

**Université Lille Nord de France**

**THÈSE DE DOCTORAT**

Pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE**

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

Présentée par

**Léo AUBERT**

**Implication de réseaux de récepteurs membranaires dans  
la signalisation du NGF et de son précurseur dans les  
cellules cancéreuses de sein**

Soutenue le 8 décembre 2014 devant la commission d'examen :

**Rapporteurs** :

Dr. Sandrine BOURDOULOUS

Pr. Antoine GALMICHE

**Examineurs** :

Dr. Patricia FORGEZ

Pr. Nicolas MAGNE

**Directrice de laboratoire** :

Pr. Xuefen LE BOURHIS

**Directeur de thèse** :

Pr. Robert-Alain TOILLON



**Université Lille Nord de France**

**THÈSE DE DOCTORAT**

Pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE**

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

Présentée par

**Léo AUBERT**

**Implication de réseaux de récepteurs membranaires dans  
la signalisation du NGF et de son précurseur dans les  
cellules cancéreuses de sein**

Soutenue le 8 décembre 2014 devant la commission d'examen :

**Rapporteurs** :

Dr. Sandrine BOURDOULOUS

Pr. Antoine GALMICHE

**Examineurs** :

Dr. Patricia FORGEZ

Pr. Nicolas MAGNE

**Directrice de laboratoire** :

Pr. Xuefen LE BOURHIS

**Directeur de thèse** :

Pr. Robert-Alain TOILLON

## REMERCIEMENTS

*Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été réalisés sous le tutorat scientifique de Monsieur le Professeur Robert-Alain Toillon, au sein du laboratoire INSERM U908 « Cell plasticity & Cancer », dirigé par Madame le Professeur Xuefen Le Bourhis.*

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

## REMERCIEMENTS

*Je remercie profondément Monsieur le Professeur **Hubert Hondermarck** et Madame le Professeur **Xuefen Le Bourhis**, qui se sont succédés en tant que directeur/directrice du laboratoire, pour la confiance qu'ils m'ont accordé en m'accueillant mais aussi pour leur soutien permanent lors de la réalisation de ce travail.*

*Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur **Robert-Alain Toillon** qui, par son investissement, sa grande disponibilité et son optimisme à toute épreuve, m'a soutenu tout au long de ces trois années de thèse. Vous avez toujours été à mon écoute et vous avez en permanence veillé à ce que je puisse travailler dans les meilleures conditions, je vous en remercie sincèrement.*

*Je tiens à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail : Madame le Docteur **Sandrine Bourdoulous** et Monsieur le Professeur **Antoine Galmiche**, pour le temps consacré et l'investissement dont vous avez fait preuve pour juger ce travail, soyez assurés de ma sincère gratitude ; Madame le Docteur **Patricia Forgez**, Monsieur le Professeur **Nicolas Magné** et Madame le Professeur **Xuefen Le Bourhis** pour avoir accepté d'examiner ce travail, puissiez-vous trouver ici l'expression de ma grande reconnaissance.*

*J'adresse mes remerciements à tous les membres de l'équipe de l'INSERM U908 qui m'ont accompagné durant ma thèse :*

***Chann**, notre superstar à l'américaine capable d'allier bonhommie et travail ! Ton retour au laboratoire aura été très bénéfique pour tout le monde. **Eric**, merci tant pour les conseils avisés lors des réunions de laboratoire que pour le temps que tu as bien voulu consacré pour les manip des souris. Jamais de mauvaise humeur, ton flair pour pressentir les pots m'aura toujours impressionné ! **Pierre-Olivier** et **Pamela**, votre arrivée au laboratoire s'est accompagnée d'une véritable révolution en biomol ! Je ne vous remercierai jamais assez pour m'avoir tant appris en si peu de temps et d'avoir fait preuve d'autant de patience à mon égard en m'aidant dans mes manip. **Samuel**, malgré l'éloignement, tu m'es toujours apparu comme quelqu'un de passionné et sympathique. J'aurais apprécié travailler plus avec toi. **Sophie**, je ne t'ai connue que sur le tard mais le courant est vite passé. J'ai beaucoup aimé ta simplicité et ta sympathie. **Sylvain**, pour m'avoir fait partager ta passion pour la glycobioologie. **Nathalie**, dont j'ai toujours apprécié le sourire et la bonne humeur quotidienne. Un grand merci pour ta patience, ne serait ce que pour les innombrables questions que j'ai pu te poser en biomol. **Isa** et **Véro**, duo de choc, merci pour toutes les*

## REMERCIEMENTS

tâches rébarbatives effectuées au sein du laboratoire, qui nous facilitent énormément notre travail. **Valérie**, pour avoir toujours répondu à mes requêtes administratives avec un grand sourire.

Je remercie, bien évidemment, mes amis thésards, ingénieur et jeunes docteurs pour le soutien indéfectible dont vous avez fait preuve à mon égard tout au long de cette grande aventure :

**Matthieu**, râleur professionnel mais surtout véritable compagnon de galère durant mes deux dernières années de thèse : on en aura vécu des épreuves ensemble, mon ami ! Nous avons, fort heureusement, toujours réussi à alterner nos petits « coups de moins bien », ce qui nous a permis de nous remonter le moral mutuellement. Merci encore de m'avoir fait découvrir le Japon... Enfin, euh... Tokyo !

Les spice girls **Barbara**, « miss référence zebrafish » et **Justine**, « miss référence cellule souche ». Votre capacité à rire de tout et de rien est juste incroyable et surtout très communicatif ! Je ne compte plus les fous rires qu'on a pu vivre ensemble. Merci d'avoir toujours été à mon écoute lors de cette dernière longue ligne droite.

**Jérémy**, le Ch'ti dernier de la bande. Adeptes de la « zen-attitude », je mets au défi quiconque arrivera à te mettre en colère ! Bien que je veuille bien reconnaître tes compétences footballistiques, il serait temps que tu supportes un vrai club de foot !

**Cyril**, « mon PeTiT CyRiL », au-delà d'avoir été mon mentor à mes débuts, tu es devenu un très bon ami sur qui je peux compter en toutes circonstances. J'ai toujours été impressionné par ta générosité et ta simplicité. En revanche, beaucoup moins par tes pronostics footballistiques...

**Elisa**, la plus française des italiennes et un p'tit bout de femme au cœur immense ! Tes délires (notamment tes rêves toujours un peu fous) et ta joie de vivre nous ont fait vivre des moments inoubliables entre thésards ! Saches que ton amitié et tes conseils comptent beaucoup pour moi, « ma petite Elisa ».

**JP**, tu as veillé à ma bonne intégration dans le laboratoire alors que je n'étais qu'un « p'tit Master 2 ». Bien que nous nous sommes un peu perdus de vue par la suite, je ne garde que de bons souvenirs des moments que nous avons pu partager.

Bon courage à la relève : **Romain**. L'aventure ne fait que commencer pour toi et je te souhaite sincèrement de franchir la première étape : réussir ton Master.

## REMERCIEMENTS

*Je remercie également les personnes que j'ai eu la chance de côtoyer durant ma thèse : **Christophe, Ingrid, Emmanuelle** pour vos encouragements et vos nombreux conseils notamment lors de mes débuts en enseignement ; **Justine**, pour ta simplicité et ton amitié à laquelle je tiens beaucoup ; **Agata**, pour ton sourire et ta joie de vivre très communicative ; **Gabriel et Anne-Sophie**, pour votre bonne humeur et sympathie lors des séances de cytométrie en flux ; **Laura** et enfin la légion de stagiaires (**Chiara, Daniele, Romain, Gwendoline, Luc, Yoan, Haoling, Delphine, Carine, Mathieu** et tous ceux que j'aurais oublié...).*

*Je remercie les personnes avec lesquelles j'ai eu le plaisir de collaborer au cours de cette thèse : Madame le Docteur **Elisabeth Génot**, pour ses relectures, sa patience et son aide pour le protocole des RhoGTPases ; Monsieur le Professeur **Dominique Chevalier** et son équipe qui nous ont ouvert l'accès à la clinique ; **Anne-Sophie Lacoste**, sans qui les analyses de spectrométrie de masse n'auraient pas eu lieu.*

*Un grand merci à tous les amis qui m'ont supporté en dehors du laboratoire : **Maylis**, pour ton oreille attentive lors de nos soirées et ton amitié qui m'est très précieuse ; **Marie**, pour ta générosité et tes encouragements à des moments clés de la thèse ; **Nicolas**, pour nos petites soirées avec le reste de la bande ; mais aussi **Romain, Clément, Rémy, Florian, Emeline, Shoko, Eric, Gervan** pour votre implication et vos pensées qui m'ont beaucoup aidé à garder le cap.*

*Enfin, je terminerai en remerciant du fond du cœur toute **ma famille** qui m'a toujours encouragé, y compris dans les moments les plus difficiles. Mention spéciale à **mes parents**, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. C'est un peu votre thèse que je soutiens aujourd'hui.*

## RESUME

### Résumé

Notre laboratoire a montré que le NGF et les neurotrophines sont des facteurs déterminants de la cancérogenèse mammaire, et plus particulièrement de la croissance et de l'invasion des cellules cancéreuses de sein. Les effets du NGF dépendent, entre autres, de l'activation du récepteur à activité tyrosine kinase TrkA. Récemment, nous avons décrit que le précurseur du NGF, le proNGF, est également produit et sécrété par les cellules cancéreuses de sein pour induire leur invasion *via* la formation d'un complexe sortiline/TrkA. Néanmoins, les différentes signalisations induites par le NGF et le proNGF ne sont pas encore parfaitement décryptées dans le cancer du sein.

Au cours de ma thèse, j'ai démontré que le NGF et le proNGF induisent des complexes de récepteurs distincts. Ainsi, alors que le NGF conduit à la formation d'un complexe membranaire TrkA/CD44, le proNGF recrute quant à lui la sortiline, TrkA et EphA2. En outre, les études *in vivo*, réalisées dans un modèle de souris SCID, montrent que la croissance tumorale est dépendante de la formation de ces complexes. Ainsi, l'administration conjointe d'un inhibiteur de l'activité kinase de TrkA (CEP-701) et d'un ARN interférent dirigé soit contre CD44, soit contre EphA2, diminue significativement le volume tumoral en comparaison à l'utilisation en monothérapie du CEP-701 ou d'un siEphA2 ou du siCD44.

L'ensemble de mes résultats a permis d'approfondir les mécanismes d'action du NGF et de son précurseur dans les cellules cancéreuses mammaires et suggère l'existence de mécanismes de résistance à travers les coopérations TrkA/CD44 et TrkA/EphA2, ouvrant ainsi l'opportunité à de nouvelles stratégies thérapeutiques dans les cancers.



# RESUME

## Abstract

We have shown that autocrine stimulation of breast tumor cells by NGF increased both cell growth and migration/invasion. These effects are mediated by TrkA, a receptor tyrosine kinases. Recently, it has been described that proNGF, the NGF precursor, is also produced and secreted by breast cancer cells to induce invasion through activation of sortilin/TrkA complex. Nevertheless, NGF and proNGF signaling are still unclear in breast cancer.

During my thesis, I have demonstrated that the pro-invasive signaling of (pro)NGF requires the formation of NGF/TrkA/CD44 and proNGF/sortilin/TrkA/EphA2 complexes. I have showed that each of these receptor complexes leads to the induction of two separate transduction pathways, one dependent on TrkA phosphorylation, and the other independently. Furthermore, by using a SCID mouse xenograft model, we have demonstrated the involvement of TrkA/CD44 and TrkA/EphA2 complexes in tumor growth. Interestingly, the co-administration of an inhibitor of the TrkA kinase activity (CEP-701) and a siRNA directed either against CD44 or against EphA2, decreases significantly the tumor burden in comparison to the use of CEP-701, siEphA2 or siCD44 alone.

Thus, our findings have improved the knowledge of NGF and proNGF signaling in breast cancer cells and suggest the presence of resistance mechanisms mediated by TrkA/CD44 and TrkA/EphA2 interactions, thereby giving the opportunity for new therapeutic modulations in breast cancer.

---

# SOMMAIRE

---

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>4</b>
<i>FIGURES .....</i>	<i>4</i>
<i>TABLEAUX.....</i>	<i>5</i>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>8</b>
<b>I. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCERISATION.....</b>	<b>9</b>
<b>A) La glande mammaire normale.....</b>	<b>9</b>
1. Anatomie et histologie.....	9
2. Développement et contrôle.....	12
<b>B) Le cancer du sein.....</b>	<b>15</b>
1. Epidémiologie.....	15
2. Etiologie et facteurs de risque.....	16
3. Mécanismes de la tumorigenèse mammaire.....	19
a) Stades de développement.....	19
b) Altérations génétiques.....	20
✓ Les oncogènes :.....	21
✓ Les gènes suppresseurs de tumeurs :.....	24
c) Influence du microenvironnement tumoral.....	26
4. L'hétérogénéité tumorale du cancer du sein.....	31
a) Les différentes théories menant à l'hétérogénéité tumorale mammaire.....	31
✓ Modèle stochastique ou hiérarchique ?.....	33
b) Les différents types de cancers du sein.....	34
✓ Les carcinomes in situ (ou non infiltrants) :.....	35
✓ Les carcinomes invasifs (ou infiltrants) :.....	35
✓ Les autres formes malignes de cancers mammaires (rares en France) :.....	37
c) Classifications des cancers du sein.....	37
✓ Le Grade de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) – modification de Nottingham (Elston-Ellis) :.....	38
✓ Le Stade TNM :.....	39
✓ La classification moléculaire :.....	40
5. Cancer du sein et thérapies ciblées.....	43
a) Ciblage des voies de signalisation associées aux facteurs de croissance.....	44
✓ Les cancers du sein HER2+ :.....	45

## SOMMAIRE

✓	Les cancers du sein hormono-dépendants (Luminal A et Luminal B) : .....	48
✓	Les cancers du sein « triple négatifs » (TN) : .....	50
b)	Mécanismes de résistances aux thérapies ciblées : exemple de la résistance aux thérapies anti-HER2 dans le cancer du sein .....	55
II.	LE (PRO)NGF ET SES RECEPTEURS .....	59
A)	<i>Le NGF et son précurseur</i> .....	59
1.	Découverte des neurotrophines .....	59
2.	Structure du (pro)NGF : du gène aux protéines .....	59
a)	Le produit du gène NGF .....	60
b)	Le proNGF : plus qu'un simple précurseur protéique.....	61
c)	Conformation active du (pro)NGF .....	62
B)	<i>Les récepteurs du (pro)NGF</i> .....	63
1.	La sortiline .....	64
a)	Découverte .....	64
b)	Structure : du gène à la protéine .....	64
2.	Le récepteur p75 <sup>NTR</sup> .....	67
a)	Découverte .....	67
b)	Structure : du gène à la protéine .....	67
c)	Les différentes formes de p75 <sup>NTR</sup> .....	70
✓	Epissage alternatif .....	70
✓	Protéolyse de p75 <sup>NTR</sup> .....	70
3.	Le récepteur TrkA.....	72
a)	Découverte .....	73
b)	Structure : du gène à la protéine .....	73
c)	Les isoformes de TrkA.....	76
C)	<i>La signalisation du récepteur TrkA</i> .....	78
1.	Activation du récepteur .....	78
2.	Recrutement des protéines d'amarrage ou " <i>docking proteins</i> " .....	79
3.	Voies de signalisation associées au récepteur TrkA .....	80
a)	Voie des MAPK.....	82
b)	Voie PI3K/Akt .....	83
c)	Voie PLC-γ1/PKC .....	84
4.	Mécanismes de régulation de l'activité de TrkA .....	85
a)	Transactivation du récepteur TrkA .....	85
b)	Recrutement de phosphatases.....	85
c)	Régulation spatio-temporelle de l'activité de TrkA .....	86
d)	Ubiquitination.....	88
D)	<i>Les coopérations entre TrkA, p75<sup>NTR</sup> et sortiline</i> .....	89

# SOMMAIRE

1. Les coopérations entre TrkA et p75 <sup>NTR</sup> .....	89
2. Les coopérations entre p75 <sup>NTR</sup> et sortiline .....	92
3. Les coopérations entre TrkA et sortiline .....	93
E) <i>NGF, proNGF et TrkA dans les cancers</i> .....	95
1. NGF et proNGF dans le cancer du sein .....	97
2. L'axe NGF/TrkA, une cible thérapeutique dans les cancers .....	98
<b>DEMARCHE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>101</b>
<i>Contexte scientifique</i> .....	102
<i>Objectifs de la thèse</i> .....	103
<i>Méthodologie</i> .....	103
<i>Valorisation des résultats</i> .....	104
<b>RESULTATS</b> .....	<b>105</b>
<i>Brevet d'invention</i> : .....	106
<i>Article 1</i> : .....	107
<i>Article 2</i> : .....	149
<b>DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES</b> .....	<b>187</b>
I. SIGNALISATION DU PRONGF DANS LES CELLULES CANCEREUSES DE SEIN .....	188
A) <i>Formation du complexe sortiline/TrkA/EphA2</i> .....	188
B) <i>Voie de signalisation dépendante de la phosphorylation de TrkA</i> .....	190
C) <i>Voie de signalisation indépendante de la phosphorylation de TrkA</i> .....	191
II. SIGNALISATION DU NGF DANS LES CELLULES CANCEREUSES DE SEIN .....	193
A) <i>Recrutement spécifique de CD44 sous l'effet du NGF</i> .....	194
B) <i>Voie de signalisation sous-jacente à CD44</i> .....	195
III. AXES (PRO)NGF/TRKA, CIBLES THERAPEUTIQUES DANS LES CANCERS ? .....	198
A) <i>Implication des complexes TrkA/EphA2 et TrkA/CD44 dans la progression tumorale in vivo</i> .....	198
B) <i>Voies d'échappement aux thérapies ciblant l'activité kinase de TrkA</i> .....	200
C) <i>Caractérisation des déterminants moléculaires de l'interaction TrkA/CD44, vers le développement de nouvelles thérapies ?</i> .....	202
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>205</b>

