wicha, 2008).

A la lumière des résultats obtenus dans mes deux laboratoires d'accueil sur le rôle des neurotrophines dans le cancer du sein (U908) et sur le rôle clé des cellules souches cancéreuses dans le développement tumoral (U837), nous avons formulé l'hypothèse que le NGF et le proNGF sécrétés par les cellules cancéreuses de sein pouvaient constituer une partie intégrante de la niche des cellules souches cancéreuses, avec une action directe sur le développement et le phénotype tumoraux.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence l'intervention du NGF et du proNGF dans la biologie des cellules souches du cancer du sein. En particulier, nous avons montré que le NGF et le proNGF peuvent agir à plusieurs niveaux dans le compartiment des CSC, en stimulant leur autorenouvellement et en induisant un enrichissement la fraction des CSC activées et quiescentes. De façon intéressante, nous avons observé que, bien que le NGF et son précurseur semblent avoir des effets équivalents *in vitro* sur la population de CSC, des cellules prétraitées avec ces deux facteurs ne produisent pas les mêmes effets *in vivo*. Ainsi, nous discuterons les effets induits par le NGF et le proNGF *in vitro* sur le compartiment des cellules souches et leur implication probable sur la régulation de la balance entre cellules quiescentes et cellules activées. Dans un deuxième temps nous analyserons la signalisation induite par ces neurotrophines sur les cellules souches, le rôle du récepteur p75^{NTR} ainsi que l'implication de cette signalisation dans les effets différentiels observés *in vivo*.

1. NGF et proNGF stimulent l'autorenouvellement des CSC de sein

Pour étudier le rôle du NGF et du proNGF sur le cancer du sein, nous avons d'abord évalué leur action sur la formation de sphères et sur l'activité de l'enzyme aldéhyde déshydrogénase sur trois lignées de cancer du sein, les cellules MCF-7 et T47D, de type luminal et hormono-sensibles, ainsi que les BT-20, du type basal, n'exprimant pas les récepteurs aux hormones. Les effets de ces neurotrophines ont ensuite été approfondis sur la lignée MCF-7, un modèle cellulaire utilisé dans de nombreuses études et donc bien caractérisé.

Nous avons montré que le traitement au NGF et au proNGF en condition de sphères induit un enrichissement de la fraction des CSC dans les trois lignées cellulaires. L'action de ces neurotrophines sur le compartiment de CSC ne semble donc pas être influencée par le sous-type cellulaire ni par le statut hormonal, laissant supposer une action plus générale sur des CSC bipotents.

L'enrichissement en CSC a été évalué par l'augmentation du pourcentage de sphères formées et du pourcentage des cellules présentant une activité de l'enzyme ALDH. L'enzyme ALDH est considéré comme un bon marqueur des cellules souches mammaires normales et cancéreuses, où il semble être impliqué dans les mécanismes de résistance aux agents génotoxiques (Ginestier et al., 2007; Moreb, 2008). L'augmentation de la proportion de cellules ALDH⁺ a été corrélée au mauvais pronostic dans les cancers du sein (Charafe-Jauffret et al., 2009), ainsi que dans plusieurs autres cancers solides, comme le cancer de la prostate et le cancer de l'ovaire (Le Magnen et al., 2013; Silva et al., 2011). Plusieurs équipes ont caractérisé les cellules ALDH⁺ arrivant à la conclusion que ces cellules correspondraient pour la plupart à des cellules souches activées (*Short-Term stem cells*, ST-SC), positives pour le marqueur de prolifération Ki67 (Morimoto et al., 2009; Muzio et al., 2012).

L'expansion des CSC observée à la suite des traitements au NGF ou au proNGF pourrait donc être une conséquence de leur action sur la fraction des cellules souches activées, en stimulant directement leur autorenouvellement. Cependant, NGF et proNGF pourraient aussi agir sur une fraction de CSC quiescentes (*long-term stem cells*, LT-SC), induisant la transition vers un état activé et, par conséquent, l'activation de l'aldéhyde déshydrogénase et leur autorenouvellement.

2. NGF et proNGF agissent sur la balance entre quiescence et prolifération des cellules souches cancéreuses

Etablir sur quelle fraction des CSC (LT-SC ou ST-SC) agit un traitement représente un enjeu majeur. En effet, l'action sur le compartiment des CSC peut donner lieu à des réponses très différentes sur le long terme. Par exemple, une action trop importante sur l'activation des cellules quiescentes ainsi qu'une action sur la différenciation pourraient amener à l'épuisement de la fraction des CSC. Au contraire, une induction de la quiescence peut être à l'origine des phénomènes de dormance tumorale.

Nous avons donc évalué les effets du NGF et du proNGF sur les cellules en quiescence ou en prolifération ralentie. Pour cela, nous avons développé un outil d'analyse permettant de suivre les divisions cellulaires au sein d'une population, grâce à l'induction de l'expression d'une protéine de fusion entre l'histone 2B et la GFP. Suite à l'activation par la tétracycline, la fluorescence de la GFP est perdue au fur et à mesure des divisions cellulaires. Les effets du NGF et du proNGF ont été évalués en comparant les cellules n'ayant pas ou peu divisé (fraction GFP⁺) et les cellules ayant subi plusieurs divisions avec la perte totale de la fluorescence (fraction GFP⁻). Nous avons ainsi montré que la fraction GFP⁺ forme nettement plus de sphères que la fraction négative, ceci confirme des données de la littérature sur le potentiel d'autorenouvellement des cellules à prolifération ralentie (Cicalese et al., 2009). De plus, le NGF et le proNGF augmentent de façon significative le pourcentage des sphères formées à partir des cellules GFP⁺, sans aucune action sur la fraction négative. Ces résultats suggèrent que le NGF et le proNGF enrichissent la fraction des CSC en induisant l'activation des cellules souches quiescentes.

Par analyse en RT-PCR, nous avons pu confirmer que la fraction GFP⁺ présente des caractéristiques de cellules souches telles que la surexpression des facteurs de pluripotence Sox-2 et Oct-4 et du récepteur CD44. La surexpression d'Oct-4 par la fraction GFP⁺ est en accord avec les données de la littérature sur le rôle de ce facteur de transcription dans la dormance des CSC mammaires (Patel et al., 2012).

De façon intéressante, nous avons aussi observé un nombre bien plus important de cellules GFP⁺ dans les sphères obtenues à partir de la population totale (non trié) des MCF-7 H2B-GFP suite au traitement avec le NGF et le proNGF. Cette accumulation de cellules GFP⁺ a été confirmée dans les lignées BT-20 et T47D, stablement transfectées avec le plasmide H2B-GFP, mais aussi par l'évaluation de la fraction de cellules en G0 par analyse du cycle

cellulaire des cellules marquées à l'iodure de propidium et au Ki67. Ces résultats montrent que le NGF et le proNGF, non seulement induisent l'activation de cellules quiescentes, mais sont aussi capables d'induire la quiescence dans une fraction cellulaire. Ces résultats, à première vue contradictoires, peuvent être expliqués par la mise en place d'un équilibre entre la fraction des cellules souches quiescentes et la fraction des cellules souches activées, régulée par le NGF et le proNGF. En effet, suite à l'activation des cellules quiescentes, l'enrichissement des CSC activées pourrait pousser une partie de ces cellules à retourner en quiescence (Glauche et al., 2009).

Nous avons vu dans l'introduction que les cellules souches se divisent principalement de façon asymétrique, ce qui garantit le maintien de la population des cellules souches et, simultanément, la production des cellules plus spécialisées. Lorsque des changements dans l'homéostasie cellulaire surviennent, la fraction des cellules souches peut s'accroître par division symétrique, générant deux cellules souches identiques à la cellule d'origine. L'augmentation des divisions symétriques au détriment des divisions asymétriques pourrait, dans notre cas, expliquer l'enrichissement en CSC et, en parallèle, le pourcentage élevé des cellules GFP⁺. En effet, nous avons observé une diminution de Numb et de la Cycline D2 dans les cellules issues des sphères traitées avec du NGF ou du proNGF. Numb et Cycline D2 sont réparties de façon inégale lors de la division asymétrique (Pece et al., 2011; Tsunekawa and Osumi, 2012), et la protéine Numb, en particulier, joue un rôle fondamental dans l'établissement du destin des cellules filles lors de la division des cellules souches. D'un point de vue moléculaire, Numb agit en inhibant directement Notch, un des facteurs clé dans le maintien des cellules souches. Nos résultats suggèrent que le NGF et le proNGF pourraient agir sur la population des CSC en induisant une cascade de signalisation conduisant à une inhibition de Numb et une activation de la voie de signalisation Notch. En effet, il a été décrit que dans des cellules issues du sang du cordon ombilical, riche en cellules souches hématopoïétiques, le traitement au NGF induit l'expression de Musashi-1, inhibiteur de Numb (Sanchez-Ramos et al., 2001). Par ailleurs, des « cross-talks » entre les voies p75^{NTR}/NGF et Notch ont été décrits dans le contrôle de la morphologie des dendrites, conduisant à la transcription des gènes Hes-1 et -5 (*Homologue of enhancer of split-1, -5*) (Salama-Cohen et al., 2005). Hes-1, en particulier, est un répresseur transcriptionnel impliqué dans le maintien de la quiescence dans les CSC (Sang et al., 2010). Il serait, donc, intéressant d'approfondir la relation entre le NGF, le

proNGF et l'activation de la voie Notch dans les mécanismes de division des CSC et dans l'induction/maintien de la quiescence.

3. Implication du récepteur p75^{NTR}

Pour comprendre le mécanisme d'action du NGF et de son précurseur sur les CSC mammaires, nous avons cherché à évaluer l'implication de p75^{NTR}, récepteur commun au NGF et au proNGF, dans leurs effets *in vitro*. Nous avons ainsi constaté que l'enrichissement en sphères observé suite au traitement au NGF et au proNGF est aboli par l'inhibition du récepteur p75^{NTR} par siRNA. Dans notre étude, plusieurs facteurs de transcription liés au maintien de la pluripotence comme Sox2 et Nanog sont surexprimés suite au traitement au pro/NGF. De façon intéressante, nous avons pu remarquer que seulement le NGF est capable d'induire l'expression de Sox2, Nanog et c-Myc de façon p75^{NTR}-dépendant. p75^{NTR} semble important pour la formation des sphères, donc pour l'autorenouvellement des CSC. L'augmentation de l'expression de p75^{NTR} dans les cellules quiescentes (GFP⁺) suggère que le NGF et le proNGF pourraient induire initialement une activation des cellules quiescentes *via* p75^{NTR}.

Il a été reporté que p75^{NTR} est un marqueur de cellules myoépithéliales de sein (Popnikolov et al., 2005). Plus récemment, notre équipe a montré une action anti-apoptotique de p75^{NTR} dans les cellules de cancer du sein, ainsi qu'une action sur l'accumulation des cellules en G0/G1 du cycle cellulaire (Verbeke et al., 2010). Cependant, l'implication de p75^{NTR} dans les CSC mammaires est peu connue. Un seul article publié en 2012 a démontré la présence de caractéristiques assimilables à celles des CSC dans les cellules p75^{NTR}-positives triées à partir des biopsies tumorales et des lignées cancéreuses de sein (Kim et al., 2012). Pendant ma thèse, nous avons mis en lumière l'importance du clivage de p75^{NTR} par ADAM17/TACE dans l'induction d'un effet anti-apoptotique dans le cancer du sein. L'implication des clivages de p75^{NTR} dans les cellules souches reste à présent inconnue. Souvent, l'expression seule de p75^{NTR} par les cellules souches est liée au maintien d'un phénotype cellulaire et c'est l'interaction avec un ligand qui déclenche une réponse biologique aboutissant, par exemple, à la différenciation cellulaire. L'action du p75^{NTR}-CTF pourrait donc représenter un mécanisme utilisé par la cellule pour induire une signalisation constitutive de façon indépendante de la présence du ligand, ou, au contraire, pour empêcher la signalisation induite par le ligand.

Le récepteur p75^{NTR}, n'ayant pas d'activité catalytique propre, pourrait être impliqué dans la réponse biologique des neurotrophines, en activant des voies de signalisation différentes selon le contexte cellulaire (présence de ligands, de corécepteurs, de partenaires intracellulaires, clivage de p75^{NT}). En effet, il a été décrit que p75^{NTR} est un marqueur valable des cellules souches dans plusieurs modèles cellulaires, y compris dans les CSC de mélanome (Boiko et al., 2010). Dans ces cellules, p75^{NTR} est associé à plusieurs effets biologiques, comme la survie, le maintien de la pluripotence/multipotence, le maintien de la quiescence et l'induction de la différenciation. Ces effets pléiotropiques, sont imputables à la variété de signalisation associée à ce récepteur.

4. Action du NGF et du proNGF sur la croissance tumorale

L'enrichissement en CSC, ainsi qu'une augmentation de la fraction de cellules ALDH⁺, ont été associés au mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer du sein (Ginestier et al., 2007). Par injections en souris SCID, nous avons en effet observé qu'un traitement d'une semaine en condition des sphères par le NGF et le proNGF augmente la croissance tumorale et diminue la latence des tumeurs formées par des cellules MCF-7. De façon intéressante, seul le prétraitement au NGF a été capable d'induire la formation des métastases au niveau du foie, ainsi que une incidence plus élevée de métastases au niveau du poumon et du cerveau.

L'analyse des cellules tumorales des différentes conditions a révélé que les cellules issues des tumeurs « NGF » présentaient une morphologie fibroblast, une capacité migratoire accrue, ainsi que l'expression de marqueurs associés à une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). En effet, ces cellules présentent une augmentation de l'expression de la vimentine, normalement exprimée par les cellules mésenchymateuses, et une diminution de l'expression de la E-cadherine, de la kératine 18 et de la kératine 19, marqueurs épithéliaux, exprimés par les cellules luminales mammaires. Ce changement de phénotype s'accompagne d'un fort enrichissement en cellules CD44⁺/CD24⁻. Le phénotype CD44⁺/CD24⁻ a été associé à l'acquisition de propriétés migratoires par les CSC (Sheridan et al., 2006). Ces résultats montrent clairement que, bien que les effets biologiques immédiats *in vitro* du NGF et du proNGF soient similaires, les deux facteurs induisent une réponse très différente dans les expériences de xéno greffes *in vivo*.

L'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les cellules des tumeurs « NGF » pourrait être la conséquence d'une sélection cellulaire dans les expériences de xéno-greffes *in vivo*. Le traitement au NGF des mammosphères aurait induit dans certaines CSC des modifications conférant un avantage sélectif lors de la formation de la tumeur.

Dans les cellules souches embryonnaires, le maintien de la pluripotence et l'induction de la différenciation selon un lignage spécifique sont des processus finement contrôlés par un réseau de régulation transcriptionnelle (Boyer et al., 2005; Kim et al., 2008). Des réseaux analogues sont mis en place pour la régulation des cellules souches adultes et semblent être impliqués dans la transition entre les cellules souches normales et les cellules souches cancéreuses. Nous avons pu observer que plusieurs facteurs de transcription liés à la pluripotence ou à l'autorenouveau, comme Sox2, Nanog ou c-Myc sont différentiellement régulés par le NGF et le proNGF. Il est possible donc que ces facteurs de transcription forment des complexes différents, aboutissant aux changements phénotypiques observés.

Plusieurs travaux dans la littérature ont montré une corrélation entre la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et le compartiment des cellules souches (Mani et al., 2008). En particulier, un article récemment publié par Guo et collègues (2012), a montré que dans la hiérarchie des cellules souches mammaires murines la spécification vers la formation des progéniteurs luminaux ou basaux est établie par la présence des complexes transcriptionnels différents. Dans ces cellules, les facteurs Slug et Sox-9 régulent respectivement le programme de spécification basal et luminal, et la présence simultanée de deux facteurs est suffisante à induire l'activation d'un programme de différenciation basal dans une population où le programme luminal est établi par défaut. De plus, l'expression ectopique de Sox-9 et de Slug dans des MCF-7 induit un phénotype TEM dans ces cellules. Enfin, l'expression de ces deux facteurs de transcription dans des biopsies tumorales de cancer du sein est corrélée à une diminution significative du taux de survie (Guo et al., 2012). Dans notre étude, le NGF et le proNGF induisent tous les deux l'expression de Sox-2, mais le NGF seul augmente l'expression de Slug, de Nanog ou de c-Myc, laissant ouverte l'hypothèse qu'un circuit de régulation analogue à celui observé dans les cellules souches mammaires puisse être ici mis en place. De façon analogue aux observations de Guo, l'association de Slug et Sox-2 pourrait déterminer un changement du lignage des cellules souches présentes dans la lignée MCF-7, alors que la seule expression de Sox-2 garantirait le maintien d'une différenciation de type luminal.

Si l'on considère que le développement du cancer du sein suit une hiérarchie analogue à celle du développement de la glande mammaire, on pourrait donc supposer que le NGF et le proNGF agissent sur des cellules souches bipotentes, c'est-à-dire, capables de différencier en cellules à phénotype basal ou en cellules à phénotype luminal. Le NGF et le proNGF pourraient, ainsi, agir sur la spécification de cette cellule, en déterminant, respectivement, la formation de cellules myoépithéliales ou épithéliales.

En réalité, il faut considérer que le développement du cancer du sein ne suit pas une hiérarchie stricte de différenciation comme celle observée dans le développement de la glande mammaire normale. De plus, l'attribution d'une origine luminaire ou basale pour, respectivement, les sous-types luminaire et basal-like du cancer du sein n'est qu'une extrapolation liée à certaines caractéristiques phénotypiques communes entre ces cellules. De plus en plus de travaux, en effet, semblent démontrer que les deux sous-types de cancer du sein aient une même origine cellulaire avec un phénotype luminaire (Lim et al., 2009; Molyneux et al., 2010; Proia et al., 2011).

5. Effets du NGF et du proNGF sur des cellules cultivées en mammosphères à long terme

Bien que la culture des cellules MCF-7 en condition de sphères pour un temps prolongé (pendant plus de 20 générations) ne montre pas de différence en termes de formation des sphères quelles que soient les conditions, une proportion importante de ces cellules semble cependant avoir acquis certaines propriétés de cellules souches comme, par exemple, la surexpression du récepteur CD44 (dans sa forme standard et dans ses formes variantes à haut poids moléculaire), elles présentent des propriétés migratoires accrues *in vitro*, et forment plus rapidement des tumeurs chez les souris SCID, comparées aux cellules issues des sphères de la première génération.

De façon comparable aux résultats *in vivo* avec les cellules de la culture à court terme, les cellules issues de la culture à long terme présentent un phénotype mésenchymateux dans les tumeurs « NGF », alors qu'un phénotype épithélial semble être gardé dans les tumeurs « proNGF ». Ces résultats suggèrent que le proNGF semble contribuer au maintien d'un phénotype luminaire-like (et probablement plus primitif), alors que le NGF déterminerait la mise en place d'un phénotype plus basal-like. Nos résultats semblent donc démontrer que des cellules basal-like puissent dériver de cellules à phénotype luminaire. Cependant, à

l'heure actuelle il nous est impossible d'établir le phénotype de la (ou les) cellule(s) souche(s) originale(s). De la même façon, nous ne pouvons pas déterminer si le phénotype mésenchymateux observé est la conséquence d'une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules luminales différenciées ou d'un changement phénotypique plus en amont. Comme je l'ai répété plusieurs fois au cours de mon manuscrit, la limite principale dans l'étude des cellules souches cancéreuses est le manque de marqueurs précis qui définissent de façon univoque une CSC mammaire. Une étude plus approfondie sur le phénotype des cellules issues des sphères de 22^{ème} génération et de leur potentiel de différenciation permettrait d'approfondir la compréhension de la plasticité des cellules souches-« like » et leur rôle dans développement tumoral.

Perspectives

1. Une meilleure compréhension de l'implication du NGF et du proNGF dans la biologie des CSC nécessite une optimisation des approches méthodologiques

Dans notre étude nous avons vu qu'un traitement d'une semaine au NGF ou au proNGF des cellules en condition de sphères est suffisant à induire un enrichissement en mammosphères et en cellules ALDH⁺. Cependant cet enrichissement ne se reflète pas en une augmentation de la tumorigenèse *in vivo*, puisque toutes les conditions ont donné lieu à la formation de tumeur. En effet, cela trouve sûrement une explication dans le fait que 2×10^5 cellules représente une quantité de cellules trop élevée pour pouvoir évaluer l'enrichissement en CSC *in vivo*, surtout si on considère le paradigme « une cellule souche cancéreuse est capable de former une tumeur ».

Néanmoins, les différences phénotypiques observées au sein des tumeurs, ainsi que les différentes capacités métastatiques, montrent que le NGF et le proNGF présentent, en effet, une action différentielle sur ces cellules. Cependant, la forte hétérogénéité cellulaire au sein des sphères rend pratiquement impossible de déterminer les voies de signalisation induites par ces deux facteurs sur les CSC et liés au phénotype *in vivo*. L'impossibilité de travailler avec des populations de cellules souches cancéreuses « pures » pour l'absence de marqueurs spécifiques et pour les modifications dans la physiologie propres à toutes les cellules cancéreuses (§A.2.3), représente la limite principale dans l'étude des CSC. C'est pour cette raison que la culture en sphères, méthode qui a prouvé son efficacité pour la culture de cellules souches mammaires normales, a été récemment remise en cause pour

l'étude des cellules souches cancéreuses (Pastrana et al., 2011; Smart et al., 2013). Une approche de plus en plus répandue est celle d'isoler les CSC sur la base de leur propriétés fonctionnelles, comme la lente prolifération ou l'activité de l'ALDH (Tosoni et al., 2012). L'analyse de la signalisation induite par le pro/NGF en ces cellules isolées (cellules GFP+ et/ou ALDH+) pourrait donc représenter une approche intéressante.

Par ailleurs, une particularité du cancer du sein est la présence de sous-types cellulaires très différents, ayant des caractéristiques biologiques et un comportement clinique très divers (Perou et al., 2000; Polyak, 2007; Sørlie et al., 2001). Lors de la culture à long terme nous avons sélectionné trois populations cellulaires ayant des caractéristiques très différentes en termes de croissance tumorale, latence et phénotype cellulaire. Nous avons vu dans l'introduction que les cellules souches se caractérisent par la présence de marques épigénétiques particulières, comme les domaines bivalents de la chromatine, permettant d'activer rapidement l'expression de certains gènes en cas de nécessité. La présence des modifications épigénétiques induites par les traitements à court ou long terme pourrait être ici imputable des différentes réponses *in vivo* de ces cellules. Une meilleure compréhension des modifications génétiques et épigénétiques induites pourrait donc éclaircir les mécanismes impliqués dans l'établissement d'un phénotype tumoral plus ou moins agressif.

Enfin, d'un point de vue clinico-pathologique, il serait intéressant d'évaluer les effets du pro/NGF sur des cellules souches isolées de biopsies mammaires normales et tumorales. De même, l'évaluation de l'expression du NGF, du proNGF et de leurs récepteurs pourrait nous permettre d'établir une éventuelle corrélation entre l'expression de ces protéines, l'expression de marqueurs de cellules souches et les paramètres clinico-pathologiques de la tumeur (stade, type histologique, grade, expression des récepteurs stéroïdiens...).