# SOMMAIRE

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### FIGURES

FIGURE 1 : ANATOMIE ET ARCHITECTURE DE LA GLANDE MAMMAIRE.....	10
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'UNITE TERMINALE DUCTO-LOBULAIRE (UTDL) ...	11
FIGURE 3 : HISTOLOGIE DE LA GLANDE MAMMAIRE NORMALE .....	12
FIGURE 4 : DEVELOPPEMENT DE LA GLANDE MAMMAIRE .....	14
FIGURE 5 : TENDANCE CHRONOLOGIQUE DES TAUX D'INCIDENCE ET DE MORTALITE LIES AU CANCER DU SEIN EN FRANCE .....	16
FIGURE 6 : ETAPES DE LA CANCERISATION D'UN EPITHELIUM CANALAIRE MAMMAIRE .....	20
FIGURE 7 : INTERACTIONS ENTRE LES CELLULES EPITHELIALES CANCEREUSES DE SEIN ET LES CELLULES STROMALES DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL. ....	27
FIGURE 8 : LES DEUX THEORIES DE L'ORIGINE CELLULAIRE DU CANCER DU SEIN .....	32
FIGURE 9 : LES DEUX MODELES DE L'HETEROGENEITE INTER-TUMORALE .....	34
FIGURE 10 : HISTOLOGIE DES PRINCIPAUX TYPES DE CANCERS DU SEIN .....	36
FIGURE 11 : LES PRINCIPALES THERAPIES CIBLEES UTILISEES DANS LES DIFFERENTS SOUS-TYPES MOLECULAIRES DE CANCERS DU SEIN .....	43
FIGURE 12: LES PRINCIPAUX AGENTS THERAPEUTIQUES CIBLANT LES VOIES DE SIGNALISATION DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LE CANCER DU SEIN .....	54
FIGURE 13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PROTEINE (PRO)NGF .....	60
FIGURE 14 : STRUCTURE DU NGF ET DU PRONGF.....	63
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA SORTILINE.....	66
FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU RECEPTEUR P75 <sup>NTR</sup> .....	69
FIGURE 17 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU RECEPTEUR TRKA-I.....	76
FIGURE 18 : ISOFORMES DU RECEPTEUR TRKA.....	78
FIGURE 19 : PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION ASSOCIEES A L'AXE NGF/TRKA.....	81
FIGURE 20 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN ENDOSOME DE SIGNALISATION.....	88
FIGURE 21 : LES COOPERATIONS ENTRE TRKA, P75 <sup>NTR</sup> ET SORTILINE .....	95
FIGURE 22 : SIGNALISATION PRO-INVASIVE DU PRONGF .....	190
FIGURE 23 : SIGNALISATION PRO-INVASIVE DU NGF .....	198

# SOMMAIRE

## TABLEAUX

TABLEAU 1 : EVOLUTION DE L'INCIDENCE ET DE LA MORTALITE PAR CANCER DU SEIN EN FRANCE, EN NOMBRE DE CAS PAR ANNEE.....	16
TABLEAU 2 : PRINCIPAUX FACTEURS ETIOLOGIQUES DE CANCER DU SEIN.....	18
TABLEAU 3 : METHODE D'EVALUATION DES FACTEURS HISTOLOGIQUES DU GRADE SBR.....	38
TABLEAU 4 : CLASSIFICATION SBR DES GRADES DE CANCER DU SEIN.....	38
TABLEAU 5 : CLASSIFICATION TNM DES STADES DE CANCER DU SEIN .....	39
TABLEAU 6 : CLASSIFICATION MOLECULAIRE DES CANCERS DU SEIN .....	42
TABLEAU 7 : CARACTERISTIQUES DES NEUROTROPHINES HUMAINES .....	60
TABLEAU 8 : CARACTERISTIQUES DE LA SORTILINE HUMAINE .....	64
TABLEAU 9 : CARACTERISTIQUES DU RECEPTEUR p75 <sup>NTR</sup> HUMAIN .....	67
TABLEAU 10 : CARACTERISTIQUES DU RECEPTEUR TRKA HUMAIN .....	73
TABLEAU 11 : EFFETS PRO ET ANTI-TUMORAUX DE L'AXE NGF/TRKA ET DU PRONGF DANS LES CANCERS .....	96

## ABREVIATIONS

### LISTE DES ABREVIATIONS

#### A

**aa:** acide(s) amine(s)

**ADAM17/TACE:** A Disintegrin And Metalloproteinase 17/TNF- $\alpha$  Converting Enzyme

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

**ARMS:** Ankyrin repeat-rich membrane spanning protein

#### B

**Bad:** Bcl-2 associated agonist of cell death

**Bcl-2:** B-cell lymphoma protein-2

**Bcl-XL:** B-cell lymphoma Extra Large

**BDNF:** Brain-Derived Neurotrophic Factor

**BRCA:** BReast CAncer

#### C

**Cdc:** Cell division cycle

**Cdk:** Cyclin-dependent kinase

**CD24/44:** Cluster of Differentiation 24/44

**CKII:** Casein Kinase II

**CRD:** Cystein-Rich Domain

**CSC:** Cellule Souche Cancéreuse

**CSF-1:** Colony-Stimulating Factor-1

**CXCR4:** CXC chemokine Receptor 4

#### D

**DD:** Death Domain

**Dok:** Downstream of tyrosine kinase

#### E

**EGF:** Epidermal Growth Factor

**EGFR:** EGF Receptor

**EphA2:** Ephrin type-A receptor 2

**ER:** Estrogen Receptor

**Erk:** Extracellular signal-regulated kinase

#### F

**FAIM:** Fas Apoptosis Inhibitor Molecule

**FGF:** Fibroblast Growth Factor

**FLT3:** FMS-Like Tyrosine kinase 3

**FRET:** Fluorescence Resonance Energy Transfer

**Frs2:** FGF receptor substrate 2

#### G

**Gab:** Grb2-associated-binding protein

**GDP/GTP:** Guanosine 5'-Diphosphate/  
Guanosine 5'-Triphosphate

**GEF:** Guanine nucleotide Exchange Factor

**GH:** Growth Hormone

**GIPC1:** GAIP-interacting protein, C-terminus 1

**Grb2:** Growth factor receptor-bound protein 2

#### H

**HER2:** Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

**HGF/SF:** Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor

**HSP90:** Heat Shock Protein 90

#### I

**IGF-1:** Insulin-like Growth Factor-1

**IGFBP:** IGF Binding Protein

**I $\kappa$ B:** Inhibitor of kappa B

**IKK:** I $\kappa$ B Kinase

**IL-4/6:** Interleukine-4/6

**IRS:** Insulin Receptor Substrate

#### J

**JAK:** Janus-associated Kinase

**JNK:** c-Jun N-terminal Kinase

## ABREVIATIONS

### M

**M6P:** Mannose 6-phosphate  
**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase  
**MDGF-1:** Mammary Derived Growth Factor-1  
**MEK:** MAPK Kinase  
**MMP:** Matrix MetalloProteinase  
**mTOR:** mammalian Target Of Rapamycin

### N

**NEDD4-2:** Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated 4-2  
**NF- $\kappa$ B:** Nuclear Factor-kappa B  
**NGF:** Nerve Growth Factor  
**NGFR:** Nerve Growth Factor Receptor  
**NK:** Natural Killer  
**NOD:** Non-Obese Diabetic  
**NOMA-GAP:** Neurite outgrowth multiadaptor Rho-GTPase-activating protein  
**NRH2:** Neurotrophin Receptor Homolog 2  
**NT-3 & -4/5:** Neurotrophin-3 & -4/5  
**NTR3:** Neurotensin Receptor 3

### P

**p16<sup>INK4a</sup>:** p16 (Inhibitor of Cdk4)  
**p21<sup>waf1/cip1</sup>:** p21 (wild-type p53-activated fragment 1/Cdk-interacting protein 1)  
**p75<sup>NTR</sup>:** p75 Neurotrophin Receptor  
**p75-CTF:** p75-C-Terminal Fragment  
**p75-ECD:** p75-ExtraCellular Fragment  
**p75-ICD:** p75-IntraCellular Fragment  
**PDGF:** Platelet-Derived Growth Factor  
**PDZ:** Post-synaptic Disc-large Zona  
**PgR:** Progesterone Receptor  
**PI3K:** Phosphoinositide 3-Kinase  
**PIP2:** Phosphatidyl Inositol (4,5) biPhosphate  
**PKC $\iota$ :** Protein Kinase C iota  
**PLC- $\gamma$ 1:** Phospholipase C-gamma 1  
**PTB:** Phosphotyrosine Binding domain

**PTEN:** Phosphatase and TENSin homolog

### R

**RB1:** Retinoblastoma 1  
**RET:** Rearranged during Transfection  
**RTK:** Récepteur Tyrosine Kinase

### S

**SCID:** Severe Combined ImmunoDeficiency  
**SDF-1/CXCL12:** Stromal cell-Derived Factor-1/Chemokine CXC motif Ligand 12  
**SH2:** Src homology 2  
**Shc:** SH2-containg protein  
**SHP:** SH2-containing tyrosine phosphatase  
**Sos:** Son of sevenless  
**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription

### T

**TGF:** Transforming Growth Factor  
**TIMP-1:** Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1  
**TNF:** Tumor Necrosis Factor  
**TRADD:** TNF Receptor-Associated Death Domain protein  
**TRAF6:** TNF receptor-associated factor 6  
**Trk:** Tropomyosin receptor kinase

### U

**uPA:** urokinase-type Plasminogen Activator  
**UTDL:** Unité Terminale Ducto-Lobulaire

### V

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



---

# INTRODUCTION

---

## INTRODUCTION

### I. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCERISATION

#### A) La glande mammaire normale

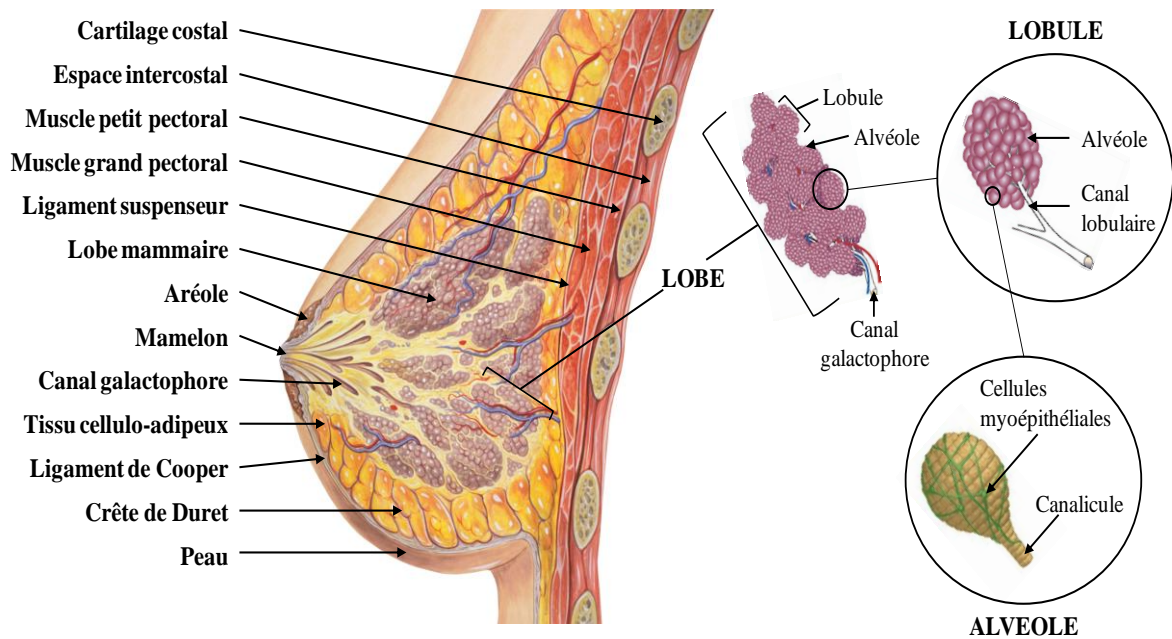
Le sein est une glande exocrine qui assure la sécrétion du lait. La glande mammaire est en perpétuelle évolution, puisqu'elle présente des aspects morphologiques et fonctionnels qui varient au cours des différentes périodes de la vie génitale d'une femme.

#### 1. Anatomie et histologie

Chaque sein est composé d'une glande mammaire entourée de tissu graisseux (tissu cellulo-adipeux), et unie fermement au derme de la peau et aux muscles pectoraux à l'aide de bandes de tissu conjonctif (ligaments de Cooper), de crêtes fibro-glandulaires (crêtes de Duret) et du ligament suspenseur. Le revêtement cutané s'amincit au voisinage du mamelon pour former un disque pigmenté, l'aréole, contenant des glandes sébacées (glandes de Morgani) qui s'hypertrophient à la grossesse et prennent alors le nom de tubercules de Montgomery.

La glande mammaire est une glande exocrine de type tubulo-alvéolaire, constituée de 15 à 20 lobes irréguliers indépendants, délimités par des travées conjonctives interlobaires. Chaque lobe est drainé par un canal galactophore (ou conduit lactifère) qui s'ouvre au niveau du mamelon, et se ramifie progressivement, du revêtement cutané jusqu'à la profondeur du sein, pour former des canaux terminaux (ou canaux lobulaires), aboutissant chacun à un lobule. Ces lobules, séparés les uns des autres par du tissu conjonctif interlobulaire moyennement dense, sont eux-mêmes subdivisés en alvéoles (ou *acini*) s'organisant autour des ramifications les plus distales de l'arborescence mammaire, les canalicules (Figure 1).

## INTRODUCTION



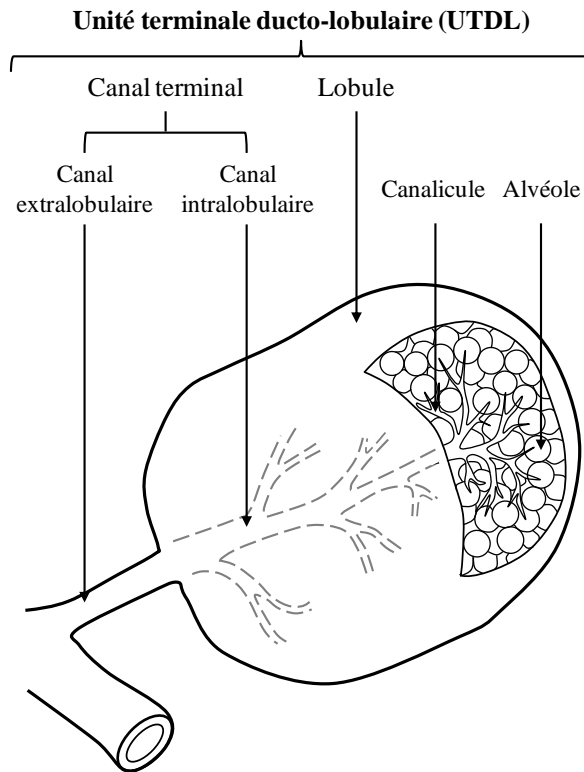
**Figure 1 : Anatomie et architecture de la glande mammaire**

**A gauche : Représentation schématique d'une coupe sagittale du sein et de la paroi thoracique antérieure.** La glande mammaire est une masse de tissu glandulaire noyée dans des tissus fibro-adipeux, et disposée en avant de la paroi thoracique sur la face antérieure des muscles pectoraux. Son architecture comporte 15 à 20 lobes mammaires drainés par des canaux galactophores qui assurent la sécrétion lactée au niveau du mamelon. A sa face antérieure, un tissu cellulo-adipeux double la peau sauf au niveau de l'aréole et du mamelon. Ce tissu forme de véritables amarres conjonctives et vasculo-nerveuses (ligaments de Cooper) qui attachent, via un ensemble de crêtes fibro-glandulaires (crêtes de Duret), la glande mammaire au derme. A sa face postérieure, un autre tissu cellulo-adipeux constitue le ligament suspenseur du sein et permet le glissement normal de la glande mammaire sur les plans musculaires sous-jacents.

**A droite : Représentation schématique de la structure du lobe mammaire.** Un lobe mammaire compte 20 à 40 lobules, eux-mêmes formés par les alvéoles (ou acini). Les alvéoles (10 à 100 alvéoles par lobule) sont composées d'un épithélium sécrétoire qui éjecte le lait dans la lumière de l'alvéole vers les canaux alvéolaires (ou canalicules) jusqu'au canal galactophore grâce à la contraction des cellules myoépithéliales (Adapté de Medical Illustrations by Patrick J. Lynch et [www.santeallaitementmaternel.com](http://www.santeallaitementmaternel.com)).