2. Sécrétion du NGF et du proNGF par les CSC mammaires

Les travaux précédents du laboratoire ont montré que le NGF et le proNGF sont sécrétés par les cellules cancéreuses mammaires, ce qui a représenté la base de mes travaux. Cependant, des données présentes en littérature montrent que les cellules souches elles-mêmes peuvent exprimer et sécréter des neurotrophines (Lu et al., 2003) et il serait donc intéressant de vérifier la présence et l'impact de cette sécrétion par les CSC mammaires. Des tests préliminaires de culture des sphères en absence de facteurs de croissance ont

montré des effets moins prononcés sur la formation des sphères. Une analyse du sécrétome des sphères pourrait nous donner une idée de l'action exercée par les CSC sur l'environnement. De même, L'utilisation d'anticorps ou de siRNA ciblant spécifiquement le NGF ou le proNGF nous éclaircirait sur la présence d'une boucle d'action autocrine de ces facteurs dans les CSC.

3. Signalisation du NGF et du proNGF dans les CSC

Plusieurs études ont montré que les effets du NGF et du proNGF étaient étroitement liés aux ratios d'expression entre les récepteurs $p75^{\text{NTR}}$ et TrkA, auxquels s'ajoute la sortiline dans le cas du proNGF (Clewes et al., 2008; Lad et al., 2003; Masoudi et al., 2009). Dans notre étude, $p75^{\text{NTR}}$ intervient clairement dans l'autorenouvellement des cellules souches cancéreuses de sein. Cependant, l'inhibition de $p75^{\text{NTR}}$ semble agir seulement sur la signalisation induite par le NGF alors que d'autres récepteurs semblent être impliqués dans la signalisation du proNGF. En effet, Boutilier et ses collaborateurs ont montré que a faibles doses de proNGF (> 2 nM), le complexe sortiline/TrkA serait privilégié, alors que le proNGF non clivable se fixe sur $p75^{\text{NTR}}$ à partir de 2 nM (Boutilier et al., 2008). Lorsque notre étude a démarré, nous avons choisi les concentrations du NGF (16 nM) et du proNGF (0,5 nM) sur la base des données déjà existantes en littérature et sur la base des résultats de laboratoire. Des résultats précédents sur les lignées de cancer du sein avaient, en effet, montré un effet cloche pour l'action de ces deux neurotrophines : l'effet du proNGF sur l'invasion cellulaire est maximale à une dose de 0,5 nM puis redevient nul à partir de 2 nM. De façon analogue, l'effet du NGF est nul avant 2 nM et devient maximale à 16 nM, pour après redescendre à nouveau (Demont et al.). Il serait donc intéressant de réaliser une cinétique de concentration du NGF et du proNGF sur des populations enrichies en CSC pour vérifier la présence d'un effet cloche sur l'autorenouvellement aussi en cette sous-population. Le traitement au proNGF induit néanmoins une augmentation de l'expression du facteur de transcription Sox2 dans nos cellules, ainsi que d'autres effets biologiques : il est donc impératif à l'heure actuelle d'établir le rôle joué par la sortiline et TrkA dans la signalisation du proNGF. Pendant ma thèse, nous avons essayé à plusieurs reprises d'évaluer ces effets, mais nous nous sommes retrouvés face à l'impossibilité d'inhiber de façon spécifique ces récepteurs (siRNA non fonctionnels) et d'étudier leur expression par cytométrie en flux (absence d'anticorps efficaces sur le marché). Une approche par shRNA est en cours de développement.

Par ailleurs, il serait intéressant d'approfondir la compréhension des réseaux de régulation transcriptionnelle impliqués dans les effets du NGF et du proNGF, notamment en évaluant la formation de complexes entre Sox-2, Nanog, c-Myc et Slug en présence ou en absence des neurotrophines et de leur récepteurs.

Enfin, notre laboratoire a montré que les neurotrophines BDNF et NT-4/5 sont également surexprimées dans les cellules cancéreuses mammaires par rapport aux cellules normales (Vanhecke et al., 2011). p75^{NTR} étant le récepteur commun aux neurotrophines et aux proneurotrophines, nous pouvons supposer un éventuel effet de ces deux facteurs sur les CSC mammaires. Le BDNF est exprimé par les cellules souches embryonnaires et induit leur différenciation (Leschik et al., 2013). BDNF et NT-3 peuvent aussi induire la migration des cellules souches neurales (Douglas-Escobar et al., 2012), alors que, jusqu'à présent, aucun effet sur les cellules souches n'est attribué à la NT-4/5. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre l'implication d'autres neurotrophines dans la biologie des cellules souches cancéreuses de sein.

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 NGF et du proNGF dans les cellules souches du cancer du sein. Ainsi, le NGF et le proNGF, sécrétés par les cellules cancéreuses mammaires induisent l'autorenouvellement des CSC et régulent la balance entre la quiescence et la prolifération. La mise en place de thérapies pour éliminer les cellules souches cancéreuses nécessite l'identification de marqueurs spécifiques de ces cellules, afin de pouvoir les cibler de façon sélective sans endommager le compartiment de cellules souches saines. L'évaluation des effets du NGF et du proNGF s'inscrit parfaitement dans la perspective de caractériser une signalisation qui pourrait être propre aux cellules souches cancéreuses et absente dans un contexte non tumoral. Ces hypothèses sont supportées par le rôle exercé par p75^{NTR}, récepteur commun aux neurotrophines et proneurotrophines, dans les cellules souches. De façon intéressante, la découverte d'une induction de l'expression de plusieurs facteurs de pluripotence par l'axe NGF/p75^{NTR} ouvre de nouvelles perspectives sur la compréhension des processus cellulaires induits dans le cancer du sein.

Bibliographie

Bibliographie

- Adams, G.P., and Weiner, L.M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* *23*, 1147–1157.
- Adriaenssens, E., Vanhecke, E., Saule, P., Mougel, A., Page, A., Romon, R., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., and Hondermarck, H. (2008). Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* *68*, 346–351.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 834–846.
- Alison, M.R., Lin, W.-R., Lim, S.M.L., and Nicholson, L.J. (2012). Cancer stem cells: in the line of fire. *Cancer Treat. Rev.* *38*, 589–598.
- Allen, J., Khwaja, F., Byers, S., and 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.
- Allred, D.C., Brown, P., and Medina, D. (2004). The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* *6*, 240–245.
- Alvarez, R.H., Valero, V., and Hortobagyi, G.N. (2010). Emerging targeted therapies for breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 3366–3379.
- Amabile, G., and Meissner, A. (2009). Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol. Med.* *15*, 59–68.
- Angeletti, R.H., and Bradshaw, R.A. (1971). Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *68*, 2417–2420.
- Ansieau, S., Caron de Fromental, C., Bastid, J., Morel, A.-P., and Puisieux, A. (2010). [Role of the epithelial-mesenchymal transition during tumor progression]. *Bull. Cancer (Paris)* *97*, 7–15.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* *118*, 149–161.
- Arevalo, J.C., Conde, B., Hempstead, B.L., Chao, M.V., Martin-Zanca, D., and Perez, P. (2000). TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 5908–5916.
- Arévalo, J.C., and Wu, S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *63*, 1523–1537.
- Arnold, A., and Papanikolaou, A. (2005). Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *23*, 4215–4224.
- Arnold, C.P., Tan, R., Zhou, B., Yue, S.-B., Schaffert, S., Biggs, J.R., Doyonnas, R., Lo, M.-C., Perry, J.M., Renault, V.M., et al. (2011). MicroRNA programs in normal and aberrant stem and progenitor cells. *Genome Res.* *21*, 798–810.

Bibliographie

- Arrighi, N., Bodei, S., Zani, D., Simeone, C., Cunico, S.C., Missale, C., Spano, P., and Sigala, S. (2010). Nerve growth factor signaling in prostate health and disease. *Growth Factors Chur Switz.* 28, 191–201.
- Baldwin, A.N., Bitler, C.M., Welcher, A.A., and Shooter, E.M. (1992). Studies on the structure and binding properties of the cysteine-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR). *J. Biol. Chem.* 267, 8352–8359.
- Barde, Y.A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1, 549–553.
- Barker, P.A., Barbee, G., Misko, T.P., and Shooter, E.M. (1994). The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *J. Biol. Chem.* 269, 30645–30650.
- Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Dev. Camb. Engl.* 132, 3151–3161.
- Battula, V.L., Evans, K.W., Hollier, B.G., Shi, Y., Marini, F.C., Ayyanan, A., Wang, R.-Y., Briskin, C., Guerra, R., Andreeff, M., et al. (2010). Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 1435–1445.
- Baumann, M., Krause, M., and Hill, R. (2008). Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat. Rev. Cancer* 8, 545–554.
- Berkemeier, L.R., Winslow, J.W., Kaplan, D.R., Nikolics, K., Goeddel, D.V., and Rosenthal, A. (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 7, 857–866.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315–326.
- Bhakar, A.L., Howell, J.L., Paul, C.E., Salehi, A.H., Becker, E.B.E., Said, F., Bonni, A., and Barker, P.A. (2003). Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 11373–11381.
- Bidard, F.-C., Vincent-Salomon, A., Gomme, S., Nos, C., de Rycke, Y., Thiery, J.P., Sigal-Zafrani, B., Mignot, L., Sastre-Garau, X., Pierga, J.-Y., et al. (2008). Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 3306–3311.
- Bierl, M.A., Jones, E.E., Crutcher, K.A., and Isaacson, L.G. (2005). “Mature” nerve growth factor is a minor species in most peripheral tissues. *Neurosci. Lett.* 380, 133–137.
- Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don’t we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* 17, 320–329.

Bibliographie

- Blanpain, C., Lowry, W.E., Geoghegan, A., Polak, L., and Fuchs, E. (2004). Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118, 635–648.
- Blöchl, A., and Blöchl, R. (2007). A cell-biological model of p75NTR signaling. *J. Neurochem.* 102, 289–305.
- Blöchl, A., Blumenstein, L., and Ahmadian, M.R. (2004). Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2321–2335.
- Boiko, A.D., Razorenova, O.V., van de Rijn, M., Swetter, S.M., Johnson, D.L., Ly, D.P., Butler, P.D., Yang, G.P., Joshua, B., Kaplan, M.J., et al. (2010). Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* 466, 133–137.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737.
- Bourguignon, L.Y.W., Wong, G., Earle, C., and Chen, L. (2012). Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J. Biol. Chem.* 287, 32800–32824.
- 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.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947–956.
- Bradshaw, R.A., Murray-Rust, J., Ibáñez, C.F., McDonald, N.Q., Lapatto, R., and Blundell, T.L. (1994). Nerve growth factor: structure/function relationships. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 3, 1901–1913.
- Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 678–689.
- Brenton, J.D., Carey, L.A., Ahmed, A.A., and Caldas, C. (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 7350–7360.
- Bresnahan, P.A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H.L., Brake, A.J., Barr, P.J., and Thomas, G. (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J. Cell Biol.* 111, 2851–2859.
- Breuzer, L., Garcia, M., Delgrossi, M.-H., and Le Bivic, A. (2002). Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp. Cell Res.* 273, 178–186.

Bibliographie

- Britton, K.M., Eyre, R., Harvey, I.J., Stemke-Hale, K., Browell, D., Lennard, T.W.J., and Meeson, A.P. (2012). Breast cancer, side population cells and ABCG2 expression. *Cancer Lett.* *323*, 97–105.
- Brizzi, M.F., Tarone, G., and Defilippi, P. (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr. Opin. Cell Biol.* *24*, 645–651.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* *100*, 391–398.
- 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.
- Butowt, R., and von Bartheld, C.S. (2009). Fates of neurotrophins after retrograde axonal transport: phosphorylation of p75NTR is a sorting signal for delayed degradation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 10715–10729.
- Canuel, M., Bhattacharyya, N., Balbis, A., Yuan, L., and Morales, C.R. (2009). Sortilin and prosaposin localize to detergent-resistant membrane microdomains. *Exp. Cell Res.* *315*, 240–247.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* *298*, 1039–1043.
- Casaccia-Bonnel, P., Gu, C., and Chao, M.V. (1999). Neurotrophins in cell survival/death decisions. *Adv. Exp. Med. Biol.* *468*, 275–282.
- Ceder, J.A., Jansson, L., Ehrnström, R.A., Rönstrand, L., and Abrahamsson, P.-A. (2008). The characterization of epithelial and stromal subsets of candidate stem/progenitor cells in the human adult prostate. *Eur. Urol.* *53*, 524–531.
- Ceni, C., Kommaddi, R.P., Thomas, R., Vereker, E., Liu, X., McPherson, P.S., Ritter, B., and Barker, P.A. (2010). The p75NTR intracellular domain generated by neurotrophin-induced receptor cleavage potentiates Trk signaling. *J. Cell Sci.* *123*, 2299–2307.
- Chaffer, C.L., Marjanovic, N.D., Lee, T., Bell, G., Klier, C.G., Reinhardt, F., D'Alessio, A.C., Young, R.A., and Weinberg, R.A. (2013). Poised Chromatin at the ZEB1 Promoter Enables Breast Cancer Cell Plasticity and Enhances Tumorigenicity. *Cell* *154*, 61–74.
- Challen, G.A., and Little, M.H. (2006). A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells Dayt. Ohio* *24*, 3–12.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* *113*, 643–655.
- Chan, M.M., and Tahan, S.R. (2010). Low-affinity nerve growth factor receptor (P75 NGFR) as a marker of perineural invasion in malignant melanomas. *J. Cutan. Pathol.* *37*, 336–343.

Bibliographie

- Chang, C.-F., Westbrook, R., Ma, J., and Cao, D. (2007). Transforming growth factor-beta signaling in breast cancer. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *12*, 4393–4401.
- Chao, M.V., and Hempstead, B.L. (1995). p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* *18*, 321–326.
- Chao, M., Casaccia-Bonnel, P., Carter, B., Chittka, A., Kong, H., and Yoon, S.O. (1998). Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *26*, 295–301.
- Chao, M.V., Bothwell, M.A., Ross, A.H., Koprowski, H., Lanahan, A.A., Buck, C.R., and Sehgal, A. (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* *232*, 518–521.
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.-H., Diebel, M.E., Monville, F., Dutcher, J., et al. (2009). Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res.* *69*, 1302–1313.
- Chavakis, E., Urbich, C., and Dimmeler, S. (2008). Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *45*, 514–522.
- Chen, F.-M., Wu, L.-A., Zhang, M., Zhang, R., and Sun, H.-H. (2011). Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives. *Biomaterials* *32*, 3189–3209.
- Cheng, L., Wu, Q., Huang, Z., Guryanova, O.A., Huang, Q., Shou, W., Rich, J.N., and Bao, S. (2011). L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1. *EMBO J.* *30*, 800–813.
- Cheung, T.H., and Rando, T.A. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 329–340.
- Chittka, A., Arevalo, J.C., Rodriguez-Guzman, M., Pérez, P., Chao, M.V., and Sendtner, M. (2004). The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J. Cell Biol.* *164*, 985–996.
- Choi, Y.H., and Yu, A.-M. (2013). ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development. *Curr. Pharm. Des.*
- Cicalese, A., Bonizzi, G., Pasi, C.E., Faretta, M., Ronzoni, S., Giulini, B., Brisken, C., Minucci, S., Di Fiore, P.P., and Pelicci, P.G. (2009). The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* *138*, 1083–1095.
- Clarke, M.F., and Fuller, M. (2006). Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* *124*, 1111–1115.
- 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, P75NTR and sortilin. *J. Neurochem.* *107*, 1124–1135.

Bibliographie

- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., and Hamburger, V. (1954). A NERVE GROWTH-STIMULATING FACTOR ISOLATED FROM SARCOMA 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., Hammache, D., Rudkin, B.B., and Hondermarck, H. (2007). Nerve growth factor receptor TrkA signaling in breast cancer cells involves Ku70 to prevent apoptosis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *6*, 1842–1854.
- Coulson, E.J., Reid, K., Baca, M., Shipham, K.A., Hulett, S.M., Kilpatrick, T.J., and Bartlett, P.F. (2000). Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J. Biol. Chem.* *275*, 30537–30545.
- Coulson, E.J., Reid, K., Shipham, K.M., Morley, S., Kilpatrick, T.J., and Bartlett, P.F. (2004). The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog. Brain Res.* *146*, 41–62.
- Coulson, E.J., May, L.M., Osborne, S.L., Reid, K., Underwood, C.K., Meunier, F.A., Bartlett, P.F., and Sah, P. (2008). p75 neurotrophin receptor mediates neuronal cell death by activating GIRK channels through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 315–324.
- Cozzio, A., Passegué, E., Ayton, P.M., Karsunky, H., Cleary, M.L., and Weissman, I.L. (2003). Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev.* *17*, 3029–3035.
- Creighton, C.J., Li, X., Landis, M., Dixon, J.M., Neumeister, V.M., Sjolund, A., Rimm, D.L., Wong, H., Rodriguez, A., Herschkowitz, J.I., et al. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 13820–13825.
- Crocker, A.K., and Allan, A.L. (2012). Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44⁺ human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *133*, 75–87.
- Davidson, B., Reich, R., Lazarovici, P., Nesland, J.M., Skrede, M., Risberg, B., Tropé, C.G., and Flørenes, V.A. (2003). Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *9*, 2248–2259.
- Dean, M. (2009). ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *14*, 3–9.
- Delsite, R., and 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.
- Demont, Y., Corbet, C., Page, A., Ataman-Önal, Y., Choquet-Kastylevsky, G., Fliniaux, I., Le Bourhis, X., Toillon, R.-A., Bradshaw, R.A., and Hondermarck, H. (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.

Bibliographie

- DEOME, K.B., FAULKIN, L.J., Jr, BERN, H.A., and BLAIR, P.B. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res.* *19*, 515–520.
- Descamps, S., Lebourhis, X., Delehedde, M., Boilly, B., and Hondermarck, H. (1998). Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *273*, 16659–16662.
- Descamps, S., Toillon, R.A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S.M., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J.P., and Hondermarck, H. (2001a). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* *276*, 17864–17870.
- Descamps, S., Pawlowski, V., Révillion, F., Hornez, L., Hebbar, M., Boilly, B., Hondermarck, H., and Peyrat, J.P. (2001b). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res.* *61*, 4337–4340.
- Diehn, M., Cho, R.W., Lobo, N.A., Kalisky, T., Dorie, M.J., Kulp, A.N., Qian, D., Lam, J.S., Ailles, L.E., Wong, M., et al. (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* *458*, 780–783.
- Do, J.T., and Schöler, H.R. (2010). Cell fusion-induced reprogramming. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *636*, 179–190.
- Dobrowsky, R.T., Werner, M.H., Castellino, A.M., Chao, M.V., and Hannun, Y.A. (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* *265*, 1596–1599.
- Dollé, J.-P., Rezvan, A., Allen, F.D., Lazarovici, P., and Lelkes, P.I. (2005). Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *315*, 1220–1227.
- 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.
- Domeniconi, M., Hempstead, B.L., and Chao, M.V. (2007). Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death. *Mol. Cell. Neurosci.* *34*, 271–279.
- Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J., and Wicha, M.S. (2003a). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* *17*, 1253–1270.
- Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W.M., Clarke, M.F., and Wicha, M.S. (2003b). Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* *36 Suppl 1*, 59–72.
- Douglas-Escobar, M., Rossignol, C., Steindler, D., Zheng, T., and Weiss, M.D. (2012). Neurotrophin-induced migration and neuronal differentiation of multipotent astrocytic stem cells in vitro. *PLoS One* *7*, e51706.
- Dravid, G., Ye, Z., Hammond, H., Chen, G., Pyle, A., Donovan, P., Yu, X., and Cheng, L. (2005). Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *23*, 1489–1501.

Bibliographie

- Du, Y., Fischer, T.Z., Clinton-Luke, P., Lercher, L.D., and Dreyfus, C.F. (2006). Distinct effects of p75 in mediating actions of neurotrophins on basal forebrain oligodendrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* *31*, 366–375.
- Dylla, S.J., Beviglia, L., Park, I.-K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., Pickell, K., Aguilar, J., Lazetic, S., Smith-Berdan, S., et al. (2008). Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PloS One* *3*, e2428.
- Eccles, S.A. (2011). The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int. J. Dev. Biol.* *55*, 685–696.
- Eglitis, M.A., and Mezey, E. (1997). Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 4080–4085.
- Eirew, P., Stingl, J., Raouf, A., Turashvili, G., Aparicio, S., Emerman, J.T., and Eaves, C.J. (2008). A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability. *Nat. Med.* *14*, 1384–1389.
- 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.
- Elenbaas, B., and Weinberg, R.A. (2001). Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp. Cell Res.* *264*, 169–184.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* *15*, 504–514.
- Esposito, D., Patel, P., Stephens, R.M., Perez, P., Chao, M.V., Kaplan, D.R., and Hempstead, B.L. (2001). The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* *276*, 32687–32695.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* *292*, 154–156.
- Ezashi, T., Das, P., and Roberts, R.M. (2005). Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 4783–4788.
- Feinberg, A.P., and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 143–153.
- Fernando, R.I., Castillo, M.D., Litzinger, M., Hamilton, D.H., and Palena, C. (2011). IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Res.* *71*, 5296–5306.
- Ficara, F., Murphy, M.J., Lin, M., and Cleary, M.L. (2008). Pbx1 regulates self-renewal of long-term hematopoietic stem cells by maintaining their quiescence. *Cell Stem Cell* *2*, 484–496.

Bibliographie

- Fisher, C.L., and Fisher, A.G. (2011). Chromatin states in pluripotent, differentiated, and reprogrammed cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 140–146.
- Frade, J.M. (2005). Nuclear translocation of the p75 neurotrophin receptor cytoplasmic domain in response to neurotrophin binding. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 1407–1411.
- French, A.J., Adams, C.A., Anderson, L.S., Kitchen, J.R., Hughes, M.R., and Wood, S.H. (2008). Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 485–493.
- Friedman, W.J., and Greene, L.A. (1999). Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp. Cell Res.* *253*, 131–142.
- Fuchs, E., and Chen, T. (2013). A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep.* *14*, 39–48.
- Fuchs, E., Tumber, T., and Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* *116*, 769–778.
- Fukada, S., Uezumi, A., Ikemoto, M., Masuda, S., Segawa, M., Tanimura, N., Yamamoto, H., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2007). Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 2448–2459.
- Gatzinsky, K.P., Haugland, R.P., Thrasivoulou, C., Orike, N., Budi-Santoso, A.W., and 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., Zheng, C., Unroe, B., Sycheva, M., Kluess, H., and Babu, J.R. (2012). Polyubiquitination of the neurotrophin receptor p75 directs neuronal cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *421*, 286–290.
- Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* *1*, 555–567.
- Ginestier, C., Wicinski, J., Cervera, N., Monville, F., Finetti, P., Bertucci, F., Wicha, M.S., Birnbaum, D., and Charafe-Jauffret, E. (2009). Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 3297–3302.
- Glauche, I., Moore, K., Thielecke, L., Horn, K., Loeffler, M., and Roeder, I. (2009). Stem cell proliferation and quiescence--two sides of the same coin. *PLoS Comput. Biol.* *5*, e1000447.
- Goldstein, B., and Macara, I.G. (2007). The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev. Cell* *13*, 609–622.
- Gong, Y., Cao, P., Yu, H., and Jiang, T. (2008). Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex. *Nature* *454*, 789–793.