Chaque canal terminal, constitué d'une partie extra- et intralobulaire, forme avec le lobule correspondant l'unité terminale ducto-lobulaire (UTDL). Les UTDL sont très sensibles aux variations hormonales et sont considérées comme étant les unités fonctionnelles du sein. En effet, les alvéoles composant le lobule au sein d'une UTDL assurent la production du lait pendant la grossesse et demeurent présentes tout au long de la lactation. On sait maintenant que la plupart des lésions mammaires mastosiques et carcinomateuses se développent à partir de l'UTDL (Wellings *et al.*, 1975) (Figure 2).

## INTRODUCTION



**Figure 2 : Représentation schématique de l'unité terminale ducto-lobulaire (UTDL)**

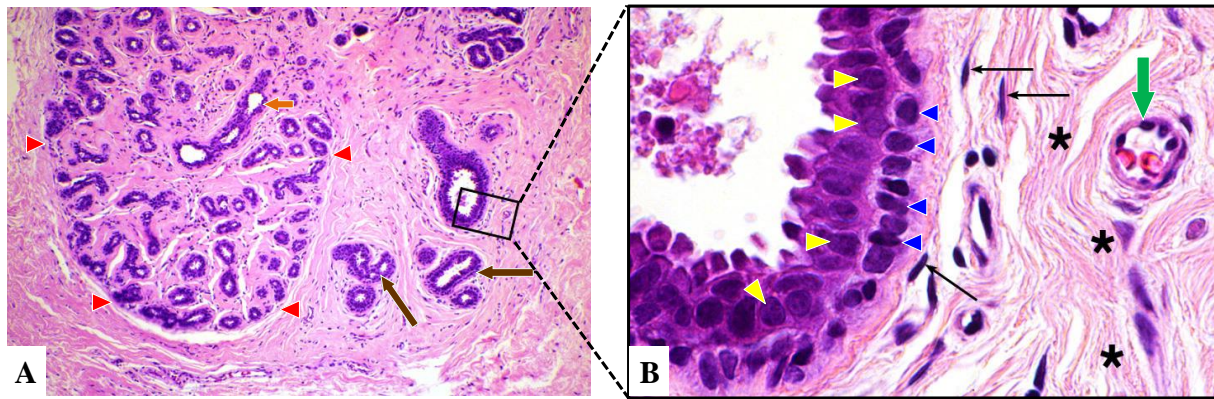
*L'unité terminale ducto-lobulaire, définie par Wellings, se compose d'un lobule associé à des canaux terminaux intra- et extra-lobulaires, et des canalicules. Ces derniers constituent les ramifications ultimes de l'arborescence mammaire et sont alimentés par les alvéoles (ou acini), des structures spécialisées dans la sécrétion lactée (Wellings, 1980).*

D'un point de vue histologique, la glande mammaire est composée de deux entités structurales distinctes en termes de morphologie et de fonctionnalité : les canaux excréteurs et le tissu conjonctif.

L'ensemble du réseau glandulaire est tapissé à sa face interne d'une assise continue de cellules épithéliales sécrétrices de lait, doublée d'une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales fusiformes contractiles. En réponse au stimulus de succion, les cellules myoépithéliales se contractent, provoquant ainsi l'éjection du lait et son acheminement au travers des canaux alvéolaires, lobulaires et galactophores.

La bicouche cellulaire formant l'épithélium mammaire est délimitée par une membrane basale et baigne dans un tissu conjonctif lâche richement vascularisé, le tissu palléal (ou stroma). Le stroma mammaire est formé d'une matrice extracellulaire (majoritairement constituée par des fibres de collagène), d'adipocytes, de fibroblastes, de macrophages, de fibres nerveuses et de vaisseaux sanguins et lymphatiques (Figure 3). Les différents signaux systémiques et paracrines, délivrés par l'ensemble des cellules stromales, sont nécessaires au bon développement de l'arborescence mammaire.

## INTRODUCTION



**Figure 3 : Histologie de la glande mammaire normale**

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

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

## **2. Développement et contrôle**

La taille et l'architecture de la glande mammaire varient tout au long de la vie du stade fœtal à la ménopause. L'essentiel de son développement intervient après la puberté, lors des cycles de gestation/lactation/involution. Le développement de la glande mammaire est donc épisodique et cyclique. Chacune de ses étapes est hautement contrôlée par des régulateurs hormonaux qui agissent en synergie avec le microenvironnement palléal pour assurer le maintien de son homéostasie (Sternlicht, 2006).

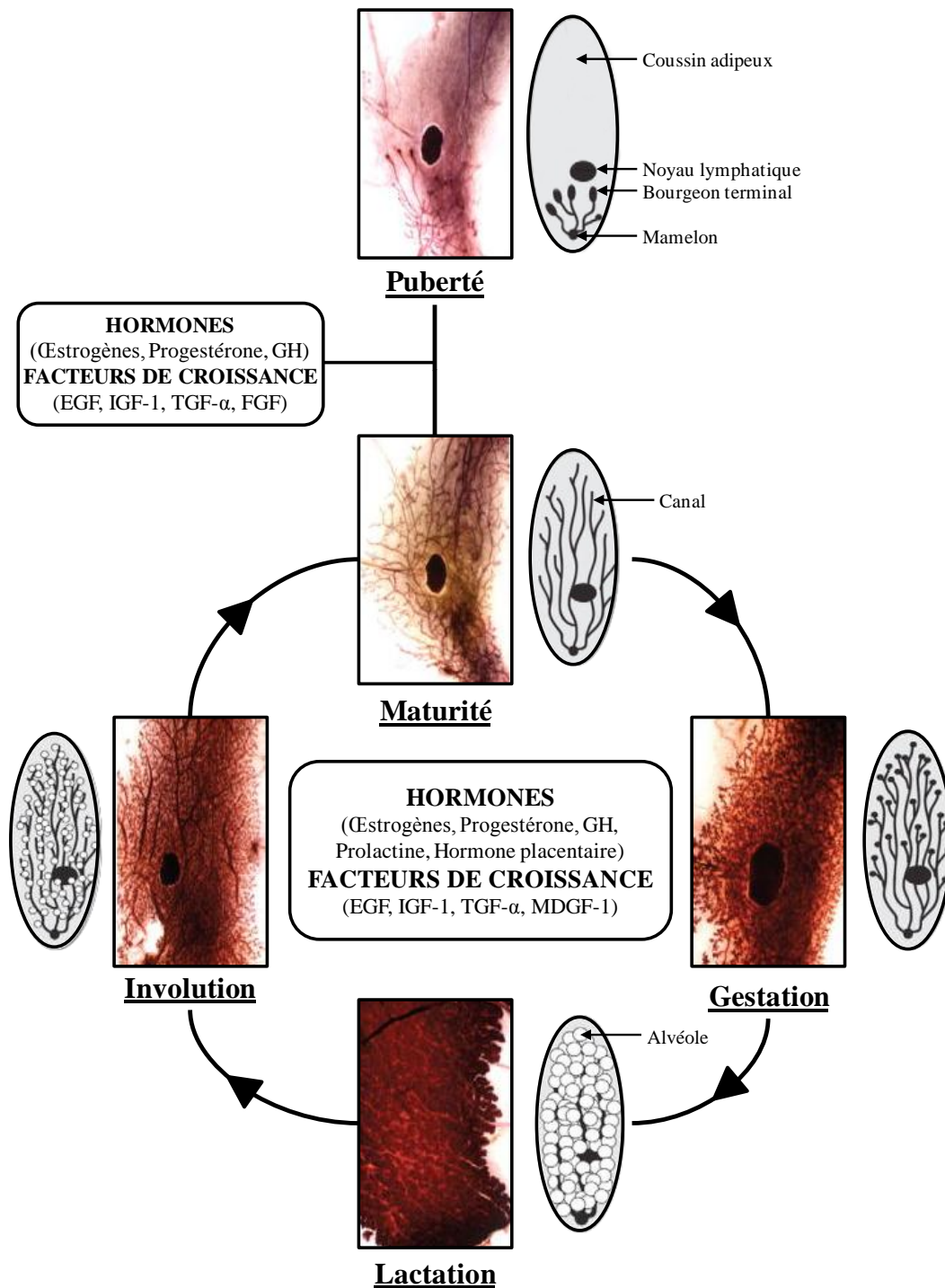
Au cours de la vie fœtale, la morphogénèse de la glande mammaire est limitée à la mise en place d'ébauches mammaires, formées à partir d'un bourgeon de l'ectoderme. A la naissance, ces structures sont rudimentaires et quasiment identiques aux deux sexes. Celles-ci demeurent à ce stade chez l'homme, alors qu'elles évoluent chez la femme, pour former le futur coussin adipeux mammaire, dans lequel apparaîtront pendant l'enfance quelques canaux épithéliaux, coiffés à leurs extrémités par des bourgeons terminaux. A la puberté, l'ovulation et l'établissement des cycles menstruels réguliers induisent une expansion rapide du réseau canalaire et du stroma périphérique, sous l'influence des stéroïdes sexuels (œstrogènes, progestérone), mais aussi de l'hormone de croissance (*Growth Hormone*, GH) et de corticostéroïdes. En revanche, le développement alvéolaire est quant à lui limité, et la majeure partie de l'augmentation de volume des seins est attribuée aux dépôts lipidiques. Ce n'est que

## INTRODUCTION

lors de la gestation que les alvéoles se développent activement et subissent une différenciation lactogénique, sous l'impact des fortes concentrations plasmatiques de progestérone, d'œstrogènes et d'hormone lactogène placentaire. La progestérone et les œstrogènes agissent directement sur les cellules épithéliales et indirectement sur les cellules stromales, sécrétant alors des facteurs de croissance comme l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le TGF- $\alpha$  et TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\alpha$  et  $\beta$* ), le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*), le MDGF-1 (*Mammary-Derived Growth Factor-1*), et des facteurs du stroma tels que l'insuline et les glucocorticoïdes (Pang & Hartmann, 2007). Ces facteurs de croissance régulent à leur tour, de façon paracrine, la prolifération et la différenciation de l'épithélium mammaire. A la fin de la gestation, la glande mammaire est entièrement différenciée et les alvéoles, occupant alors tout l'espace du coussin adipeux, deviennent fonctionnelles. Jusqu'à l'accouchement, l'action de l'hormone placentaire lactogène et des stéroïdes d'origine placentaire (en particulier la progestérone) inhibe les effets de la prolactine, empêchant ainsi le processus de lactation. Lors de la naissance du nouveau né, le placenta est éliminé et la diminution de la progestérone circulante associée à l'augmentation du niveau de la prolactine, déclenche la production du lait (Suzuki *et al.*, 2000). A la fin de la lactation, après une période de 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 retrouve une morphologie post-pubertaire et retourne à un état quiescent, jusqu'à l'avènement d'une nouvelle gestation (Macias & Hinck, 2012 ; Hassiotou & Geddes, 2013) (Figure 4).

Lorsque survient la ménopause, l'ensemble du tissu glandulaire s'atrophie, se traduisant par la disparition définitive des *acini* qui laisse place au tissu fibro-adipeux.

## INTRODUCTION



**Figure 4 : Développement de la glande mammaire**

*De la naissance à la puberté, la glande mammaire est très rudimentaire et ne comprend que quelques canaux épithéliaux connectés au mamelon, avec à leurs extrémités distales, des bourgeons terminaux. A la puberté, le réseau canalaire mammaire subit l'influence de diverses hormones et facteurs de croissance, et se développe à travers tout le coussin adipeux pour former une glande mammaire mature. Pendant la gestation et la lactation, les stéroïdes sexuels et les hormones lactogènes induisent la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales des alvéoles en cellules productrices de lait. En fin de lactation, le sevrage provoque la disparition de ces cellules par apoptose et l'involution de la glande. La glande mammaire retrouve alors un état quiescent jusqu'à l'avènement d'une nouvelle gestation. Schémas et photographies de glandes mammaires murines colorés au rouge carmin, à différentes étapes du développement post-natal (Adapté de (Andrechek et al., 2008)).*

## INTRODUCTION

### B) Le cancer du sein

#### 1. Epidémiologie

Le cancer du sein est avec plus de 1,67 million nouveaux cas (soit 11,9% de tous les cancers) et 522 000 décès (6,4%) estimés en 2012, le deuxième cancer le plus fréquent et la cinquième cause de décès par cancer dans le monde (World cancer report, Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2014). L'incidence et la mortalité liées au cancer du sein ont énormément évolué au cours de ces dernières années puisqu'une hausse respective de 20% et 14% a été observée depuis le précédent rapport du CIRC datant de 2008 (World cancer report, OMS, 2008).

A l'échelle nationale, l'incidence du cancer du sein a également considérablement progressé entre 1980 et 2005, passant de 21 387 à 49 087 nouveaux cas (Tableau 1). Toutefois cette tendance s'inverse depuis 2005, et on assiste pour la première fois à une baisse significative des taux d'incidence standardisés sur la population mondiale (diminution moyenne de 1,5% par an entre 2005 et 2012). Le recul de l'incidence du cancer du sein en pleine période de déploiement de son programme de dépistage (augmentation de 335% des dépistages par mammographie entre 2000 et 2006) coïnciderait avec la réduction rapide et massive de la prescription des traitements hormonaux de la ménopause (diminution de 62% entre 2000 et 2006) (Allemand *et al.*, 2008 ; Daubisse-Marliac *et al.*, 2011). La mortalité liée au cancer du sein, pour sa part, diminue significativement depuis 2005. En effet, une diminution moyenne de la mortalité de 1,5% par an a été observée entre 2005 et 2012 (Figure 5). Le diagnostic à un stade de plus en plus précoce des cancers du sein grâce au dépistage et l'amélioration de la prise en charge thérapeutique ont largement contribué à la baisse significative de ces taux de mortalité (Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012, Réseau Francim, Service de biostatistique des Hospices civils de Lyon (HCL), Institut de veille sanitaire (InVS) et Institut national du cancer (INCa), 2013).

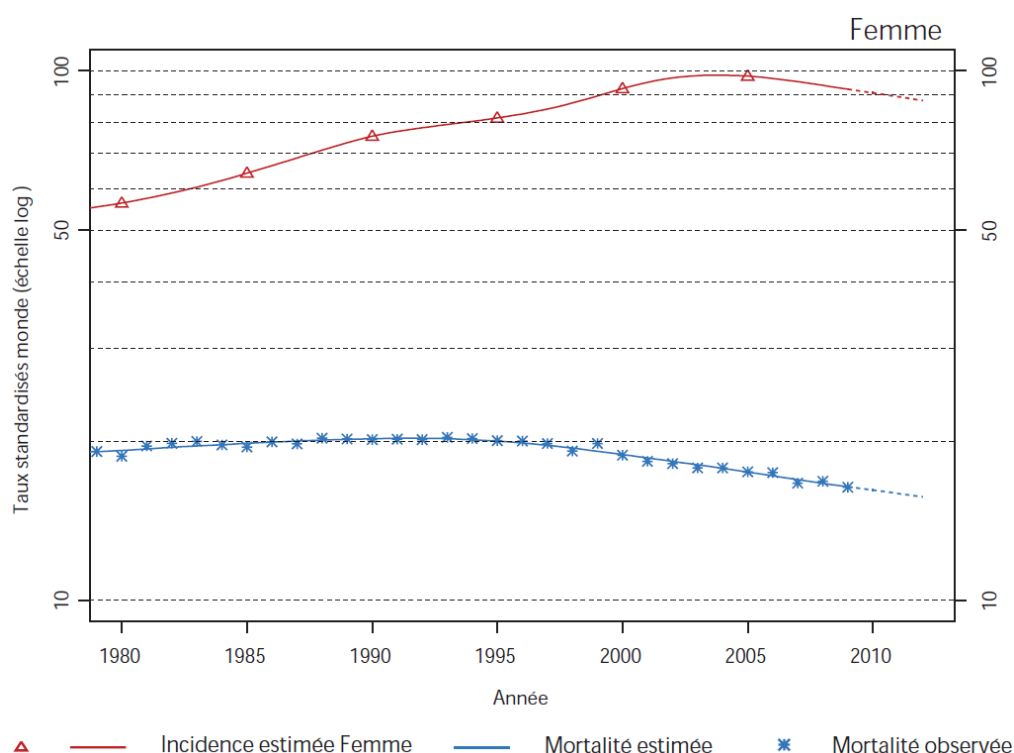


## INTRODUCTION

**Tableau 1 : Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer du sein en France, en nombre de cas par année** (Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012, Réseau Francim, HCL, InVS, INCa, 2013).

	1980	1990	2000	2005	2010	2012
<b>Incidence</b>	21 387	30 822	42 696	49 087	48 980	48 763
<b>Mortalité</b>	8 596	10 171	11 000	11 306	11 704	11 886

Les cancers du sein sont considérés comme des cancers de bon pronostic. Aujourd'hui, le taux global de survie relative à 5 ans après le diagnostic est estimé à 89%. Il chute néanmoins avec l'âge et la sévérité du stade au moment du diagnostic : 98,3% de survie relative à 5 ans pour le stade local, 83,5% pour le stade régional (envahissement ganglionnaire) et 23,3% pour le stade métastatique (INCa).