Bibliographie

- Goodell, M.A. (2005). Stem cell identification and sorting using the Hoechst 33342 side population (SP). *Curr. Protoc. Cytom.* Editor. Board J Paul Robinson Manag. Ed. A1 *Chapter 9*, Unit9.18.
- Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F.J., Stanley, E.R., Segall, J.E., and Condeelis, J.S. (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.
- Goulas, S., Conder, R., and Knoblich, J.A. (2012). The Par complex and integrins direct asymmetric cell division in adult intestinal stem cells. *Cell Stem Cell* *11*, 529–540.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., and Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* *39*, 749–765.
- GRANT, W.C., and ROOT, W.S. (1947). The relation of O₂ in bone marrow blood to post-hemorrhagic erythropoiesis. *Am. J. Physiol.* *150*, 618–627.
- Gray, K., and Ellis, V. (2008). Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin. *FEBS Lett.* *582*, 907–910.
- Guo, J., Wang, J., Liang, C., Yan, J., Wang, Y., Liu, G., Jiang, Z., Zhang, L., Wang, X., Wang, Y., et al. (2013). proNGF inhibits proliferation and oligodendrogenesis of postnatal hippocampal neural stem/progenitor cells through p75NTR in vitro. *Stem Cell Res.* *11*, 874–887.
- Guo, W., Keckesova, Z., Donaher, J.L., Shibue, T., Tischler, V., Reinhardt, F., Itzkovitz, S., Noske, A., Zürcher-Härdi, U., Bell, G., et al. (2012). Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* *148*, 1015–1028.
- Gupta, P.B., Onder, T.T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R.A., and Lander, E.S. (2009). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* *138*, 645–659.
- Gurdon, J.B., Laskey, R.A., De Robertis, E.M., and Partington, G.A. (1979). Reprogramming of transplanted nuclei in amphibia. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 161–178.
- Hadnagy, A., Gaboury, L., Beaulieu, R., and Balicki, D. (2006). SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp. Cell Res.* *312*, 3701–3710.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 3983–3988.
- Hallböök, F., Ibáñez, C.F., and Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* *6*, 845–858.
- Hambardzumyan, D., Becher, O.J., Rosenblum, M.K., Pandolfi, P.P., Manova-Todorova, K., and Holland, E.C. (2008). PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev.* *22*, 436–448.

Bibliographie

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Harnes, D.C., and DiRenzo, J. (2009). Cellular quiescence in mammary stem cells and breast tumor stem cells: got testable hypotheses? *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *14*, 19–27.
- 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.
- Hasan, W., Pedchenko, T., Krizsan-Agbas, D., Baum, L., and Smith, P.G. (2003). Sympathetic neurons synthesize and secrete pro-nerve growth factor protein. *J. Neurobiol.* *57*, 38–53.
- Hauburger, A., Kliemannel, M., Madsen, P., Rudolph, R., and Schwarz, E. (2007). Oxidative folding of nerve growth factor can be mediated by the pro-peptide of neurotrophin-3. *FEBS Lett.* *581*, 4159–4164.
- Hay, D.C., Sutherland, L., Clark, J., and Burdon, T. (2004). Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *22*, 225–235.
- He, S., Nakada, D., and Morrison, S.J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *25*, 377–406.
- Hempstead, B.L. (2002). The many faces of p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.* *12*, 260–267.
- Hermey, G. (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 2677–2689.
- Herrup, K., and Shooter, E.M. (1973). Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *70*, 3884–3888.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., et al. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* *8*, R76.
- Higuchi, H., Yamashita, T., Yoshikawa, H., and Tohyama, M. (2003). PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts. *EMBO J.* *22*, 1790–1800.
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., and Barde, Y.A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* *344*, 339–341.
- Holden, P.H., Asopa, V., Robertson, A.G., Clarke, A.R., Tyler, S., Bennett, G.S., Brain, S.D., Wilcock, G.K., Allen, S.J., Smith, S.K., et al. (1997). Immunoglobulin-like domains

Bibliographie

define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor. *Nat. Biotechnol.* *15*, 668–672.

Honeth, G., Bendahl, P.-O., Ringnér, M., Saal, L.H., Grubberger-Saal, S.K., Lövgren, K., Grabau, D., Fernö, M., Borg, A., and Hegardt, C. (2008). The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res. BCR* *10*, R53.

Hooper, J.E., and Scott, M.P. (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 306–317.

Horsley, V., Aliprantis, A.O., Polak, L., Glimcher, L.H., and Fuchs, E. (2008). NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* *132*, 299–310.

Hu, G., Kim, J., Xu, Q., Leng, Y., Orkin, S.H., and Elledge, S.J. (2009). A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal. *Genes Dev.* *23*, 837–848.

Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *72*, 609–642.

Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., and Bunn, H.F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* *271*, 32253–32259.

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

Hwang-Verslues, W.W., Chang, P.-H., Jeng, Y.-M., Kuo, W.-H., Chiang, P.-H., Chang, Y.-C., Hsieh, T.-H., Su, F.-Y., Lin, L.-C., Abbondante, S., et al. (2013). Loss of corepressor PER2 under hypoxia up-regulates OCT1-mediated EMT gene expression and enhances tumor malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 12331–12336.

Imaida, K., Hasegawa, R., Kato, T., Futakuchi, M., Takahashi, S., Ogawa, K., Asamoto, M., Yamamoto, T., Suzuki, K., Inagaki, T., et al. (1997). Clinicopathological analysis on cancers of autopsy cases in a geriatric hospital. *Pathol. Int.* *47*, 293–300.

Ip, N.Y., Ibáñez, C.F., Nye, S.H., McClain, J., Jones, P.F., Gies, D.R., Belluscio, L., Le Beau, M.M., Espinosa, R., 3rd, and Squinto, S.P. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 3060–3064.

Irie, S., Hachiya, T., Rabizadeh, S., Maruyama, W., Mukai, J., Li, Y., Reed, J.C., Bredesen, D.E., and Sato, T.A. (1999). Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* *460*, 191–198.

Iyengar, P., Espina, V., Williams, T.W., Lin, Y., Berry, D., Jelicks, L.A., Lee, H., Temple, K., Graves, R., Pollard, J., 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.

Bibliographie

- Jacob, J., and Briscoe, J. (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep.* 4, 761–765.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jiang, X., Gwyne, Y., McKeown, S.J., Bronner-Fraser, M., Lutzko, C., and Lawlor, E.R. (2009). Isolation and characterization of neural crest stem cells derived from in vitro-differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 18, 1059–1070.
- Jin, H., Pan, Y., Zhao, L., Zhai, H., Li, X., Sun, L., He, L., Chen, Y., Hong, L., Du, Y., et al. (2007a). p75 neurotrophin receptor suppresses the proliferation of human gastric cancer cells. *Neoplasia New York N* 9, 471–478.
- Jin, H., Pan, Y., He, L., Zhai, H., Li, X., Zhao, L., Sun, L., Liu, J., Hong, L., Song, J., et al. (2007b). p75 neurotrophin receptor inhibits invasion and metastasis of gastric cancer. *Mol. Cancer Res. MCR* 5, 423–433.
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., and Chao, M. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47, 545–554.
- Johnston, A.L.M., Lun, X., Rahn, J.J., Liacini, A., Wang, L., Hamilton, M.G., Parney, I.F., Hempstead, B.L., Robbins, S.M., Forsyth, P.A., et al. (2007). The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *PLoS Biol.* 5, e212.
- Jones, D.L., and Wagers, A.J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 11–21.
- Jones, K.R., and Reichardt, L.F. (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8060–8064.
- Jung, K.-M., Tan, S., Landman, N., Petrova, K., Murray, S., Lewis, R., Kim, P.K., Kim, D.S., Ryu, S.H., Chao, M.V., et al. (2003). Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 42161–42169.
- Kakarala, M., and Wicha, M.S. (2008). Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 2813–2820.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428.
- Kanning, K.C., Hudson, M., Amieux, P.S., Wiley, J.C., Bothwell, M., and Schecterson, L.C. (2003). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 5425–5436.
- Katayama, R., Koike, S., Sato, S., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., and Fujita, N. (2009). Dofequidar fumarate sensitizes cancer stem-like side population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export. *Cancer Sci.* 100, 2060–2068.

Bibliographie

- De Keizer, P.L.J., Burgering, B.M.T., and Dansen, T.B. (2011). Forkhead box o as a sensor, mediator, and regulator of redox signaling. *Antioxidants Redox Signal.* *14*, 1093–1106.
- Kenchappa, R.S., Zampieri, N., Chao, M.V., Barker, P.A., Teng, H.K., Hempstead, B.L., and Carter, B.D. (2006). Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* *50*, 219–232.
- Van Keymeulen, A., Rocha, A.S., Ousset, M., Beck, B., Bouvencourt, G., Rock, J., Sharma, N., Dekoninck, S., and Blanpain, C. (2011). Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* *479*, 189–193.
- Khursigara, G., Bertin, J., Yano, H., Moffett, H., DiStefano, P.S., and Chao, M.V. (2001). A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 5854–5863.
- Khwaja, F., and Djakiew, D. (2003). Inhibition of cell-cycle effectors of proliferation in bladder tumor epithelial cells by the p75NTR tumor suppressor. *Mol. Carcinog.* *36*, 153–160.
- Khwaja, F., Tabassum, A., Allen, J., and Djakiew, D. (2006). The p75(NTR) tumor suppressor induces cell cycle arrest facilitating caspase mediated apoptosis in prostate tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *341*, 1184–1192.
- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., and Orkin, S.H. (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* *132*, 1049–1061.
- Kim, J., Villadsen, R., Sørli, T., Fogh, L., Grønlund, S.Z., Fridriksdottir, A.J., Kuhn, I., Rank, F., Wielenga, V.T., Solvang, H., et al. (2012). Tumor initiating but differentiated luminal-like breast cancer cells are highly invasive in the absence of basal-like activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 6124–6129.
- Kimble, J.E., and White, J.G. (1981). On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* *81*, 208–219.
- Kitchens, D.L., Snyder, E.Y., and Gottlieb, D.I. (1994). FGF and EGF are mitogens for immortalized neural progenitors. *J. Neurobiol.* *25*, 797–807.
- Kléber, M., and Sommer, L. (2004). Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 681–687.
- KLEINSMITH, L.J., and PIERCE, G.B., 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., and Schwarz, E. (2004). The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS Lett.* *566*, 207–212.
- Knoblich, J.A. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* *132*, 583–597.