**Figure 5 : Tendance chronologique des taux d'incidence et de mortalité liés au cancer du sein en France (taux standardisés sur la population mondiale pour 100 000 personnes-années)** (Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012, Réseau Francim, HCL, InVS, INCa, 2013).

## 2. Etiologie et facteurs de risque

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle (CIRC, 2008) (Lacey *et al.*, 2009). Statistiquement, une femme sur huit sera concernée par le cancer du sein au cours de sa vie

## INTRODUCTION

(Benson & Jatoi, 2012). Le cancer du sein peut aussi survenir chez l'homme mais il est beaucoup plus rare et représente moins de 1% des cas à travers le monde (Reis *et al.*, 2011). Le risque de développer un cancer du sein augmente aussi considérablement avec l'âge. Alors qu'il est peu élevé chez les femmes âgées de moins de 35 ans (10%), près de 80% des femmes atteintes d'un cancer du sein ont plus de 50 ans.

Outre le sexe et l'âge, il existe d'autres facteurs de risque intrinsèques, notamment : les antécédents personnels et familiaux de cancer du sein, les prédispositions génétiques au cancer du sein (en particulier les mutations des gènes *BRCA1/2*, *BReast CAncer 1/2*), les facteurs génésiques associés à une exposition prolongée à des œstrogènes endogènes (puberté précoce, ménopause tardive, absence de grossesse, grossesse tardive, absence d'allaitement, etc), la densité des seins (tissus glandulaire et conjonctif > tissu fibreux) et les affections bénignes mammaires (lésions prolifératives avec ou sans atypie).

De nombreux facteurs de risque modifiables liés à l'environnement et aux modes et conditions de vie ont également été identifiés. Ainsi, les facteurs hormonaux exogènes (contraceptifs oraux, traitement hormonal substitutif), les radiations ionisantes, la consommation d'alcool, le surpoids (Indice de Masse Corporelle (IMC)  $\geq 25$ ), l'obésité (IMC  $\geq 30$ ) et l'absence d'exercice physique contribuent à l'augmentation du risque de développer un cancer du sein (Nkondjock & Ghadirian, 2005) (Tableau 2).

## INTRODUCTION

**Tableau 2 : Principaux facteurs étiologiques de cancer du sein** (*Adapté de Nkondjock & Ghadirian, 2005*).

Augmentation du risque	Diminution du risque	Principaux mécanismes biologiques en cause
Âge avancé		Exposition prolongée aux œstrogènes
Âge précoce des premières règles (< 12 ans)		Exposition précoce et prolongée au milieu hormonal
Ménopause tardive (> 55 ans)		Production prolongée des hormones ovariennes
	Allaitement (pendant au moins 25 mois)	Accélération de la différenciation des tissus mammaires (protection face aux agents carcinogènes) ; Report du rétablissement de l'ovulation ; Réduction de la production d'œstrogènes
	Grossesse précoce & Multiparité	Accélération de la différenciation des tissus mammaires ; Prolifération rapide de l'épithélium
Grande taille à l'âge adulte		Nutrition durant l'enfance et l'adolescence
Densité mammographique (> 50%)		Augmentation d'IGF avant la ménopause ; Augmentation de la prolactine après la ménopause
Mutations génétiques (BRCA1/2)		Augmentation de l'instabilité génomique
Histoire familiale de cancer du sein		Patrimoine génétique commun ; Même environnement et style de vie
Radiations ionisantes (avant 40 ans)		Dommmages de l'ADN et de ses constituants
Alcool (une boisson alcoolique/jour)		Augmentation des hormones sériques ; Augmentation de la production d'IGF
Contraceptifs oraux		Augmentation de l'exposition aux œstrogènes ; Suppression de la production d'œstradiol et de progestérone
Traitement hormonal substitutif		Report des effets de la ménopause
	Activité physique modérée	Réduction de la production d'œstrogènes ; Maintien de l'équilibre énergétique
Obésité (après la ménopause) et prise de poids (à partir de 18 ans)		Augmentation de la concentration d'œstradiol libre sérique

## INTRODUCTION

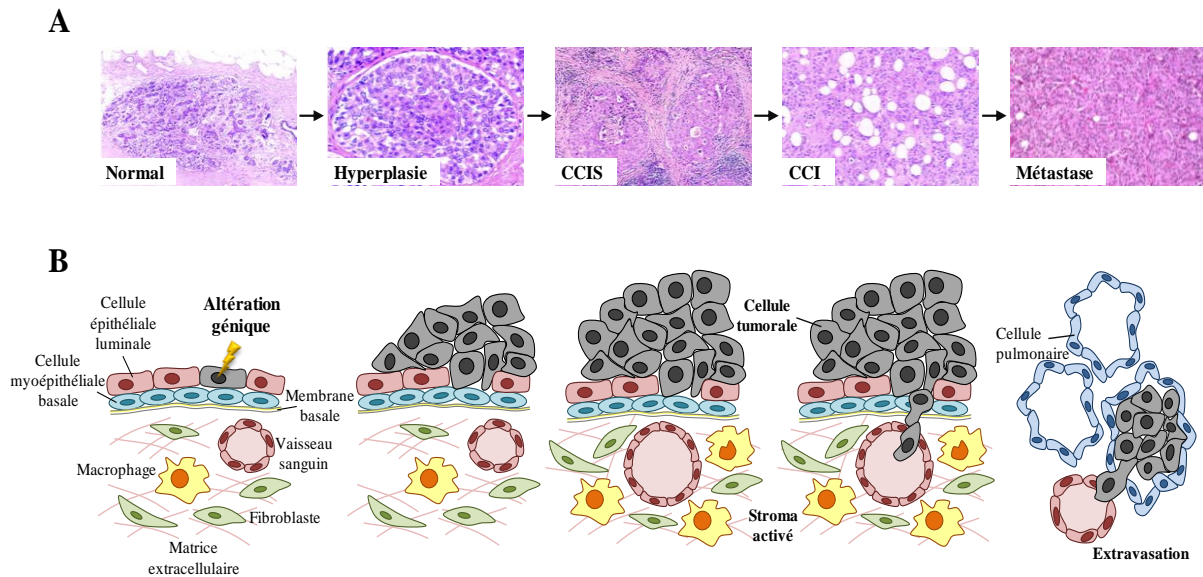
### **3. Mécanismes de la tumorigenèse mammaire**

Bien que les causes et les mécanismes biologiques à l'origine de la cancérisation mammaire soient multiples, il est possible d'établir un profil d'évolution commun. En effet, la cancérogenèse mammaire est un processus multi-étapes qui, sous l'accumulation d'altérations génétiques, conduit progressivement à la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse, puis à son expansion clonale au niveau local (hyperplasie et cancer *in situ*), régional (cancer invasif) et général (métastase).

#### ***a) Stades de développement***

Le développement progressif du cancer du sein résulte d'une succession de plusieurs stades anatomo-pathologiques. L'apparition d'hyperplasie(s) épithéliale(s) du sein constitue l'étape préliminaire de la tumorigenèse mammaire. Cette excroissance tissulaire de sein est formée à partir de la prolifération anarchique de cellules épithéliales normales ayant subi une altération de leur génome. L'hyperplasie peut ensuite évoluer jusqu'à atteindre le stade de l'hyperplasie atypique (ou dysplasie, notée comme lésion précancéreuse), durant lequel les cellules prolifératives commencent à acquérir des modifications architecturales et fonctionnelles, accompagnées d'un processus de dédifférenciation cellulaire. L'accumulation de modifications génétiques, notamment marquée par des atypies cyto-nucléaires, aboutit alors à la formation d'un carcinome *in situ*, c'est-à-dire le développement d'une masse de cellules épithéliales prolifératives, cantonné au niveau local, sans destruction de la membrane basale. La croissance progressive de ces carcinomes peut entraîner leur expansion au-delà de la membrane basale. Lors de ce stade, les cellules cancéreuses acquièrent des propriétés nécessaires à la traversée de la membrane basale et l'envahissement du tissu conjonctif environnant (perte de l'adhérence et de l'inhibition de contact, sécrétion de protéases, augmentation de l'angiogenèse), et le carcinome *in situ* évolue ainsi vers un carcinome infiltrant. Les cellules tumorales peuvent ensuite essaimer à partir de la tumeur primaire pour atteindre les ganglions lymphatiques et coloniser d'autres organes à distance *via* le système circulatoire, où elles forment des tumeurs secondaires appelées métastases (Figure 6) (Arpino *et al.*, 2005 ; Vargo-Gogola & Rosen, 2007).

## INTRODUCTION



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

*Suite à une altération de leur génome, les cellules épithéliales normales vont proliférer de façon anarchique jusqu'à atteindre l'hyperplasie atypique. Les cellules se différencient, acquièrent des modifications structurales et prolifèrent au niveau local pour former un carcinome in situ, bien circonscrit par la lame basale. Les cellules vont ensuite, par l'acquisition de modifications phénotypiques, franchir la membrane basale pour infiltrer le tissu conjonctif adjacent, et ainsi conduire à l'apparition d'un cancer invasif. La tumeur devenue invasive continue de se développer et colonise différents organes pour former des métastases distantes, retrouvées principalement dans les poumons, le foie, les os, et/ou le cerveau. Les différentes étapes de la tumorigenèse mammaire sont illustrées : **A**) par des coupes histologiques d'un tissu mammaire normal, d'une hyperplasie, d'un carcinome canalaire in situ (CCIS), d'un carcinome invasif (CCI) et d'une métastase de sein (Adapté de Arpino et al., 2005). **B**) par des représentations schématiques de l'épithélium mammaire et du tissu palléal environnant (Adapté de Vargo-Gogola & Rosen, 2007).*

### ***b) Altérations génétiques***

Selon Hanahan et Weinberg, l'acquisition de six caractéristiques de la physiologie cellulaire, distinctes et complémentaires, est essentielle pour permettre aux cellules transformées de prendre l'ascendant sur les cellules saines, et d'induire ainsi un phénotype pro-tumoral : l'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, la résistance à l'apoptose, le potentiel répliatif illimité (échappement à la sénescence), la capacité à envahir les tissus et à métastaser et la néo-angiogenèse (Hanahan & Weinberg, 2000 ; Hahn & Weinberg, 2002). Plus récemment, deux autres caractéristiques émergentes pouvant intervenir dans le développement tumoral ont également été proposées : la reprogrammation du métabolisme énergétique pour supporter la croissance accrue des cellules cancéreuses et l'échappement à la destruction par le système immunitaire (Hanahan

## INTRODUCTION

& Weinberg, 2011). Les modifications physiologiques nécessaires à l'acquisition de ce phénotype pro-tumoral sont directement associées à l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs qui sont les résultantes d'altérations génétiques et épigénétiques sporadiques ou, plus rarement, héréditaires (5-10% des cancers du sein) (Lerebours & Lidereau, 2002 ; Mavaddat *et al.*, 2010 ; Apostolou & Fostira, 2013 ; Mahdi *et al.*, 2013).

### ✓ Les oncogènes :

Les oncogènes sont par définition des gènes dont l'activation favorise le développement du cancer. Dans le cancer du sein, cette activation se fait principalement par amplification génique (surproduction de la protéine), mais peut également faire intervenir d'autres mécanismes, plus rares, tels que la mutation ponctuelle (activation constitutive de l'oncoprotéine) ou la translocation chromosomique (oncoprotéine chimérique avec une activité accrue) (Osborne *et al.*, 2004). Ces oncogènes codent des protéines impliquées dans la transduction des signaux de prolifération (HER2, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*, FGF, PDGF, *Platelet-Derived Growth Factor*, Ras, MEK, *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*, PI3K, *Phosphoinositide 3-Kinase*, Myc, Jun, etc), le contrôle du cycle cellulaire (cycline D1, Cdk4, *Cyclin-dependent kinase 4*, Cdc25, *Cell division cycle 25*), la régulation négative de l'apoptose (Bcl-2, *B-cell lymphoma-2*, Bcl-XL, *B-cell lymphoma-extra large*, survivine), l'angiogenèse (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) ou encore dans la dissémination métastatique (métalloprotéases, protéines d'adhésion cellulaire). Dans le cancer du sein, les oncogènes *ERBB2*, *PIK3CA*, *CCND1* et *MYC* figurent parmi les plus fréquemment dérégulés (Lee & Muller, 2010).

- ✓ ***ERBB2***, localisé sur le chromosome 17q21-22, est amplifié dans environ 15 à 20% des cancers du sein mais peut être également, de façon beaucoup plus rare, la cible de mutations somatiques (1,67%) (Wolff *et al.*, 2007 ; Bose *et al.*, 2013). La protéine HER2 (ErbB2), codée par *ERBB2*, est un membre d'une famille de quatre récepteurs à activité tyrosine kinase comprenant HER1 (EGFR ou ErbB1), HER3 (ErbB3) et HER4 (ErbB4). Bien qu'il soit récepteur orphelin, HER2 possède la plus forte activité kinasique de la famille HER, et a tendance à s'hétérodimériser avec HER1, HER3 ou HER4 pour induire sa signalisation (Graus-Porta *et al.*, 1997). Dans le cancer du sein, la surexpression de HER2, parfaitement corrélée à l'amplification du gène *ERBB2*,

## INTRODUCTION

conduit à son homodimérisation (HER2-HER2) et/ou son hétérodimérisation (par exemple HER2-HER3), déclenchant alors une cascade de signalisation pro-tumorigène (Yarden, 2001 ; Holbro *et al.*, 2003). Ainsi, lorsqu'il est surexprimé, HER2 intervient dans l'activation des voies de signalisation des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) ou PI3K/Akt qui sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération, la survie, la migration, l'angiogenèse, ou encore la formation de métastases (Moasser, 2007). Les tumeurs dites « HER2-positif » (ou HER2+) définissent aujourd'hui un sous-type moléculaire de cancer du sein et sont associées à un phénotype invasif et un mauvais pronostic (Slamon *et al.*, 1987 ; Sotiriou & Pusztai, 2009). Elles sont également résistantes à l'hormonothérapie du fait de leur faible réceptivité hormonale et ne répondent pas à certaines chimiothérapies (Ross & Fletcher, 1998). La caractérisation de l'impact de l'amplification du gène *ERBB2* sur le comportement des cancers du sein a ainsi conduit au développement de thérapies ciblées pour le traitement des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+. En outre, les cancers du sein sont désormais systématiquement testés pour le gène *ERBB2* et la protéine HER2 afin d'identifier les patientes qui bénéficieront de ces traitements ciblés. A l'heure actuelle, quatre thérapies ciblées HER2 ont été approuvées pour le cancer du sein HER2+ : deux anticorps monoclonaux anti-HER2 et anti-HER2/HER3, respectivement le trastuzumab (Herceptine<sup>®</sup>) et le pertuzumab (Perjeta<sup>®</sup>) ; un anticorps monoclonal (trastuzumab) conjugué à un agent cytotoxique anti-microtubule (emtansine ou DM1), le T-DM1 (Kadcyla<sup>®</sup>) ; et une petite molécule inhibitrice ciblant les activités tyrosine kinase de HER2 et de l'EGFR, le lapatinib (Tyverb<sup>®</sup>). Une nouvelle génération d'agents thérapeutiques, notamment des vaccins anti-HER2, est également entrée en phase d'évaluation clinique (Dean-Colomb & Esteva, 2008 ; Ladjemi *et al.*, 2010 ; Incorvati *et al.*, 2013 ; Figueroa-Magalhaes *et al.*, 2014 ; Yan *et al.*, 2014).

- ✓ **PIK3CA** est localisé sur le chromosome 3q26.32 et code la sous-unité catalytique p110 $\alpha$  de la protéine hétérodimérique PI3K. Dans le cancer du sein, la signalisation de PI3K est activée principalement par des récepteurs tyrosine kinase, tels que HER2, et intervient dans la prolifération, la survie, la croissance, la migration, ou encore la formation de métastases (Dillon *et al.*, 2007 ; Castaneda *et al.*, 2010). *PIK3CA* est muté dans environ 18-40% des cancers du sein et certaines de ces mutations activatrices ont pour conséquence une suractivation des voies de signalisation de

## INTRODUCTION

PI3K, directement corrélée à un fort potentiel oncogénique et à un mauvais pronostic (Bachman *et al.*, 2004 ; Campbell *et al.*, 2004 ; Samuels *et al.*, 2004 ; Kang *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2005 ; Lai *et al.*, 2008 ; Aleskandarany *et al.*, 2010). Récemment, il a été découvert qu'environ 40% des tumeurs mammaires HER2+ présentent des mutations activatrices de l'oncogène *PIK3CA* et sont, pour la plupart, résistantes au trastuzumab utilisé seul ou en combinaison avec le lapatinib ou le pertuzumab (Berns *et al.*, 2007 ; Kataoka *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2011 ; Hanker *et al.*, 2013). Certaines approches thérapeutiques alternatives, actuellement en essais cliniques, visent donc à cibler PI3K et ses principaux composants de signalisation (Akt, mTOR, *mammalian Target Of Rapamycin*), afin de rétablir la sensibilité aux thérapies ciblées anti-HER2 (Engelman, 2009 ; Baselga, 2011 ; Garrett & Arteaga, 2011).

- ✓ ***CCND1***, localisé sur le chromosome 11q13, code la cycline D1, régulateur clé de la progression dans le cycle cellulaire mais également facteur de transcription. La surexpression de cette protéine est retrouvée dans environ 50% des carcinomes mammaires alors que l'amplification de son gène n'est présente que dans 15% des cas (Arnold & Papanikolaou, 2005). Cette disparité peut s'expliquer par le fait que d'autres facteurs tels que les œstrogènes ou p53 (*via* p21<sup>WAF1</sup>) interviennent dans la surexpression de la cycline D1 (Chen *et al.*, 1995 ; Roy & Thompson, 2006). De plus, il a été montré que cette surexpression est corrélée à une résistance aux traitements par le tamoxifène dans les cancers hormono-dépendants (Stendahl *et al.*, 2004).
- ✓ ***MYC***, localisé sur le chromosome 8q24, code la protéine nucléaire Myc qui est un des facteurs de transcription les plus influents, régulant jusqu'à 15% des gènes humains, impliqués dans la prolifération, la croissance, la différenciation, le métabolisme et l'apoptose (Chen & Olopade, 2008). *MYC* est amplifié dans environ 15% des tumeurs mammaires alors que la surexpression de son produit protéique a été rapportée dans environ 40% des cas. Cette inégalité indique que d'autres mécanismes que l'amplification génique, tels que la régulation de la transcription de l'ARNm et la stabilisation de la protéine, sont impliqués dans la surexpression de Myc. Par ailleurs, plusieurs études montrent une corrélation avec des tumeurs de haut grade et un mauvais pronostic (Xu *et al.*, 2010).

Bien que rare (moins de 0,15% des tumeurs mammaires), le réarrangement ***ETV6-NTRK3*** est retrouvé dans plus de 90% des carcinomes sécrétoires du sein (Tognon *et al.*, 2002). La



## INTRODUCTION

translocation t(12;15)(p13q25), à l'origine de ce gène de fusion *ETV6-NTRK3*, crée une protéine chimérique comprenant la partie N-terminale du variant 6 de la famille des facteurs de transcription Ets (*E-twenty six*) et le domaine kinase du récepteur TrkC (*Tropomyosin receptor kinase C*). Les tumeurs exprimant l'oncogène *ETV6-NTRK3* sont de type Basal-like bien que les cancers mammaires sécrétoires soient associés à un bon pronostic (Lae *et al.*, 2009). Par ailleurs, une étude plus récente a montré que la transformation cellulaire induite par cette translocation peut être inhibée en ciblant le récepteur à l'IGF-1 (Tognon *et al.*, 2011).

### ✓ Les gènes suppresseurs de tumeurs :

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes dont la perte de fonction participe à l'oncogenèse. Depuis 1997, il a été proposé de subdiviser ces gènes en trois catégories : les « gatekeepers », impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire (*RBI*, *Retinoblastoma 1*, inhibiteur du cycle cellulaire ou *PTEN*, *Phosphatase and TENsin homolog*, inhibiteur de la PI3K, etc), les « caretakers », garants de la stabilité du génome (*BRCA1*, *TP53*, etc) et les « landscapers », modulateurs du microenvironnement cellulaire (*CDH1*, *CTNNA1*, etc) (Kinzler & Vogelstein, 1997 ; Oesterreich & Fuqua, 1999). Bien que les anomalies héréditaires ne représentent qu'une minorité de cas de cancer du sein, les mutations germinales surviennent quasi exclusivement dans les gènes suppresseurs de tumeurs. Ces mêmes gènes, qui sont tous impliqués dans la régulation de l'intégrité du génome, peuvent également acquérir des mutations somatiques sporadiques (Osborne *et al.*, 2004 ; Walsh & King, 2007). En revanche, de nombreux gènes inactivés par des mutations acquises n'interviennent pas dans les cancers héréditaires (Lerebours & Lidereau, 2002). Selon le modèle de Knudson, la perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeurs nécessite le plus souvent une altération concomitante de ses deux allèles (Knudson, 1971). Dans la majorité des cas, cette inactivation requiert une perte d'hétérozygotie et une mutation ponctuelle sur l'allèle restant. Dans les cancers héréditaires, l'allèle muté provient de cellules germinales et le second est altéré de façon sporadique dans l'ADN tumoral (Knudson, 2001).

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

- ✓ ***RBI***, localisé sur le locus 13q14.1, est le premier gène suppresseur de tumeurs à avoir été découvert. La protéine pRb joue un rôle majeur dans la progression du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S, notamment par la régulation négative du facteur de transcription E2F et des Cdk (Di Fiore *et al.*, 2013). La perte de fonction de

## INTRODUCTION

pRb compromet les points de contrôle (« checkpoint ») du cycle cellulaire, et contribue à la prolifération d'une tumeur agressive. Dans le cancer du sein, on observe une expression aberrante de pRb dans 25 à 30% des cas, et une perte d'hétérozygotie ou d'autres altérations du gène *RBI* dans 7 à 37% des tumeurs primaires (Bosco & Knudsen, 2007).

- ✓ ***TP53***, localisé sur le chromosome 17p13.1, code un facteur de transcription impliqué notamment dans l'arrêt temporaire du cycle cellulaire durant lequel a lieu la réparation des éventuels dommages à l'ADN. Lorsque les lésions deviennent trop importantes, p53 peut orienter la cellule vers l'apoptose, éliminant ainsi les cellules potentiellement malignes de l'organisme (Lacroix *et al.*, 2006). En règle générale, sa perte de fonction suit le modèle de Knudson (délétion d'un allèle et mutation du second). Des mutations du gène *TP53* sont retrouvées dans près de 25% des cancers du sein et sont associées à un mauvais pronostic (base de données des mutations de *TP53*, CIRC, 2013).
- ✓ ***BRCA1* et *BRCA2***, localisés respectivement en 17q22 et 13q12-13, sont des gènes suppresseurs de tumeurs dont les mutations prédisposent aux cancers du sein. Ces gènes codent des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN mais aussi dans le contrôle du cycle cellulaire et la régulation transcriptionnelle, *via* leur interaction avec Rad51, p53 ou encore l'ARN polymérase II (Venkitaraman, 2002 ; Foulkes & Shuen, 2013). Une femme porteuse de *BRCA1* muté présente un risque de développer un cancer du sein au cours de sa vie estimé à 70-80% contre 50-60% pour *BRCA2* muté (Roy *et al.*, 2012). Les cancers du sein liés à une mutation de *BRCA1* sont de haut grade et de mauvais pronostic (Thompson & Easton, 2004). Il semblerait par ailleurs que *BRCA2* soit plus particulièrement impliqué dans les cancers du sein chez l'homme puisqu'il est muté dans plus de 10% des cas (Thompson & Easton, 2001).
- ✓ ***CDH1***, localisé sur le chromosome 16q22.1, code pour l'E-cadhérine, une protéine d'adhésion cellulaire dépendante du calcium. La perte d'hétérozygotie sur le chromosome 16q est observée dans 55% des cancers du sein sporadiques (Lakhani *et al.*, 1995). De plus, l'expression de la E-cadhérine est diminuée dans les carcinomes mammaires canaux et encore plus (> 90%) dans les cancers lobulaires (Cleton-Jansen, 2002 ; de Deus Moura *et al.*, 2013). Cette perte de fonction peut être due à des délétions homozygotes de *CDH1*, une perte d'hétérozygotie associée à des mutations de *CDH1*, une hyperméthylation de son promoteur ou encore une répression

## INTRODUCTION

transcriptionnelle (Cleton-Jansen *et al.*, 1994 ; Graff *et al.*, 1995 ; Droufakou *et al.*, 2001). Les patientes dont les tumeurs ont une expression réduite de E-cadhérine présentent un taux de survie sans maladie et une survie globale défavorables (Heimann *et al.*, 2000). La perte de fonction de E-cadhérine est également associée à une augmentation de la taille de la tumeur, un haut grade histologique et un développement de métastases à distance (Rakha *et al.*, 2005 ; Gall & Frampton, 2013).

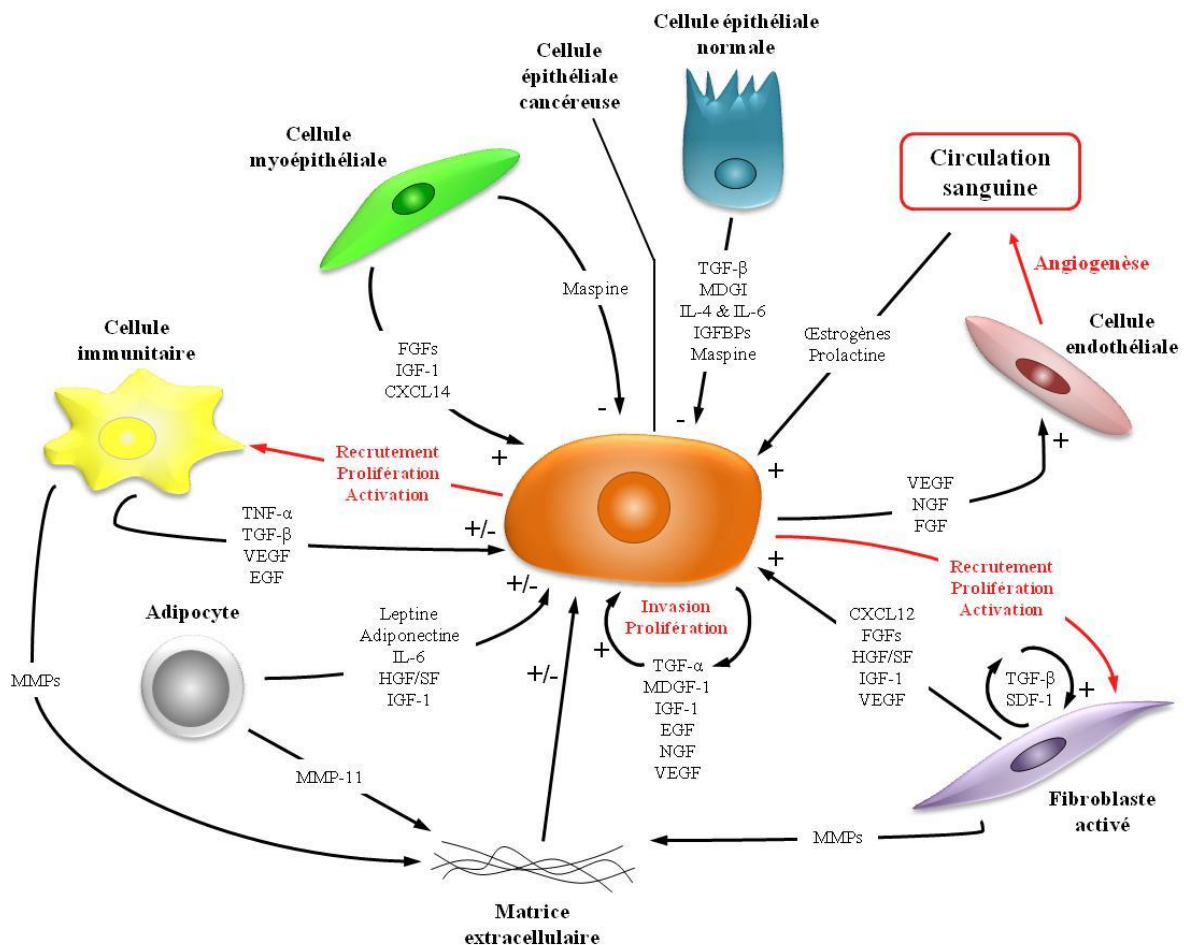
### *c) Influence du microenvironnement tumoral*

Comme nous l'avons vu précédemment, le développement du cancer du sein résulte d'une succession d'altérations génétiques et épigénétiques intrinsèques qui conduit à la transformation progressive des cellules normales en cellules tumorales. Toutefois, les modifications génétiques et épigénétiques affectant les cellules épithéliales ne suffisent pas à expliquer l'ensemble du processus de cancérogenèse mammaire. En effet, il est désormais reconnu que le développement et la progression d'une tumeur vers le phénotype malin sont hautement tributaires de l'interaction entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement de la tumeur. Ainsi, il a été montré que 7 des 8 caractéristiques décrites par Hanahan et Weinberg, considérées comme essentielles au développement cancéreux, sont influencées par les cellules stromales du microenvironnement tumoral (Hanahan & Coussens, 2012).

Les cellules épithéliales mammaires font partie d'un microenvironnement complexe qui comprend la matrice extracellulaire et une grande variété de cellules non épithéliales comme les fibroblastes, les lymphocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et les adipocytes. Dans la physiologie normale de la glande mammaire, ces différents types cellulaires s'organisent pour autoréguler l'homéostasie tissulaire. Lors de la tumorigenèse, les cellules épithéliales cancéreuses modifient cet équilibre de manière à favoriser la progression tumorale. Ainsi, par l'intermédiaire de facteurs diffusibles tels que les facteurs de croissance et les cytokines, ces cellules peuvent altérer la matrice extracellulaire, accélérer la croissance des fibroblastes, induire l'angiogenèse, ou encore accroître le recrutement des cellules inflammatoires. En retour, les différents composants du microenvironnement tumoral peuvent avoir des effets de stimulation ou d'inhibition sur la tumorigenèse, notamment par la régulation de l'expression d'une multitude de gènes dans les cellules épithéliales cancéreuses et les cellules stromales (Artacho-Cordon *et al.*, 2012).

## INTRODUCTION

L'implantation de la tumeur au niveau du sein nécessite donc un dialogue croisé entre les différents types cellulaires (Mueller & Fusenig, 2004 ; Hu & Polyak, 2008 ; Polyak & Kalluri, 2010 ; Mao *et al.*, 2013) (Figure 7).



**Figure 7 : Interactions entre les cellules épithéliales cancéreuses de sein et les cellules stromales du microenvironnement tumoral.**

Lors de la progression du cancer du sein, les cellules tumorales mammaires établissent un dialogue croisé avec les autres types cellulaires de la glande mammaire par l'intermédiaire de facteurs solubles autocrines et paracrines, tels que les facteurs de croissance et les cytokines. Les effets stimulateurs sont représentés par un « + », les effets inhibiteurs par un « - ».

Les fibroblastes, présents en très grand nombre dans le tissu palléal, constituent une véritable charpente à l'épithélium mammaire en sécrétant les composants de la matrice extracellulaire. Il a été montré qu'une fraction des fibroblastes péri-tumoraux pouvait être « activée » et convertie en fibroblastes associés au cancer (CAFs ou *Cancer-associated fibroblasts*), via différents mécanismes, afin de promouvoir la tumorigenèse mammaire (Orimo & Weinberg, 2006). En effet, au cours de la progression tumorale, un grand nombre de fibroblastes acquiert deux boucles de signalisation autocrine, impliquant le TGF- $\beta$  et le SDF-1/CXCL12 (*Stromal*

## INTRODUCTION

*cell-Derived Factor-1/Chemokine CXC motif Ligand 12*), qui assurent leur transdifférenciation en CAFs (Kojima *et al.*, 2010). Ces CAFs présentent des caractéristiques très proches des myofibroblastes, notamment la production accrue de  $\alpha$ -SMA ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*), et on associe souvent les CAFs à des myofibroblastes « activés ». Par ailleurs, un autre mécanisme important dans l'activation des CAFs est l'inactivation de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs qui sont impliqués dans la répression des effets pro-carcinogènes des fibroblastes. Ainsi, des études récentes ont montré que la dérégulation de PTEN ou de p16<sup>INK4A</sup> dans les fibroblastes du stroma mammaire contribue à leur activation et favorise la croissance, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de sein (Trimboli *et al.*, 2009 ; Al-Ansari *et al.*, 2013).

Une fois activés par les signaux des cellules cancéreuses, les CAFs vont sécréter à leur tour, de nombreux facteurs tels que des composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagènes de type I, III et V, protéoglycanes héparanes sulfatés, etc), des cytokines (SDF-1/CXCL12, CXCL14, IL-6, *Interleukine-6* etc), des facteurs de croissance (FGFs, IGF-1, VEGF, HGF/SF, *Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor*, etc) et des protéases (MMP-2, 3, 9, 13 et 14, *matrix metalloproteinases*, cathepsines D et K, uPA, *urokinase-type Plasminogen Activator*, etc), qui favorisent le développement du cancer (Elenbaas & Weinberg, 2001 ; Kalluri & Zeisberg, 2006). Ces molécules vont participer à la progression tumorale en promouvant la prolifération, l'angiogenèse, la survie, le remodelage de la matrice extracellulaire, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et l'invasion (Bhowmick *et al.*, 2004 ; Cirri & Chiarugi, 2012). Ainsi, SDF-1/CXCL12 favorise la prolifération des cellules tumorales exprimant le récepteur CXCR4 (*CXC chemokine Receptor 4*) et contribue à l'angiogenèse *via* le recrutement de progéniteurs endothéliaux (Orimo *et al.*, 2005). Le FGF-2 intervient, quant à lui, dans une voie de survie en induisant un effet anti-apoptotique sur les cellules cancéreuses mammaires *via* l'activation de PI3K/Akt et de NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor-kappa B*) (Vandermoere *et al.*, 2005). Enfin, les protéases MMP-3 (stromélysine-1) et cathepsine K conduisent à l'invasion tumorale en remaniant la matrice extracellulaire et en activant la TEM (Lochter *et al.*, 1997 ; Kleer *et al.*, 2008).