Bibliographie

- Knudson, A.G. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 10914–10921.
- Knudson, A.G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer* *1*, 157–162.
- Koelling, T.M., Yeager, A.M., Hilton, J., Haynie, D.T., and Wiley, J.M. (1990). Development and characterization of a cyclophosphamide-resistant subline of acute myeloid leukemia in the Lewis x Brown Norway hybrid rat. *Blood* *76*, 1209–1213.
- Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* *137*, 216–233.
- Kordon, E.C., and Smith, G.H. (1998). An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 1921–1930.
- Kruger, G.M., Mosher, J.T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T., and Morrison, S.J. (2002). Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* *35*, 657–669.
- Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J.W., Carey, L., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4966–4971.
- Lachance, C., Belliveau, D.J., and Barker, P.A. (1997). Blocking nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor on sympathetic neurons transiently reduces trkA activation but does not affect neuronal survival. *Neuroscience* *81*, 861–871.
- Lad, S.P., Peterson, D.A., Bradshaw, R.A., and Neet, K.E. (2003). Individual and combined effects of TrkA and p75NTR nerve growth factor receptors. A role for the high affinity receptor site. *J. Biol. Chem.* *278*, 24808–24817.
- 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.
- Lagadec, C., Romon, R., Tastet, C., Meignan, S., Com, E., Page, A., Bidaux, G., Hondermarck, H., and Le Bourhis, X. (2010). Ku86 is important for TrkA overexpression-induced breast cancer cell invasion. *Proteomics Clin. Appl.* *4*, 580–590.
- Large, T.H., Weskamp, G., Helder, J.C., Radeke, M.J., Misko, T.P., Shooter, E.M., and Reichardt, L.F. (1989). Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system. *Neuron* *2*, 1123–1134.
- Lechman, E.R., Gentner, B., van Galen, P., Giustacchini, A., Saini, M., Boccalatte, F.E., Hiramatsu, H., Restuccia, U., Bachi, A., Voisin, V., et al. (2012). Attenuation of miR-126 activity expands HSC in vivo without exhaustion. *Cell Stem Cell* *11*, 799–811.
- Lee, E.Y.H.P., and Muller, W.J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a003236.

Bibliographie

- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134.
- Leschik, J., Eckenstaler, R., Nieweg, K., Lichtenecker, P., Brigadski, T., Gottmann, K., Leßmann, V., and Lutz, B. (2013). Stably BDNF-GFP expressing embryonic stem cells exhibit a BDNF release-dependent enhancement of neuronal differentiation. *J. Cell Sci.*
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007a). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67, 1030–1037.
- Li, H.-Y., Say, E.H.M., and Zhou, X.-F. (2007b). Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 2053–2065.
- Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.-F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., et al. (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 672–679.
- Li, X., Shen, Y., Di, B., Li, J., Geng, J., Lu, X., and He, Z. (2012). Biological and clinical significance of p75^{NTR} expression in laryngeal squamous epithelia and laryngocarcinoma. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 132, 314–324.
- Li, X.-D., Ji, M., Wu, J., Jiang, J.-T., and Wu, C.-P. (2013). Clinical significance of CD44 variants expression in colorectal cancer. *Tumori* 99, 88–92.
- Liepinsh, E., Ilag, L.L., Otting, G., and Ibáñez, C.F. (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* 16, 4999–5005.
- Lim, J., and Thiery, J.P. (2012). Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Dev. Camb. Engl.* 139, 3471–3486.
- Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N.C., Pal, B., Hart, A.H., Asselin-Labat, M.-L., Gyorki, D.E., Ward, T., Partanen, A., et al. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat. Med.* 15, 907–913.
- Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2010). Insights into the cell of origin in breast cancer and breast cancer stem cells. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* 6, 89–97.
- Liu, L., Cheung, T.H., Charville, G.W., Hurgo, B.M.C., Leavitt, T., Shih, J., Brunet, A., and Rando, T.A. (2013). Chromatin modifications as determinants of muscle stem cell quiescence and chronological aging. *Cell Reports* 4, 189–204.
- Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D., and Clarke, M.F. (2007). The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 675–699.
- Lu, P., Jones, L.L., Snyder, E.Y., and Tuszynski, M.H. (2003). Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 181, 115–129.

Bibliographie

- Lund, A.H., and van Lohuizen, M. (2004). Epigenetics and cancer. *Genes Dev.* *18*, 2315–2335.
- Ma, J., Jiang, Y., Jiang, Y., Sun, Y., and Zhao, X. (2008). Expression of nerve growth factor and tyrosine kinase receptor A and correlation with perineural invasion in pancreatic cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *23*, 1852–1859.
- Le Magnen, C., Bubendorf, L., Rentsch, C.A., Mengus, C., Gsponer, J.R., Zellweger, T., Rieken, M., Thalmann, G.N., Cecchini, M., Germann, M., et al. (2013). Characterization and clinical relevance of ALDHbright populations in prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*
- Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M., and Yancopoulos, G.D. (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* *247*, 1446–1451.
- Majdan, M., Lachance, C., Gloster, A., Aloyz, R., Zeindler, C., Bamji, S., Bhakar, A., Belliveau, D., Fawcett, J., Miller, F.D., et al. (1997). Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 6988–6998.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* *133*, 704–715.
- Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* *469*, 343–349.
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., et al. (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* *134*, 521–533.
- Martens, W., Wolfs, E., Struys, T., Politis, C., Bronckaers, A., and Lambrechts, I. (2012). Expression Pattern of Basal Markers in Human Dental Pulp Stem Cells and Tissue. *Cells Tissues Organs.*
- Martin-Zanca, D., Oskam, R., Mitra, G., Copeland, T., and Barbacid, M. (1989). Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 24–33.
- Marynka-Kalmani, K., Treves, S., Yafee, M., Rachima, H., Gafni, Y., Cohen, M.A., and Pitaru, S. (2010). The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells Dayt. Ohio* *28*, 984–995.
- 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.

Bibliographie

- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., et al. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 625–635.
- Mathur, D., Danford, T.W., Boyer, L.A., Young, R.A., Gifford, D.K., and Jaenisch, R. (2008). Analysis of the mouse embryonic stem cell regulatory networks obtained by ChIP-chip and ChIP-PET. *Genome Biol.* 9, R126.
- Matter, N., Herrlich, P., and König, H. (2002). Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 420, 691–695.
- Maurer, G., Tarkowski, B., and Baccharini, M. (2011). Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene* 30, 3477–3488.
- Mavaddat, N., Antoniou, A.C., Easton, D.F., and Garcia-Closas, M. (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol. Oncol.* 4, 174–191.
- Maxwell, K.N., and Domchek, S.M. (2012). Cancer treatment according to BRCA1 and BRCA2 mutations. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9, 520–528.
- McDonald, N.Q., and Blundell, T.L. (1991). Crystallization and characterization of the high molecular weight form of nerve growth factor (7 S NGF). *J. Mol. Biol.* 219, 595–601.
- Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., et al. (2004). LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat. Neurosci.* 7, 221–228.
- Mihatsch, J., Toulany, M., Bareiss, P.M., Grimm, S., Lengerke, C., Kehlbach, R., and Rodemann, H.P. (2011). Selection of radioresistant tumor cells and presence of ALDH1 activity in vitro. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 99, 300–306.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631–642.
- Moasser, M.M. (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26, 6469–6487.
- Molyneux, G., Geyer, F.C., Magnay, F.-A., McCarthy, A., Kendrick, H., Natrajan, R., Mackay, A., Grigoriadis, A., Tutt, A., Ashworth, A., et al. (2010). BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 403–417.
- Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., and Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5, 691–701.
- Moreb, J.S. (2008). Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 3, 237–246.
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 3, e2888.

Bibliographie

- Morimoto, K., Kim, S.J., Tanei, T., Shimazu, K., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Terada, N., and Noguchi, S. (2009). Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci.* *100*, 1062–1068.
- Morris, R.J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J.S., Sawicki, J.A., and Cotsarelis, G. (2004). Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat. Biotechnol.* *22*, 411–417.
- Moscatelli, I., Pierantozzi, E., Camaioni, A., Siracusa, G., and Campagnolo, L. (2009). p75 neurotrophin receptor is involved in proliferation of undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.* *315*, 3220–3232.
- Mowla, S.J., Farhadi, H.F., Pareek, S., Atwal, J.K., Morris, S.J., Seidah, N.G., and Murphy, R.A. (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* *276*, 12660–12666.
- Mueller, M.M., and Fusenig, N.E. (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 839–849.
- Mueller, M.-T., Hermann, P.C., Witthauer, J., Rubio-Viqueira, B., Leicht, S.F., Huber, S., Ellwart, J.W., Mustafa, M., Bartenstein, P., D’Haese, J.G., et al. (2009). Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. *Gastroenterology* *137*, 1102–1113.
- Mukai, J., Suvant, P., and Sato, T.-A. (2003). Nerve growth factor-dependent regulation of NADE-induced apoptosis. *Vitam. Horm.* *66*, 385–402.
- Munck Petersen, C., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Tauris, J., Jacobsen, L., Gliemann, J., Moestrup, S.K., and Madsen, P. (1999). Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J.* *18*, 595–604.
- Muñoz, J., Stange, D.E., Schepers, A.G., van de Wetering, M., Koo, B.-K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K.S., Koster, J., Radulescu, S., et al. (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent “+4” cell markers. *EMBO J.* *31*, 3079–3091.
- Muzio, G., Maggiora, M., Paiuzzi, E., Oraldi, M., and Canuto, R.A. (2012). Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic. Biol. Med.* *52*, 735–746.
- Nakagawara, A., and Brodeur, G.M. (1997). Role of neurotrophins and their receptors in human neuroblastomas: a primary culture study. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *33*, 2050–2053.
- Nakamura, T., Endo, K., and Kinoshita, S. (2007). Identification of human oral keratinocyte stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p75 and the role of neurotrophin/p75 signaling. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 628–638.
- Nakayama, M. (2009). Cell Therapy Using Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Meets Next-Next Generation DNA Sequencing Technology. *Curr. Genomics* *10*, 303–305.

Bibliographie

- Nalbandian, A., and Djakiew, D. (2006). The p75(NTR) metastasis suppressor inhibits urokinase plasminogen activator, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in PC-3 prostate cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* 23, 107–116.
- Nawshad, A., Lagamba, D., Polad, A., and Hay, E.D. (2005). Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs* 179, 11–23.
- Negri, T., Tamborini, E., Dagrada, G.P., Greco, A., Staurengo, S., Guzzo, M., Locati, L.D., Carbone, A., Pierotti, M.A., Licitra, L., et al. (2008). TRK-A, HER-2/neu, and KIT Expression/Activation Profiles in Salivary Gland Carcinoma. *Transl. Oncol.* 1, 121–128.
- Neumüller, R.A., and Knoblich, J.A. (2009). Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev.* 23, 2675–2699.
- Neville, M.C., McFadden, T.B., and Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 49–66.
- Niederöst, B., Oertle, T., Fritsche, J., McKinney, R.A., and Bandtlow, C.E. (2002). Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 10368–10376.
- Nielsen, M., Thomsen, J.L., Primdahl, S., Dyreborg, U., and Andersen, J.A. (1987). Breast cancer and atypia among young and middle-aged women: a study of 110 medicolegal autopsies. *Br. J. Cancer* 56, 814–819.
- Nielsen, M.S., Madsen, P., Christensen, E.I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R., and Petersen, C.M. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* 20, 2180–2190.
- Nieto, M.A., and Cano, A. (2012). The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin. Cancer Biol.* 22, 361–368.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24, 372–376.
- Notterpek, L. (2003). Neurotrophins in myelination: a new role for a puzzling receptor. *Trends Neurosci.* 26, 232–234.
- Nykjaer, A., and Willnow, T.E. (2012). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci.* 35, 261–270.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843–848.
- Nykjaer, A., Willnow, T.E., and Petersen, C.M. (2005). p75NTR--live or let die. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 49–57.
- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106–110.