Les cellules immunitaires, et plus particulièrement les macrophages associés aux tumeurs (TAMs, *Tumor-associated macrophages*), vont également être mobilisés par les cellules cancéreuses mammaires afin de promouvoir la croissance, l'angiogenèse, les capacités migratoires et invasives, la dissémination de métastases et l'immunosuppression (Lewis & Pollard, 2006). Les cellules tumorales libèrent ainsi différents chimioattractants tels que le

## INTRODUCTION

CSF-1 (*Colony-Stimulating Factor-1*), ou les CCL2 (*Chemokine C-C motif Ligand 2*) et CCL5, qui assurent le recrutement et l'activation des TAMs, (Soria & Ben-Baruch, 2008 ; Laoui *et al.*, 2011 ; Obeid *et al.*, 2013). Une des réponses majeures des TAMs à ces différents signaux chimiotactiques est la sécrétion de l'EGF qui va stimuler de façon paracrine la migration/invasion des cellules cancéreuses de sein (Wyckoff *et al.*, 2004 ; Goswami *et al.*, 2005). Les cellules cancéreuses peuvent également contribuer au développement de la tumeur en libérant le VEGF, un des principaux facteurs pro-angiogéniques (Carmeliet, 2003). Dans le cancer du sein, le VEGF jouerait un double rôle dans la régulation de l'angiogenèse. En effet, il agirait non seulement directement sur la prolifération des cellules endothéliales et des précurseurs circulants mais pourrait aussi stimuler la migration des TAMs, et les attirer dans les zones avascularisées de la tumeur. Les TAMs, étant aussi capables de sécréter du VEGF, interviendraient alors de manière indirecte dans la stimulation mitogénique des cellules endothéliales (Leek *et al.*, 2000 ; Pollard, 2008). Par ailleurs, le VEGF est aussi produit de manière autocrine par les cellules tumorales afin d'augmenter leur survie et leur capacité à métastaser (Mercurio *et al.*, 2005).

En étant les cellules stromales les plus abondantes dans le microenvironnement tumoral du cancer du sein, les adipocytes constituent des composants clés de la carcinogenèse mammaire. En effet, ils favorisent notamment la croissance et la migration/invasion des cellules cancéreuses de sein en sécrétant des facteurs de croissance (HGF/SF, IGF-1, etc), des adipokines (leptine, adiponectine, IL-6 etc), ou encore des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène de type VI (Iyengar *et al.*, 2005 ; Vona-Davis & Rose, 2007 ; Walter *et al.*, 2009 ; Dirat *et al.*, 2011). L'ensemble de ces données explique également que l'obésité est un facteur de risque pour le cancer du sein post-ménopausique et qu'elle est corrélée, indépendamment du statut ménopausique, à un phénotype tumoral agressif et un mauvais pronostic (Rose & Vona-Davis, 2014).

Outre les coopérations intercellulaires stimulatrices du développement du cancer, différents mécanismes sont également mis en jeu pour contrecarrer la progression tumorale. Ainsi, notre laboratoire a montré que les cellules épithéliales normales de sein sont capables de sécréter l'IGFBP-3 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3*) et la maspine afin d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires (Toillon *et al.*, 2007). Ces cellules épithéliales mammaires synthétisent également d'autres facteurs inhibiteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$ 1, le MDGI (*Mammary-Derived Growth Inhibitor*), le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), des interleukines (IL-4, IL-6) ou des protéoglycanes de type héparane sulfaté (Bourhis *et*

## INTRODUCTION

*al.*, 2000). D'autres équipes ont mis en évidence que les cellules myoépithéliales interviennent aussi dans l'inhibition de la progression tumorale *via* la production de nombreux inhibiteurs de protéases (TIMP-1, *Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1*, maspaine, activine, etc) et des cytokératines 5 et 6 (Pandey *et al.*, 2010). Enfin, le système immunitaire joue un rôle essentiel notamment *via* l'activation de la réponse innée et la destruction des cellules tumorales par les NK (*Natural Killers*) (Waldhauer & Steinle, 2008 ; Jiang & Shapiro, 2014).

Parmi les différents facteurs systémiques et locaux du microenvironnement tumoral, les facteurs de croissance occupent une place importante dans la progression du cancer du sein. Dans ce contexte, notre laboratoire a permis de révéler et d'élucider l'implication d'une nouvelle famille de facteurs de croissance dans le cancer du sein, il s'agit des neurotrophines. En effet, les cellules cancéreuses mammaires sécrètent de façon autocrine le NGF (*Nerve Growth Factor*), le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) et la NT-4/5 (*Neurotrophin-4/5*) afin d'induire leur prolifération, leur survie, et leur migration/invasion (Descamps *et al.*, 2001b ; Dolle *et al.*, 2003 ; Vanhecke *et al.*, 2011 ; Demont *et al.*, 2012). De plus, les neurotrophines constituent des cibles thérapeutiques potentielles puisque la formation de tumeurs mammaires dans un modèle de xéno greffe est significativement réduite en présence d'anticorps bloquants anti-NGF, anti-BDNF ou anti-NT-4/5 (Adriaenssens *et al.*, 2008 ; 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 (Dolle *et al.*, 2005b ; Romon *et al.*, 2010). Récemment, une autre équipe a également montré que la NT-3 (*Neurotrophin-3*) favorise non seulement la croissance métastatique de cellules cancéreuses de sein mais également leur adaptation et prolifération dans le microenvironnement du tissu cérébral sain (Louie *et al.*, 2013).

Compte tenu de l'ensemble des observations rapportées sur le rôle du microenvironnement tumoral dans la cancérogenèse mammaire, les interactions entre les cellules cancéreuses de sein et le microenvironnement tumoral offrent de nouvelles opportunités thérapeutiques pour la thérapie ciblée (Mitra *et al.*, 2012). En particulier, les facteurs de croissance, leurs récepteurs et les voies de signalisation associées sont des cibles thérapeutiques privilégiées dans le cancer du sein (Alvarez *et al.*, 2010 ; Mohamed *et al.*, 2013).

## INTRODUCTION

### **4. L'hétérogénéité tumorale du cancer du sein**

Le cancer du sein est une maladie complexe et très hétérogène, comprenant des entités tumorales multiples, associées à des caractéristiques histologiques et biologiques bien distinctes, différents comportements cliniques et une grande variété de réponses aux thérapies. En outre, une composante extrinsèque s'ajoute à cette hétérogénéité intrinsèque en raison de l'implication du microenvironnement tumoral dans la carcinogenèse mammaire.

#### *a) Les différentes théories menant à l'hétérogénéité tumorale mammaire*

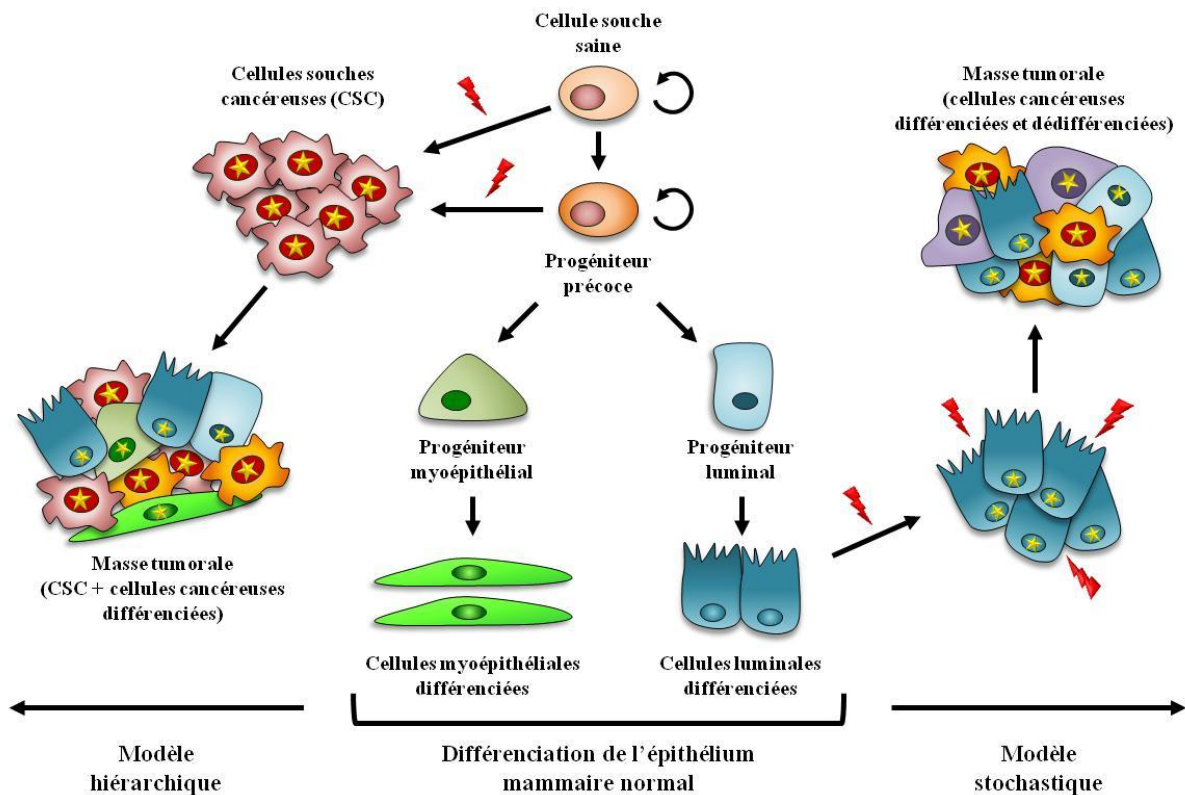
Deux théories ont été avancées pour expliquer l'hétérogénéité tumorale du cancer du sein : le **modèle stochastique** et le **modèle hiérarchique** (Figure 8) (Campbell & Polyak, 2007). Dans le **modèle stochastique**, également nommé *modèle d'évolution clonale*, toute cellule, quels que soient son type et son degré de différenciation, peut être la cible de mutations sporadiques multiples et aboutir à la formation de clones tumoraux indépendants. Ce cadre théorique repose ensuite sur les principes darwiniens : le clone ayant acquis un avantage prolifératif ou de survie suite à l'accumulation de mutations, devient le plus agressif et est ainsi sélectionné pour entrer en phase de dominance clonale et composer majoritairement la masse tumorale. Ainsi, dans le modèle d'évolution clonale, on ne relève pas ou peu de hiérarchie entre les différents clones mais il existe un lien phylogénétique entre chacun des clones puisque les cellules qui les composent partagent les mêmes mutations causales (Nowell, 1976 ; Merlo *et al.*, 2006).

Au cours de ces dernières années, de nombreuses données expérimentales ont démontré l'existence d'une sous-population particulière de cellules tumorales capables de générer une tumeur similaire à la tumeur d'origine lorsqu'elles sont transplantées dans un modèle animal. Ces cellules, de par leurs propriétés d'auto-renouvellement illimité et de multi-potentialité, ont été appelées *cellules souches cancéreuses* (CSC) ou *cellules initiatrices de cancer* (CIC) et joueraient un rôle central dans la propagation tumorale et la résistance thérapeutique. Leur découverte a appuyé un autre concept de l'hétérogénéité cellulaire observée dans les tumeurs, le **modèle hiérarchique**, également nommé *théorie des cellules souches cancéreuses*. Ce second modèle prend en compte l'organisation hiérarchique des cellules normales, comportant les cellules souches qui produisent progressivement des cellules progénitrices communes et plus restreintes ; ces dernières étant alors capables de donner naissance à tous les types de cellules matures (cellules différenciées) qui constituent un tissu normal (Fu *et al.*, 2014). Selon la théorie des CSC, les mutations causales du cancer surviendraient dans une cellule



## INTRODUCTION

souche normale ou une cellule progénitrice. L'hétérogénéité cellulaire observée dans une tumeur résulterait alors d'un gradient de différenciation aberrant généré par la CSC (Reya *et al.*, 2001 ; Clevers, 2011).



**Figure 8 : Les deux théories de l'origine cellulaire du cancer du sein**

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

Depuis leur découverte dans les cancers hématopoïétiques par l'équipe de John Dick en 1997, les CSC ont été isolées dans pratiquement tous les types de cancer humain (Bonnet & Dick, 1997). Leur identification repose sur leur capacité à reproduire l'hétérogénéité phénotypique de la tumeur initiale après transplantation dans des souris NOD/SCID (*Non-Obese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency*). Ainsi, des expériences de xélogreffe ont permis la mise en évidence de CSC dans la leucémie myéloïde aiguë mais également dans les cancers du sein, du cerveau, du pancréas, du colon, et du poumon (Lapidot *et al.*, 1994 ; Al-Hajj *et al.*, 2003 ; Singh *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2007 ; Ricci-Vitiani *et al.*, 2007 ; Eramo *et al.*, 2008). Dans le cadre du cancer du sein, les CSC sont notamment caractérisées par la présence

## INTRODUCTION

du marqueur de surface CD44 et la faible expression, voire l'absence de CD24 (phénotype CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>) (Al-Hajj *et al.*, 2003). Toutefois, l'existence de cellules dites « CSC » est sujette à de nombreuses controverses, et leurs caractéristiques d'auto-renouvellement illimité et de multi-potentialité pourraient n'être liées qu'à certains avantages sélectifs conférés par l'accumulation de mutations additionnelles, acquises au cours de l'évolution clonale (Shipitsin & Polyak, 2008).

### ✓ Modèle stochastique ou hiérarchique ?

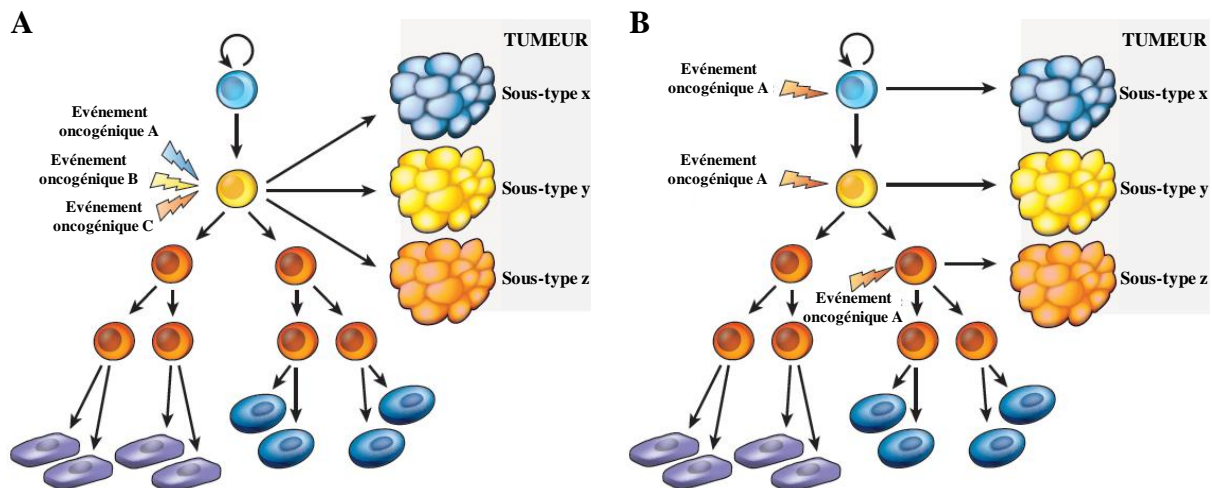
Bien que les deux modèles soient différents, ils ne sont pas mutuellement exclusifs et, au contraire, ceux-ci semblent coexister et se compléter lors du développement tumoral mammaire (Polyak, 2007 ; Shackleton *et al.*, 2009).

En effet, l'hypothèse des CSC et le modèle d'évolution clonale partagent certains aspects de la progression tumorale. Par exemple, dans les deux cas, les tumeurs proviennent d'une seule cellule qui, en ayant acquis une multitude de mutations, a gagné un avantage prolifératif illimité. Par ailleurs, ces théories diffèrent aussi fondamentalement dans le concept principal. Pour autant, ces divergences ne soutiendraient pas l'exclusivité d'un seul des deux modèles. En particulier, selon le modèle stochastique, l'hétérogénéité tumorale reposerait sur une compétition entre plusieurs clones de différents phénotypes, alors que dans le modèle hiérarchique, la multitude de types cellulaires observée dans une tumeur résulterait d'un programme de différenciation aberrante, généré par les CSC. Néanmoins, il est difficile de concevoir, *via* le seul modèle stochastique, comment des cellules différenciées puissent donner naissance à un large panel de types cellulaires, sans acquérir de propriétés de cellules souches. *A contrario*, la théorie des CSC n'expliquerait pas à elle seule la progression tumorale et notamment la génération de cellules tumorales plus agressives, puisque les cellules dérivées de la différenciation des CSC perdraient leur potentiel d'auto-renouvellement (Campbell & Polyak, 2007 ; Adams & Strasser, 2008 ; Hsiao *et al.*, 2010 ; Mannello, 2013).

Plus récemment, deux nouveaux concepts ont été proposés afin de rendre compte de l'hétérogénéité inter-tumorale, tout en conciliant les principes des deux théories de l'origine cellulaire du cancer (Figure 9). Ces deux modèles reposent essentiellement sur la notion de cellule d'origine ou cellule initiatrice de tumeur, correspondant à la cellule unique qui a acquis la ou les premières mutations promotrices du cancer. Il est important de noter ici que le concept de cellule d'origine n'est pas nécessairement lié à celui des CSC ; ces dernières se rattachant davantage à la notion de cellules initiateuses du cancer. Ainsi, selon Jane E.