Bibliographie

- O'Connor, T.P., and Crystal, R.G. (2006). Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat. Rev. Genet.* 7, 261–276.
- O'Donovan, P.J., and Livingston, D.M. (2010). BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis* 31, 961–967.
- Obeid, E., Nanda, R., Fu, Y.-X., and Olopade, O.I. (2013). The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *Int. J. Oncol.* 43, 5–12.
- Ødegaard, E., Staff, A.C., Abeler, V.M., Kopolovic, J., Onsrud, M., Lazarovici, P., and Davidson, B. (2007). The activated nerve growth factor receptor p-TrkA is selectively expressed in advanced-stage ovarian carcinoma. *Hum. Pathol.* 38, 140–146.
- Ohr, T., Mancini, A., Tamura, T., and Niedenthal, R. (2004). c-Cbl binds to tyrosine-phosphorylated neurotrophin receptor p75 and induces its ubiquitination. *Cell. Signal.* 16, 1291–1298.
- Okumura, T., Shimada, Y., Imamura, M., and Yasumoto, S. (2003). Neurotrophin receptor p75(NTR) characterizes human esophageal keratinocyte stem cells in vitro. *Oncogene* 22, 4017–4026.
- Olsson, E., Honeth, G., Bendahl, P.-O., Saal, L.H., Gruvberger-Saal, S., Ringnér, M., Vallon-Christersson, J., Jönsson, G., Holm, K., Lövgren, K., et al. (2011). CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. *BMC Cancer* 11, 418.
- Osborne, C., Wilson, P., and Tripathy, D. (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 9, 361–377.
- Padua, D., and Massagué, J. (2009). Roles of TGFβ in metastasis. *Cell Res.* 19, 89–102.
- Paiardini, A., and Caputo, V. (2008). Insights into the interaction of sortilin with proneurotrophins: a computational approach. *Neuropeptides* 42, 205–214.
- Pang, W.W., and Hartmann, P.E. (2007). Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12, 211–221.
- Paoletti, F., Covaceuszach, S., Konarev, P.V., Gonfloni, S., Malerba, F., Schwarz, E., Svergun, D.I., Cattaneo, A., and Lamba, D. (2009). Intrinsic structural disorder of mouse proNGF. *Proteins* 75, 990–1009.
- Paoletti, F., Malerba, F., Kelly, G., Noinville, S., Lamba, D., Cattaneo, A., and Pastore, A. (2011). Conformational plasticity of proNGF. *PLoS One* 6, e22615.
- Papatsoris, A.G., Liolitsa, D., and Deliveliotis, C. (2007). Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* 16, 303–309.
- Pastrana, E., Silva-Vargas, V., and Doetsch, F. (2011). Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 486–498.

Bibliographie

- Patel, S.A., Ramkissoon, S.H., Bryan, M., Pliner, L.F., Dontu, G., Patel, P.S., Amiri, S., Pine, S.R., and Rameshwar, P. (2012). Delineation of breast cancer cell hierarchy identifies the subset responsible for dormancy. *Sci. Reports* 2, 906.
- Pece, S., Confalonieri, S., Romano, P., and Di Fiore, P.P. (2011). NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH. *Biochim. Biophys. Acta* 1815, 26–43.
- Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 365–375.
- Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* 7, 415–428.
- Peng, H., Dong, Z., Qi, J., Yang, Y., Liu, Y., Li, Z., Xu, J., and Zhang, J.-T. (2009). A novel two mode-acting inhibitor of ABCG2-mediated multidrug transport and resistance in cancer chemotherapy. *PloS One* 4, e5676.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752.
- Pervaiz, S., Taneja, R., and Ghaffari, S. (2009). Oxidative stress regulation of stem and progenitor cells. *Antioxidants Redox Signal.* 11, 2777–2789.
- Petersen, C.M., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H.H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P., and Moestrup, S.K. (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 272, 3599–3605.
- Pierotti, M.A., and Greco, A. (2006). Oncogenic rearrangements of the NTRK1/NGF receptor. *Cancer Lett.* 232, 90–98.
- Podlesniy, P., Kichev, A., Pedraza, C., Saurat, J., Encinas, M., Perez, B., Ferrer, I., and Espinet, C. (2006). Pro-NGF from Alzheimer's disease and normal human brain displays distinctive abilities to induce processing and nuclear translocation of intracellular domain of p75NTR and apoptosis. *Am. J. Pathol.* 169, 119–131.
- Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J. Clin. Invest.* 117, 3155–3163.
- Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P.A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 33–45.
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M.A., and Daidone, M.G. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 65, 5506–5511.
- Popnikolov, N.K., Cavone, S.M., Schultz, P.M., and Garcia, F.U. (2005). Diagnostic utility of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) as a marker of breast myoepithelial cells. *Mod. Pathol. Off. J. United States Can. Acad. Pathol. Inc* 18, 1535–1541.

Bibliographie

- Powell, J.C., Twomey, C., Jain, R., and McCarthy, J.V. (2009). Association between Presenilin-1 and TRAF6 modulates regulated intramembrane proteolysis of the p75NTR neurotrophin receptor. *J. Neurochem.* *108*, 216–230.
- Prabhakaran, P., Hassiotou, F., Blancafort, P., and Filgueira, L. (2013). Cisplatin induces differentiation of breast cancer cells. *Front. Oncol.* *3*, 134.
- Previati, M., Manfrini, M., Galasso, M., Zerbinati, C., Palatini, J., Gasparini, P., and Volinia, S. (2013). Next generation analysis of breast cancer genomes for precision medicine. *Cancer Lett.*
- Proia, T.A., Keller, P.J., Gupta, P.B., Klebba, I., Jones, A.D., Sedic, M., Gilmore, H., Tung, N., Naber, S.P., Schnitt, S., et al. (2011). Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* *8*, 149–163.
- Puisieux, A., Valsesia-Wittmann, S., and Ansieau, S. (2006). A twist for survival and cancer progression. *Br. J. Cancer* *94*, 13–17.
- Radeke, M.J., Misko, T.P., Hsu, C., Herzenberg, L.A., and Shooter, E.M. (1987). Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* *325*, 593–597.
- Radisky, D.C., Levy, D.D., Littlepage, L.E., Liu, H., Nelson, C.M., Fata, J.E., Leake, D., Godden, E.L., Albertson, D.G., Nieto, M.A., et al. (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* *436*, 123–127.
- Rattenholl, A., Ruoppolo, M., Flagiello, A., Monti, M., Vinci, F., Marino, G., Lilie, H., Schwarz, E., and Rudolph, R. (2001). Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *J. Mol. Biol.* *305*, 523–533.
- Raymond, K., Deugnier, M.-A., Faraldo, M.M., and Glukhova, M.A. (2009). Adhesion within the stem cell niches. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 623–629.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105–111.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev. Biol.* *175*, 1–13.
- Ribatti, D., Mangialardi, G., and Vacca, A. (2006). Stephen Paget and the “seed and soil” theory of metastatic dissemination. *Clin. Exp. Med.* *6*, 145–149.
- Rodriguez-Tébar, A., Dechant, G., and Barde, Y.A. (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* *4*, 487–492.
- Rodríguez-Tébar, A., Dechant, G., Götz, R., and Barde, Y.A. (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* *11*, 917–922.

Bibliographie

- 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.
- Rønnov-Jessen, L., Petersen, O.W., and Bissell, M.J. (1996). Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol. Rev.* 76, 69–125.
- Rosenthal, A., Goeddel, D.V., Nguyen, T., Lewis, M., Shih, A., Laramee, G.R., Nikolics, K., and Winslow, J.W. (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* 4, 767–773.
- Roux, P.P., and Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* 67, 203–233.
- Roux, P.P., Bhakar, A.L., Kennedy, T.E., and Barker, P.A. (2001). The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 23097–23104.
- Russo, J., and Russo, I.H. (2004). Development of the human breast. *Maturitas* 49, 2–15.
- Saito-Diaz, K., Chen, T.W., Wang, X., Thorne, C.A., Wallace, H.A., Page-McCaw, A., and Lee, E. (2013). The way Wnt works: components and mechanism. *Growth Factors Chur Switz.* 31, 1–31.
- Sakamoto, Y., Kitajima, Y., Edakuni, G., Hamamoto, T., and Miyazaki, K. (2001). Combined evaluation of NGF and p75NGFR expression is a biomarker for predicting prognosis in human invasive ductal breast carcinoma. *Oncol. Rep.* 8, 973–980.
- Salama-Cohen, P., Arévalo, M.-A., Meier, J., Grantyn, R., and Rodríguez-Tébar, A. (2005). NGF controls dendrite development in hippocampal neurons by binding to p75NTR and modulating the cellular targets of Notch. *Mol. Biol. Cell* 16, 339–347.
- Salehi, A.H., Xanthoudakis, S., and Barker, P.A. (2002). NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 48043–48050.
- Sanchez-Ramos, J.R., Song, S., Kamath, S.G., Zigova, T., Willing, A., Cardozo-Pelaez, F., Stedeford, T., Chopp, M., and Sanberg, P.R. (2001). Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp. Neurol.* 171, 109–115.
- Sang, L., Roberts, J.M., and Collier, H.A. (2010). Hijacking HES1: how tumors co-opt the anti-differentiation strategies of quiescent cells. *Trends Mol. Med.* 16, 17–26.
- Sarkar, A., and Hochedlinger, K. (2013). The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* 12, 15–30.
- Sauvageau, M., and Sauvageau, G. (2010). Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* 7, 299–313.

Bibliographie

- Von Schack, D., Casademunt, E., Schweigreiter, R., Meyer, M., Bibel, M., and 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.
- Schedin, P., O'Brien, J., Rudolph, M., Stein, T., and Borges, V. (2007). Microenvironment of the involuting mammary gland mediates mammary cancer progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *12*, 71–82.
- Schepers, G.E., Teasdale, R.D., and Koopman, P. (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev. Cell* *3*, 167–170.
- Schinkel, A.H., and Jonker, J.W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *55*, 3–29.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* *103*, 211–225.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* *4*, 7–25.
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D.A., and Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 11307–11312.
- Schweigreiter, R. (2006). The dual nature of neurotrophins. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *28*, 583–594.
- Segal, R.A., Bhattacharyya, A., Rua, L.A., Alberta, J.A., Stephens, R.M., Kaplan, D.R., and Stiles, C.D. (1996). Differential utilization of Trk autophosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* *271*, 20175–20181.
- 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* (Pt 3), 951–960.
- Séradour, B., Allemand, H., Weill, A., and Ricordeau, P. (2010). Sustained lower rates of breast cancer incidence in France in 2007. *Breast Cancer Res. Treat.* *121*, 799–800.
- Sha, K., and Boyer, L.A. (2008). The chromatin signature of pluripotent cells. In *StemBook*, (Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute),.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* *439*, 84–88.
- Sharom, F.J. (2008). ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* *9*, 105–127.
- Shen, J., and Maruyama, I.N. (2011). Nerve growth factor receptor TrkA exists as a preformed, yet inactive, dimer in living cells. *FEBS Lett.* *585*, 295–299.

Bibliographie

- Sheng, M., and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* *24*, 1–29.
- Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R.K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C.H., Goulet, R., Jr, Badve, S., and Nakshatri, H. (2006). CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res. BCR* *8*, R59.
- Shipitsin, M., and Polyak, K. (2008). The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *88*, 459–463.
- Siller, K.H., and Doe, C.Q. (2009). Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* *11*, 365–374.
- Silva, I.A., Bai, S., McLean, K., Yang, K., Griffith, K., Thomas, D., Ginestier, C., Johnston, C., Kueck, A., Reynolds, R.K., et al. (2011). Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival. *Cancer Res.* *71*, 3991–4001.
- Singh, R.P., Franke, K., and Wielockx, B. (2012). Hypoxia-mediated regulation of stem cell fate. *High Alt. Med. Biol.* *13*, 162–168.
- Sládek, N.E. (2003). Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *17*, 7–23.
- Smart, C.E., Morrison, B.J., Saunus, J.M., Vargas, A.C., Keith, P., Reid, L., Wockner, L., Amiri, M.A., Sarkar, D., Simpson, P.T., et al. (2013). In vitro analysis of breast cancer cell line tumourspheres and primary human breast epithelia mammospheres demonstrates inter- and intrasphere heterogeneity. *PLoS One* *8*, e64388.
- Smith, K., and Dalton, S. (2010). Myc transcription factors: key regulators behind establishment and maintenance of pluripotency. *Regen. Med.* *5*, 947–959.
- Søland, T.M., Brusevold, I.J., Koppang, H.S., Schenck, K., and Bryne, M. (2008). Nerve growth factor receptor (p75 NTR) and pattern of invasion predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* *53*, 62–72.
- Sole, C., Dolcet, X., Segura, M.F., Gutierrez, H., Diaz-Meco, M.-T., Gozzelino, R., Sanchis, D., Bayascas, J.R., Gallego, C., Moscat, J., et al. (2004). The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kappa B signaling. *J. Cell Biol.* *167*, 479–492.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8418–8423.
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10869–10874.