## INTRODUCTION

Visvader, les différents phénotypes tumoraux dépendraient soit des différentes mutations génétiques et épigénétiques pouvant survenir au sein de la même cellule d'origine, soit du type cellulaire servant de cellule d'origine (Ince *et al.*, 2007 ; Lindeman & Visvader, 2010 ; Visvader, 2011).



**Figure 9 : Les deux modèles de l'hétérogénéité inter-tumorale**

*A) Dans le premier modèle, la détermination du phénotype de la tumeur dépend de l'événement oncogénique (mutation(s) génétique(s) et/ou épigénétique(s)) survenant dans une même cellule d'origine. B) Dans le second modèle, un même événement oncogénique pourrait avoir lieu dans différentes cellules d'origine potentielles et le phénotype de la tumeur serait déterminé en fonction du degré de différenciation de la cellule d'origine ciblée (Adapté de Visvader, 2011).*

L'hétérogénéité tumorale du cancer du sein est l'une des principales causes des échecs thérapeutiques. Il est donc primordial d'identifier les différentes sources de cette hétérogénéité, au niveau intrinsèque comme au niveau extrinsèque, afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique (Bertos & Park, 2011).

### *b) Les différents types de cancers du sein*

Les tumeurs de sein peuvent être qualifiées de bénignes ou malignes en fonction de leur caractère évolutif et de leur diagnostic vital. Cette distinction est fortement corrélée à des critères macroscopiques, histologiques et pronostiques, définis par les classifications internationales, éditées par l'OMS.

Les tumeurs bénignes du sein sont des masses tissulaires, le plus souvent non cancéreuses, dont les contours sont bien limités et encapsulés après examen radiologique (mammographie ou échographie). Leur croissance est lente et reste localisée dans le tissu où elles ont pris naissance. Elles ne récidivent pas après exérèse complète, et n'entraînent jamais de métastases. Leur évolution est donc favorable sauf en cas de graves complications. Le

## INTRODUCTION

fibroadénome est la tumeur bénigne la plus fréquente chez les femmes non ménopausées. Elle est découverte le plus souvent avant 30 ans, mais peut être observée à n'importe quel âge.

Les tumeurs de sein, dites malignes, correspondent aux différentes formes de cancer du sein. Leurs caractères s'opposent point par point à ceux des tumeurs bénignes. Elles sont mal délimitées et non-encapsulées et résultent d'une croissance cellulaire rapide, avec des cellules qui tendent à infiltrer et détruire les tissus adjacents. Les tumeurs malignes peuvent récidiver après éradication locale, et donner lieu à l'apparition de métastases. L'évolution, en l'absence de traitement, se fait spontanément vers la mort. Plus de 95% des tumeurs malignes du sein 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* ou non infiltrants des carcinomes invasifs ou infiltrants (Figure 10).

### ✓ Les carcinomes in situ (ou non infiltrants) :

Deux principaux types de carcinomes *in situ* sont distingués selon la localisation de la prolifération des cellules tumorales malignes : le **carcinome canalaire *in situ* (CCIS)** lorsque les cellules cancéreuses prolifèrent dans la lumière du canal galactophore, et le **carcinome lobulaire *in situ* (CLIS)** lorsque la prolifération tumorale maligne est cantonnée dans les *acini* des lobules<sup>1</sup> (Sinn & Kreipe, 2013). Dans tous les cas, la membrane basale reste intacte, et le tissu conjonctif n'est pas envahi. Les carcinomes mammaires *in situ* sont rares (2 à 3% des cas) et généralement de bon pronostic mais peuvent toutefois évoluer, dans 20 à 50% des cas, vers une forme infiltrante.

### ✓ Les carcinomes invasifs (ou infiltrants) :

Dans les carcinomes dits infiltrants, les cellules cancéreuses ont dégradé la membrane basale et envahissent le tissu mammaire environnant. Ils représentent la grande majorité de cancers du sein (98%) et sont le plus souvent des **carcinomes canauxiaux invasifs (CCI)** (75%) ou des **carcinomes lobulaires infiltrants (CLI)** (5 à 15%), tous deux de mauvais pronostic.

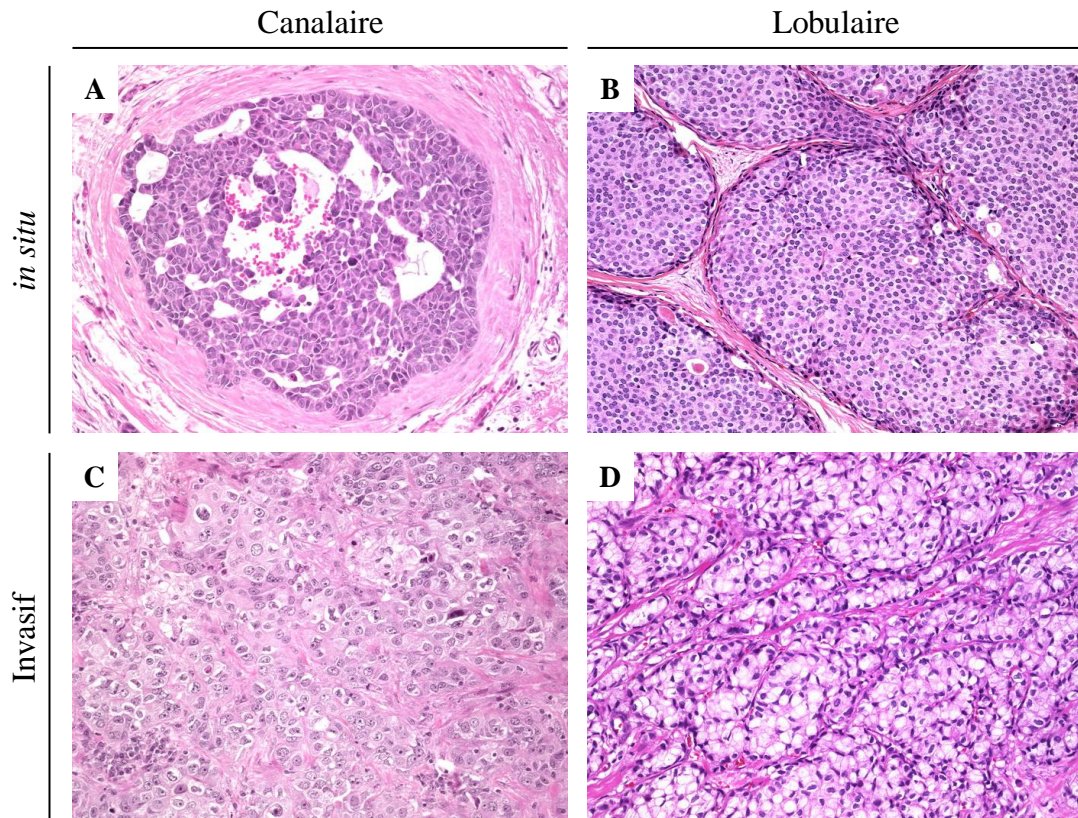
Il existe également de nombreux sous-types particuliers de carcinomes invasifs du sein, plus rares et de bon pronostic, et définis par des spécificités histologiques ainsi que des

---

<sup>1</sup> La classification internationale de ces lésions précancéreuses a été mise à jour par l'OMS en 2012. Les **CLIS** constituent désormais un sous-groupe des néoplasies lobulaires et les **DCIS** ne regroupent plus l'ensemble des formes non lobulaires des cancers anciennement dits non infiltrants (lésions prolifératives intra-canauxiaux, lésions papillaires, cribriformes, etc.) (Sinn & Kreipe, 2013).

## INTRODUCTION

caractéristiques d'ordre épidémiologique, clinique (diagnostic et pronostic), et moléculaire. Parmi ces sous-groupes figurent les carcinomes tubuleux, cribriformes, mucineux, médullaires, papillaires ou encore les carcinomes apocrines, neuroendocrines, et adénoïdes kystiques (Yerushalmi *et al.*, 2009 ; Weigelt *et al.*, 2010b) (WHO Classification of Tumours of the Breast, Fourth Edition, CIRC, OMS, 2012).



**Figure 10 : Histologie des principaux types de cancers du sein**

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

Les carcinomes invasifs peuvent aussi évoluer et engendrer des cancers métastatiques.

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

## INTRODUCTION

important dans le pronostic de la tumeur. Dans la plupart des cancers du sein, les métastases sont principalement pulmonaires, hépatiques, osseuses, et cérébrales.

✓ Les autres formes malignes de cancers mammaires (rares en France) :

- **Le cancer inflammatoire du sein (1 à 4% des cancers du sein) :** Les cellules cancéreuses infiltrent les canaux galactophores et se propagent très rapidement vers les vaisseaux lymphatiques dans la peau du sein, conduisant alors à une embolie lymphatique. Ce type de cancer du sein, très agressif et de mauvais pronostic, est dit « inflammatoire » car il présente souvent des symptômes cliniques rappelant une inflammation, tels que l'augmentation du volume du sein et des changements au niveau de la peau du sein (rougeurs, chaleur au touché, œdème, peau d'orange).
- **La maladie de Paget du mamelon (1%) :** Il s'agit d'un adénocarcinome intra-épidermique qui prend naissance dans les canaux du sein et se répand jusqu'à l'épiderme du mamelon puis de l'aréole. Ce type de cancer du sein est souvent associé à un carcinome canalaire *in situ* ou plus rarement à un carcinome canalaire infiltrant.

### *c) Classifications des cancers du sein*

Comme nous l'avons vu précédemment, le cancer du sein est une maladie complexe et très hétérogène. Il comprend différentes entités tumorales présentant des caractéristiques cliniques, histopathologiques et moléculaires bien distinctes. Cette hétérogénéité pose de sérieux problèmes non seulement dans l'étude de la biologie de la maladie, mais aussi dans le traitement du cancer du sein. Il est donc nécessaire d'identifier et de classer les différents types de tumeurs mammaires afin d'établir des groupes homogènes tant sur le plan pronostique que thérapeutique. En effet, une telle classification permettrait de mieux apprécier la diversité des cancers du sein et ainsi d'attribuer aux patients des traitements plus ciblés et donc plus efficaces. C'est dans ce contexte que plusieurs classifications ont été successivement proposées, puis adoptées, au cours de ces dernières décennies. Celles-ci sont constamment mises à jour par divers organismes professionnels à l'échelle internationale et reposent notamment sur plusieurs paramètres permettant de préciser le potentiel évolutif (pronostic) des tumeurs malignes du sein, à savoir : le degré de différenciation (**Grade de Scarff-Bloom-Richardson**), l'extension anatomique (**Stade TNM**) et le profil moléculaire (**Classification moléculaire**).

## INTRODUCTION

- ✓ Le Grade de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) – modification de Nottingham (Elston-Ellis) :

Le Grade SBR est une classification histopronostique, établie en 1957, qui prend en compte trois facteurs histologiques : la différenciation glandulaire (formation de tubules), le pléomorphisme nucléaire (atypies cyto-nucléaires) et l'activité mitotique (nombre de mitoses sur 20 champs à fort grossissement). Chacun de ces critères est évalué avec un score allant de 1 à 3 (Tableau 3) (Bloom & Richardson, 1957 ; Rakha *et al.*, 2010).

**Tableau 3 : Méthode d'évaluation des facteurs histologiques du Grade SBR.**

<b>Facteur histologique</b>	<b>Score = 1</b>	<b>Score = 2</b>	<b>Score = 3</b>
<b>Formation de tubules</b>	Plus de 75% de la surface tumorale	De 10 à 75% de la surface tumorale	Moins de 10% de la surface tumorale
<b>Pléomorphisme nucléaire</b>	Noyaux réguliers et monomorphes	Atypies cyto-nucléaires modérées	Noyaux pléomorphes avec atypies marquées
<b>Nombre de mitoses</b>	0 à 1 mitose	2 à 3 mitoses	3 mitoses ou plus

Le grade histologique global de la tumeur correspond alors à la somme des scores pour chacun des trois critères. Celui-ci augmente avec l'agressivité du cancer (Tableau 4).

**Tableau 4 : Classification SBR des grades de cancer du sein**

<b>Grade</b>	<b>Score total</b>	<b>Description</b>
<b>I</b>	3 - 5	Tumeur de bas grade (bien différenciée) qui ne semble pas se développer rapidement et qui est peu susceptible de se propager
<b>II</b>	6 - 7	Tumeur de grade intermédiaire (modérément différenciée) dont les caractéristiques varient entre celles des tumeurs de grade I et de grade III
<b>III</b>	8 - 9	Tumeur de haut grade (peu différenciée) qui a tendance à se développer rapidement et qui est susceptible de se propager

L'évaluation du Grade SBR est réalisée sur tous les types histologiques de cancer infiltrant, excepté le carcinome médullaire.

## INTRODUCTION

### ✓ Le Stade TNM :

La classification TNM, conçue par Pierre Denoix entre 1943 et 1952 (adoptée en 1953 par l'union internationale contre le cancer (UICC) et l'American Joint Committee on cancer (AJCC)), est basée sur la taille de la tumeur primitive et/ou son extension aux tissus et organes de voisinage (Tumor), l'importance de la dissémination aux ganglions lymphatiques régionaux (Node) et la présence ou l'absence de métastases (Metastasis). Chacun de ces paramètres est associé à un chiffre variant de 0 (= absence) à 4, et dont la valeur augmente avec la gravité du cancer. La cotation du T (T0 à T4) dépend du volume tumoral et de son extension à la cage thoracique ou à la peau. La cotation N (N0 à N3) 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 l'absence de métastase ou M1 en leur présence, quelque soit leur siège, unique ou multiple. La juxtaposition de ces 3 lettres chiffrées permet alors une description abrégée de l'extension de la tumeur maligne, définissant le stade du cancer (Tableau 5).

**Tableau 5 : Classification TNM des stades de cancer du sein**

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



## INTRODUCTION

### ✓ La classification moléculaire :

La classification moléculaire a longtemps été fondée sur la détermination du statut des récepteurs hormonaux (ER $\alpha$ , *Estrogen Receptor* et PgR, *Progesterone Receptor*), de l'oncoprotéine HER2, et de l'indice de prolifération Ki67 dans les tumeurs. L'expression de ces marqueurs est évaluée par des approches immunohistochimiques et par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence. Cette analyse histopathologique des tumeurs est encore utilisée à l'heure actuelle et permet de compléter les classifications histopronostiques traditionnelles (type histologique, Grade SBR et Stade TNM), en apportant une valeur prédictive importante dans l'orientation du choix thérapeutique. Toutefois, des variations considérables sont encore observées dans la réponse au traitement et les résultats cliniques, y compris pour les tumeurs présentant des similitudes apparentes au niveau de leurs caractéristiques cliniques et pathologiques. Cette discordance dans la biologie du cancer du sein a suggéré que l'hétérogénéité et la complexité du comportement des tumeurs mammaires sont beaucoup plus importantes que ce qui avait été initialement soupçonné (Bertos & Park, 2011 ; Goldhirsch *et al.*, 2011 ; Viale, 2012).

Au début des années 2000, de nouvelles approches basées sur l'étude des profils transcriptionnels des tumeurs mammaires, ont été envisagées pour affiner la base moléculaire de l'hétérogénéité du cancer du sein. En effet, l'essor des techniques d'analyse à large échelle, comme les biopuces à ADN, a permis de révéler différentes signatures moléculaires des tumeurs de sein. Ainsi, Charles Perou et ses collaborateurs ont été les premiers à identifier 5 sous-types de carcinomes mammaires, cliniquement pertinents, sur la base de l'expression de 8102 gènes : Luminal A, Luminal B, Basal-like, HER2+ et Normal-like (Perou *et al.*, 2000 ; Sorlie *et al.*, 2001 ; Sorlie *et al.*, 2003 ; Sotiriou *et al.*, 2003 ; Hu *et al.*, 2006). D'autres études plus récentes et plus approfondies ont également mis en évidence 2 nouveaux sous-types moléculaires de carcinomes mammaires : les tumeurs dites « Molecular apocrine » qui présentent une activation de la signalisation du récepteur aux androgènes (AR, *Androgen Receptor*), et les tumeurs « Claudin-low » (ou Mesenchymal-like) caractérisées notamment par une faible expression des marqueurs de jonction cellulaire (*CDH1*, Cadherin-1 et *CLDN*, Claudin) (Tableau 6) (Farmer *et al.*, 2005 ; Prat *et al.*, 2010). Parallèlement à l'identification de ces sous-types moléculaires, de nombreuses équipes ont utilisé différents profils d'expression génique pour développer des tests génomiques qui ont permis, par la suite, la caractérisation de nouvelles signatures pronostiques (van 't Veer *et al.*, 2002 ; Paik *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2005 ; Sotiriou *et al.*, 2006 ; Naderi *et al.*, 2007). Ces signatures pronostiques

## INTRODUCTION

sont complémentaires aux critères cliniques et pathologiques conventionnels et permettent d'améliorer la décision thérapeutique, en évaluant en fonction du test génomique utilisé, plusieurs paramètres comme le risque de rechute, la survie sans métastases, la nécessité d'une chimiothérapie ou encore le bénéfice d'un traitement spécifique. Deux de ces tests génomiques, MammaPrint<sup>®</sup> (Agendia, Amsterdam, les Pays-Bas) et OncotypeDX<sup>®</sup> (Genomic Health, Redwood City, CA, USA), ont été commercialisés en vue d'une utilisation en clinique et font actuellement l'objet d'études prospectives en essai clinique de phase III (essai clinique MINDACT, *microarray in node-negative and 1 to 3 positive lymph node disease may avoid chemotherapy*, pour Mammaprint<sup>®</sup> ; TAILORx, *trial assigning individualized options for treatment (Rx)*, pour OncotypeDX<sup>®</sup>) (Harris *et al.*, 2007 ; Cardoso *et al.*, 2008 ; Sparano & Paik, 2008 ; Sotiriou & Pusztai, 2009 ; Colombo *et al.*, 2011 ; Wesolowski & Ramaswamy, 2011).