Bibliographie

- Spiegel, A., Kalinkovich, A., Shivtiel, S., Kollet, O., and Lapidot, T. (2008). Stem cell regulation via dynamic interactions of the nervous and immune systems with the microenvironment. *Cell Stem Cell* 3, 484–492.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98–104.
- Squazzo, S.L., O’Geen, H., Komashko, V.M., Krig, S.R., Jin, V.X., Jang, S., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R., and Farnham, P.J. (2006). Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner. *Genome Res.* 16, 890–900.
- Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M.J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., and Plath, K. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 136, 364–377.
- Srinivasan, B., Roque, C.H., Hempstead, B.L., Al-Ubaidi, M.R., and Roque, R.S. (2004). Microglia-derived pronerve growth factor promotes photoreceptor cell death via p75 neurotrophin receptor. *J. Biol. Chem.* 279, 41839–41845.
- Stefanovic, S., and Pucéat, M. (2007). Oct-3/4: not just a gatekeeper of pluripotency for embryonic stem cell, a cell fate instructor through a gene dosage effect. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 8–10.
- Stefansson, O.A., and Esteller, M. (2013). Epigenetic Modifications in Breast Cancer and Their Role in Personalized Medicine. *Am. J. Pathol.*
- Stendahl, M., Kronblad, A., Rydén, L., Emdin, S., Bengtsson, N.O., and Landberg, G. (2004). Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *Br. J. Cancer* 90, 1942–1948.
- Stephens, R.M., Loeb, D.M., Copeland, T.D., Pawson, T., Greene, L.A., and Kaplan, D.R. (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 12, 691–705.
- Sternlicht, M.D., Kouros-Mehr, H., Lu, P., and Werb, Z. (2006). Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differ. Res. Biol. Divers.* 74, 365–381.
- Stingl, J. (2009). Detection and analysis of mammary gland stem cells. *J. Pathol.* 217, 229–241.
- Surface, L.E., Thornton, S.R., and Boyer, L.A. (2010). Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment. *Cell Stem Cell* 7, 288–298.
- Suter, U., Heymach, J.V., Jr, and Shooter, E.M. (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.
- Suzuki, R., Atherton, A.J., O’Hare, M.J., Entwistle, A., Lakhani, S.R., and Clarke, C. (2000). Proliferation and differentiation in the human breast during pregnancy. *Differ. Res. Biol. Divers.* 66, 106–115.

Bibliographie

- Tabassum, A., Khwaja, F., and Djakiew, D. (2003). The p75(NTR) tumor suppressor induces caspase-mediated apoptosis in bladder tumor cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *105*, 47–52.
- Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Desantis, G., Tessitore, A., Vetuschi, A., Sferra, R., Rucci, N., Argenti, B., Screpanti, I., et al. (2004). TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* *6*, 347–360.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663–676.
- Takakura, N. (2011). Role of intimate interactions between endothelial cells and the surrounding accessory cells in the maturation of blood vessels. *J. Thromb. Haemost. JTH* *9 Suppl 1*, 144–150.
- Takebe, N., Harris, P.J., Warren, R.Q., and Ivy, S.P. (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *8*, 97–106.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 131–142.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* *139*, 871–890.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.
- Thomson, M., Liu, S.J., Zou, L.-N., Smith, Z., Meissner, A., and Ramanathan, S. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* *145*, 875–889.
- TILL, J.E., and McCULLOCH, E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* *14*, 213–222.
- Tosoni, D., Di Fiore, P.P., and Pece, S. (2012). Functional purification of human and mouse mammary stem cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *916*, 59–79.
- Touil, Y., Zuliani, T., Wolowczuk, I., Kuranda, K., Prochazkova, J., Andrieux, J., Le Roy, H., Mortier, L., Vandomme, J., Jouy, N., et al. (2012). The PI3K/AKT signaling pathway controls the quiescence of the low-Rhodamine123-retention cell compartment enriched for melanoma stem cell activity. *Stem Cells Dayt. Ohio* *31*, 641–651.
- Trumpp, A., Essers, M., and Wilson, A. (2010). Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 201–209.
- 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.

Bibliographie

- Tsunekawa, Y., and Osumi, N. (2012). How to keep proliferative neural stem/progenitor cells: a critical role of asymmetric inheritance of cyclin D2. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 3550–3554.
- Underwood, C.K., Reid, K., May, L.M., Bartlett, P.F., and Coulson, E.J. (2008). Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* *37*, 346–358.
- Urfer, R., Tsoulfas, P., O'Connell, L., Shelton, D.L., Parada, L.F., and Presta, L.G. (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J.* *14*, 2795–2805.
- Urta, S., Escudero, C.A., Ramos, P., Lisbona, F., Allende, E., Covarrubias, P., Parraguez, J.I., Zampieri, N., Chao, M.V., Annaert, W., 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, C.B., Jansen, P., Fjorback, A.W., Glerup, S., Skeldal, S., Kjolby, M., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J.R., Tessarollo, L., et al. (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat. Neurosci.* *14*, 54–61.
- 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 1741–1752.
- Vargo-Gogola, T., and Rosen, J.M. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 659–672.
- Vega, S., Morales, A.V., Ocaña, O.H., Valdés, F., Fabregat, I., and Nieto, M.A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* *18*, 1131–1143.
- 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.
- Vilar, M., Charalampopoulos, I., Kenchappa, R.S., Simi, A., Karaca, E., Reversi, A., Choi, S., Bothwell, M., Mingarro, I., Friedman, W.J., et al. (2009). Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* *62*, 72–83.
- Villadsen, R., Fridriksdottir, A.J., Rønnov-Jessen, L., Gudjonsson, T., Rank, F., LaBarge, M.A., Bissell, M.J., and Petersen, O.W. (2007). Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J. Cell Biol.* *177*, 87–101.
- Visvader, J.E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev.* *23*, 2563–2577.
- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 755–768.

Bibliographie

- Vona-Davis, L., and Rose, D.P. (2007). Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr. Relat. Cancer* *14*, 189–206.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* *431*, 873–878.
- Wang, T., Zhao, H., Zhang, Q., Xu, C., and Liu, C. (2013). Generation of transgene-free induced pluripotent stem cells with non-viral methods. *Chin. Med. Sci. J. Chung-Kuo Hsüeh Ko Hsüeh Tsa Chih Chin. Acad. Med. Sci.* *28*, 50–54.
- Wang, X., Bauer, J.H., Li, Y., Shao, Z., Zetoune, F.S., Cattaneo, E., and Vincenz, C. (2001). Characterization of a p75(NTR) apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *J. Biol. Chem.* *276*, 33812–33820.
- Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S., and Ivanova, N. (2012). Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *10*, 440–454.
- Warzecha, C.C., Shen, S., Xing, Y., and Carstens, R.P. (2009). The epithelial splicing factors ESRP1 and ESRP2 positively and negatively regulate diverse types of alternative splicing events. *RNA Biol.* *6*, 546–562.
- Watson, F.L., Porcionatto, M.A., Bhattacharyya, A., Stiles, C.D., and Segal, R.A. (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J. Neurobiol.* *39*, 323–336.
- Weg-Remers, S., Ponta, H., Herrlich, P., and König, H. (2001). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway. *EMBO J.* *20*, 4194–4203.
- Weigelt, B., Peterse, J.L., and van 't Veer, L.J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 591–602.
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U.C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., et al. (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1487–1495.
- Wells, A., Griffith, L., Wells, J.Z., and Taylor, D.P. (2013). The dormancy dilemma: quiescence versus balanced proliferation. *Cancer Res.* *73*, 3811–3816.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* *448*, 318–324.
- Weskamp, G., Schlöndorff, J., Lum, L., Becherer, J.D., Kim, T.-W., Saftig, P., Hartmann, D., Murphy, G., and Blobel, C.P. (2004). Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J. Biol. Chem.* *279*, 4241–4249.
- Wiesmann, C., and de Vos, A.M. (2001). Nerve growth factor: structure and function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *58*, 748–759.

Bibliographie

- Wiesmann, C., Ultsch, M.H., Bass, S.H., and de Vos, A.M. (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* *401*, 184–188.
- Wright, M.H., Calcagno, A.M., Salcido, C.D., Carlson, M.D., Ambudkar, S.V., and Varticovski, L. (2008). Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res. BCR* *10*, R10.
- Xie, T., and Spradling, A.C. (2000). A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* *290*, 328–330.
- Xu, J., Chen, Y., and Olopade, O.I. (2010). MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer* *1*, 629–640.
- Yamanaka, S. (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *1*, 39–49.
- Yamashita, T., and Tohyama, M. (2003). The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat. Neurosci.* *6*, 461–467.
- Yamashita, T., Tucker, K.L., and Barde, Y.A. (1999). Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* *24*, 585–593.
- Yan, H., and Chao, M.V. (1991). Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J. Biol. Chem.* *266*, 12099–12104.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* *117*, 927–939.
- Yang, M.-H., Hsu, D.S.-S., Wang, H.-W., Wang, H.-J., Lan, H.-Y., Yang, W.-H., Huang, C.-H., Kao, S.-Y., Tzeng, C.-H., Tai, S.-K., et al. (2010). Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* *12*, 982–992.
- Yerushalmi, R., Hayes, M.M., and Gelmon, K.A. (2009). Breast carcinoma--rare types: review of the literature. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *20*, 1763–1770.
- Yin, H., and Glass, J. (2011). The phenotypic radiation resistance of CD44+/CD24(-or low) breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling. *PloS One* *6*, e24080.
- Yin, S., Xu, L., Bandyopadhyay, S., Sethi, S., and Reddy, K.B. (2011). Cisplatin and TRAIL enhance breast cancer stem cell death. *Int. J. Oncol.* *39*, 891–898.
- Ying, M., Wang, S., Sang, Y., Sun, P., Lal, B., Goodwin, C.R., Guerrero-Cazares, H., Quinones-Hinojosa, A., Laterra, J., and Xia, S. (2011). Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition. *Oncogene* *30*, 3454–3467.
- Yoshida, K., and Miki, Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* *95*, 866–871.

Bibliographie

Young, K.M., Merson, T.D., Sotthibundhu, A., Coulson, E.J., and Bartlett, P.F. (2007). p75 neurotrophin receptor expression defines a population of BDNF-responsive neurogenic precursor cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 5146–5155.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.

Yu, K.-R., Yang, S.-R., Jung, J.-W., Kim, H., Ko, K., Han, D.W., Park, S.-B., Choi, S.W., Kang, S.-K., Schöler, H., et al. (2012). CD49f enhances multipotency and maintains stemness through the direct regulation of OCT4 and SOX2. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 876–887.

Zampieri, N., Xu, C.-F., Neubert, T.A., and Chao, M.V. (2005). Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains. *J. Biol. Chem.* 280, 14563–14571.

Zeng, W., Wan, R., Zheng, Y., Singh, S.R., and Wei, Y. (2011). Hypoxia, stem cells and bone tumor. *Cancer Lett.* 313, 129–136.

Zhang, J., Yang, P.L., and Gray, N.S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 9, 28–39.

Zhu, Z., Kleeff, J., Kaye, H., Wang, L., Korc, M., Büchler, M.W., and Friess, H. (2002). Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol. Carcinog.* 35, 138–147.