Plus récemment, Christina Curtis et ses collaborateurs ont caractérisé l'architecture génomique et transcriptomique de 2000 tumeurs mammaires en analysant l'impact des aberrations génomiques sur le transcriptome. Ils ont ainsi pu dresser une nouvelle carte d'identité moléculaire intégrant 10 groupes dérivés des précédents sous-types moléculaires identifiés. De plus, chacun de ces 10 nouveaux groupes moléculaires a été associé à des résultats cliniques distincts et a permis d'identifier de nouvelles anomalies génétiques potentiellement impliquées dans l'initiation et la progression du cancer du sein (Curtis *et al.*, 2012 ; Dawson *et al.*, 2013).

Par ailleurs, une analyse moléculaire massive des carcinomes mammaires, fondée sur le croisement de nombreuses données génomiques (nombre de copies d'ADN génomique, mutations géniques, méthylation de l'ADN, analyse du transcriptome et expression de microARNs), a montré que les différentes altérations génétiques et épigénétiques convergent vers 4 phénotypes moléculaires majeurs de cancers de sein, à savoir les tumeurs « Luminal A » et « Luminal B », les « Basal-like » et les « HER2+ » (The cancer genome atlas network (2012)).

## INTRODUCTION

**Tableau 6 : Classification moléculaire des cancers du sein**

Description des 7 sous-types de cancer du sein sur la base de l'expression spécifique de certains gènes. Les cancers de sous-types « Luminal A » représentent 50-60% des cancers du sein, les « Luminal B » 10-20%, les « Basal-like » 10-20%, les « HER2+ » 15-20%, les « Normal-like » 5-10% et les « Claudin-low » 12-14% (Adapté de (Weigelt et al., 2010a ; Eroles et al., 2012)).

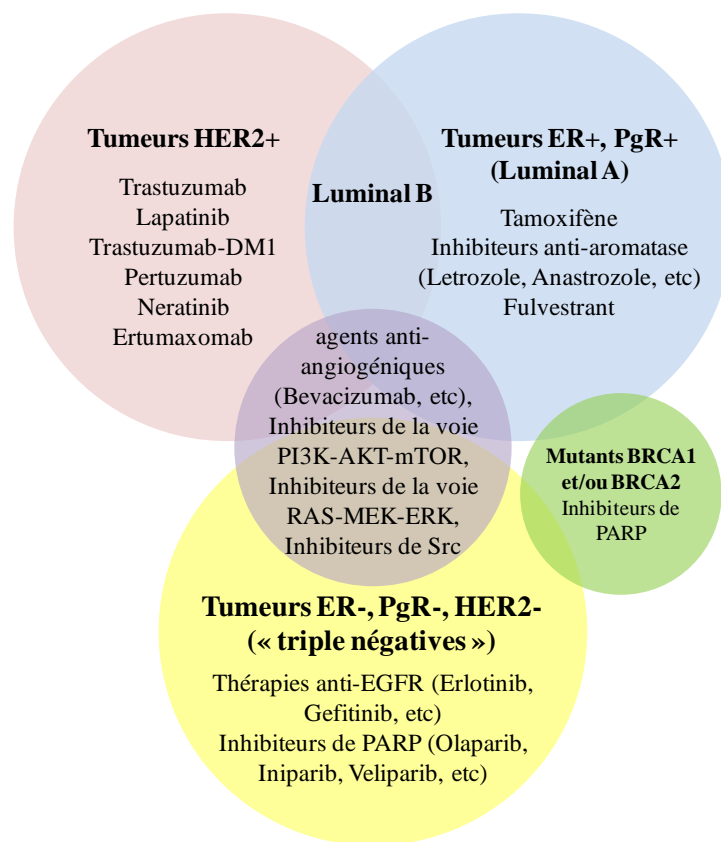
Sous-type moléculaire	ERα/PgR /HER2	Marqueurs basales CK5/6, EGFR	Autres marqueurs	Gènes caractéristiques	Grade histologique	Pronostic
<b>Luminal A</b>	ER+ PgR+ HER2-	-	-	<i>ESR1, KRT8, KRT18, GATA3, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1</i>	Grade I ou II	Bon
<b>Luminal B</b>	ER+/- PgR+/- HER2-/+	-	-	<i>ESR1, KRT8, KRT18, GATA3, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM4B</i>	Grade II ou III	Intermédiaire
<b>HER2+</b>	ER- PgR- HER2+	+/-	-	<i>ERBB2, GRB7</i>	Grade III	Défavorable
<b>Basal-like</b>	ER- PgR- HER2-	+	-	<i>KRT5, KRT17, CDH3, FABP7, TRIM29, LAMC2, ID4</i>	Grade III	Très défavorable
<b>Normal-like</b>	ER-/+ PgR ? HER2-	+	-	<i>PTN, CD36, FABP4, AQP7, ITGA7</i>	Grade I	Intermédiaire
<b>« Molecular apocrine »</b>	ER- PgR- HER2+/-	+/-	AR+	<i>AR, FAS, ERBB2, XBP1</i>	Grade II ou III	Intermédiaire
<b>« Claudin-low »</b>	ER- PgR- HER2-	+/-	CDH1 bas/- CLDN bas/-	<i>CD44, SNAI3</i>	Grade III	Défavorable

L'ensemble des données apportées par les différentes classifications proposées lors de ces dernières années a permis de mieux appréhender l'hétérogénéité tumorale des cancers du sein, améliorant ainsi la compréhension des mécanismes biologiques à l'origine de ces maladies. En particulier, la classification moléculaire a conduit à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et a ainsi largement contribué à l'émergence et au développement rationnel des thérapies ciblées.

# INTRODUCTION

## 5. Cancer du sein et thérapies ciblées

A l'heure actuelle, le choix des thérapies néo-adjuvantes et/ou adjuvantes repose sur plusieurs paramètres définis par les propriétés moléculaires et clinico-pathologiques, caractérisant les différents sous-types de cancer du sein. Ainsi, l'hormonothérapie (tamoxifène, inhibiteurs des aromatasés, etc) et les traitements ciblant le récepteur HER2 (trastuzumab, lapatinib, etc) ont considérablement amélioré la prise en charge des cancers mammaires de type Luminal et HER2+ et sont aujourd'hui les principales thérapies ciblées utilisées en clinique pour compléter la chirurgie, la chimiothérapie ou la radiothérapie. (Figure 11) (El Saghir *et al.*, 2011 ; Higgins & Baselga, 2011 ; Curigliano *et al.*, 2012).



**Figure 11 : Les principales thérapies ciblées utilisées dans les différents sous-types moléculaires de cancers du sein**

*Les récents progrès effectués dans la caractérisation des différents sous-types moléculaires du cancer du sein ont largement contribué au développement des thérapies ciblées. Actuellement, l'orientation du choix thérapeutique est déterminée par les profils moléculaires et les propriétés clinico-pathologiques qui tiennent compte de l'hétérogénéité des tumeurs mammaires : HER2+, Luminal A, Luminal B et « triple négatives ». Ainsi, les principaux agents thérapeutiques utilisés visent à cibler le récepteur HER2 pour les tumeurs HER2+ ; les récepteurs hormonaux pour les Luminal A et B. Concernant les tumeurs « triple négatives » (ER-, PgR- et HER2-), aucune thérapie ciblée n'a encore été approuvée à cause du manque de données pour définir l'hétérogénéité moléculaire de ces formes de cancers du sein. En parallèle, d'autres thérapies visant les mécanismes de l'angiogenèse ou d'autres voies de signalisation intracellulaires, sont également développées pour contrer les résistances à l'hormonothérapie et aux traitements anti-HER2 (Adapté de (Higgins & Baselga, 2011)).*

## INTRODUCTION

Il existe toutefois certaines limites à l'utilisation de ces agents ciblés. Dans un premier temps, ils ne sont indiqués le plus souvent que pour les cancers du sein métastatiques. Ensuite, aucune de ces thérapies n'a encore montré de résultats efficaces dans le traitement des cancers du sein « triple négatifs », n'exprimant pas les récepteurs hormonaux, et ne surexprimant pas HER2 (ER-, PgR-, HER2-) (Brenton *et al.*, 2005). De plus, bien que le développement de ces agents ciblés ait augmenté le pronostic vital, on estime encore que 30% des patientes sont en échecs thérapeutiques (Gonzalez-Angulo *et al.*, 2007). Ces échecs thérapeutiques sont notamment dus à la résistance intrinsèque ou acquise à ces traitements, le plus souvent associée à une surexpression et/ou une suractivation de récepteurs aux facteurs de croissance (Magne *et al.*, 2010).

Pour l'ensemble de ces raisons, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques s'avère donc primordiale pour améliorer l'efficacité des traitements du cancer du sein. C'est pourquoi les nouvelles approches thérapeutiques visent à inhiber spécifiquement les molécules jouant un rôle majeur dans les voies de signalisation oncogéniques, impliquées notamment dans le contrôle du cycle cellulaire, la survie cellulaire, l'invasion cellulaire, le développement de métastases et l'angiogenèse. Comme nous l'avons vu précédemment, les facteurs de croissance interviennent dans la régulation de ces effets biologiques, en interagissant notamment avec le microenvironnement tumoral. De plus, les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), principaux récepteurs des facteurs de croissance, sont fréquemment surexprimés et/ou suractivés dans les cancers du sein. Ainsi, les facteurs de croissance, leurs récepteurs et les voies de signalisation associées sont des cibles thérapeutiques privilégiées dans le cancer du sein, et font d'ailleurs l'objet de développement de nombreux agents thérapeutiques (Alvarez *et al.*, 2010 ; Mohamed *et al.*, 2013).

Ici, on dressera une liste non exhaustive des principales thérapies ciblées visant à inhiber ces RTK et leurs voies de signalisation sous-jacentes.

### *a) Ciblage des voies de signalisation associées aux facteurs de croissance*

Les nouvelles approches des thérapies ciblées faisant l'objet d'essais cliniques visent principalement à inhiber l'activité des RTK et/ou des protéines impliquées dans leurs voies de signalisation sous-jacentes, telles que les voies Ras/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR ou Src (Normanno *et al.*, 2009 ; Alvarez *et al.*, 2010 ; Mohamed *et al.*, 2013). Les inhibiteurs développés pour répondre à ces approches se divisent en deux grandes familles :

## INTRODUCTION

- ✓ les **anticorps monoclonaux** se liant soit au facteur de croissance pour limiter l'interaction ligand/récepteur, soit au domaine extracellulaire des RTK pour empêcher la fixation de leur ligand ou leur homo/hétérodimérisation. Dans les deux cas, ces anticorps bloquants entraînent l'inhibition des voies de signalisation sous-jacentes (Adams & Weiner, 2005).
- ✓ les **petites molécules inhibitrices d'activité kinase** qui, en entrant en compétition avec l'ATP (*Adénosine TriPhosphate*), bloque sa fixation au niveau de la poche de liaison dans le domaine catalytique de la protéine initialement ciblée (RTK ou autre protéine de signalisation intracellulaire) (Zhang *et al.*, 2009).

Les principaux traitements ciblés ont ici été catégorisés en fonction du profil moléculaire et des propriétés clinico-pathologiques des tumeurs mammaires, à savoir les cancers du sein HER2+, hormono-dépendants (Luminal A et Luminal B) et « triple négatifs » (TN).

### ✓ Les cancers du sein HER2+ :

Les cancers du sein HER2+ représentent près de 15-20% de tous les sous-types de cancers du sein et sont corrélés à un phénotype très agressif et un pronostic défavorable (Tableau 6). L'approbation du **trastuzumab** (Herceptine®) par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1998, a considérablement amélioré le bénéfice clinique des patientes et a également ouvert la voie à l'avènement des approches ciblées dans le traitement du cancer du sein. En effet, le trastuzumab fut le premier agent ciblé validé à avoir montré des taux de réponse et des résultats encourageants pour le traitement des cancers du sein métastatiques de type HER2+. Par la suite, plusieurs essais cliniques ont également confirmé une augmentation des taux de survie et une réduction significative du risque de rechute chez les patientes atteintes d'un cancer HER2+, lorsqu'il est utilisé en traitement de première ligne en combinaison avec une chimiothérapie adjuvante (Slamon *et al.*, 2001 ; Piccart-Gebhart *et al.*, 2005 ; Romond *et al.*, 2005 ; Jahanzeb, 2008 ; Perez *et al.*, 2011 ; Slamon *et al.*, 2011).

Le **trastuzumab**, anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le domaine extracellulaire IV de HER2, agit selon différents mécanismes d'action qui ne sont pas encore tous entièrement élucidés (Vu & Claret, 2012). Bien que l'efficacité du trastuzumab soit maintenant bien établie, elle reste toutefois limitée. En effet, on estime que seulement 26% des patientes présentant un cancer du sein métastatique de type HER2+ répondent à l'Herceptine® lorsqu'il est utilisé seul en traitement de première intention, supposant ainsi qu'environ 70% sont en échec thérapeutique, probablement à cause d'une résistance intrinsèque au trastuzumab

## INTRODUCTION

(Vogel *et al.*, 2002). De plus, la majorité des patientes démontrant une réponse initiale satisfaisante tend à développer une résistance acquise au trastuzumab dans la première ou la deuxième année après le traitement (Nahta & Esteva, 2007). Ainsi, un nombre croissant de nouveaux agents thérapeutiques ciblant le récepteur HER2 ont été développés et trois d'entre eux ont d'ailleurs été approuvés par la FDA : le **lapatinib** (Tykerb/Tyverb<sup>®</sup>), le **pertuzumab** (Omnitarg/Perjeta<sup>®</sup>) et le **trastuzumab-DM1** (T-DM1/Kadcyla<sup>®</sup>) (Fang *et al.*, 2011 ; Liedtke & Kiesel, 2012 ; Mohamed *et al.*, 2013). Ces molécules ont notamment vu le jour afin de lutter contre les mécanismes de résistance au trastuzumab (Kaufman *et al.*, 2009b ; Olson, 2012 ; Verma *et al.*, 2012).

Le **lapatinib** est une petite molécule inhibitrice, administrée par voie orale, qui cible de manière réversible et spécifique les domaines tyrosine kinase des récepteurs HER2 et EGFR (Moy *et al.*, 2007). Le Tyverb/Tykerb<sup>®</sup> a été validé par la FDA en mars 2007 pour le traitement des patientes présentant un cancer du sein HER2+ localement avancé ou métastatique, suite à un essai clinique en phase III ayant montré que son utilisation en combinaison avec une chimiothérapie adjuvante (capécitabine) diminue d'environ 50% le risque de progression de la maladie (Geyer *et al.*, 2006 ; Cameron *et al.*, 2008). Depuis son approbation, le lapatinib fait l'objet d'autres études en cours d'essai clinique afin d'évaluer son efficacité en thérapie néo-adjuvante ou adjuvante en combinaison avec le trastuzumab chez des patientes atteintes d'un cancer mammaire HER2+ réfractaire à l'Herceptine<sup>®</sup> (Blackwell *et al.*, 2010 ; Baselga *et al.*, 2012a).

Le **pertuzumab** est un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine extracellulaire II de HER2, bloquant l'homodimérisation du récepteur mais aussi son hétérodimérisation avec EGFR et HER3 (Harbeck *et al.*, 2013). Son utilisation vise en premier lieu à inhiber le complexe HER2/HER3 qui agirait comme une unité oncogénique compensatoire, pouvant conduire à la résistance au trastuzumab en activant notamment la voie de signalisation PI3K/AKT (Holbro *et al.*, 2003 ; Olson, 2012). Ainsi, en juin 2012, la FDA a approuvé l'utilisation du Perjeta<sup>®</sup> en association avec l'Herceptine<sup>®</sup> et le docétaxel pour le traitement des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+ métastatique qui n'ont pas encore reçu de traitement anti-HER2 ou de chimiothérapie pour leur maladie métastatique (Baselga *et al.*, 2012c ; Blumenthal *et al.*, 2013 ; Swain *et al.*, 2013). Le pertuzumab a également été validé par la FDA en tant que thérapie néo-adjuvante pour le traitement des patientes présentant un stade avancé ou métastatique du cancer du sein HER2+ (Gianni *et al.*, 2012 ; Jhaveri & Esteva, 2014).

## INTRODUCTION

Le **trastuzumab-DM1** est une molécule chimérique qui a initialement été développée pour surmonter la résistance à l'Herceptine<sup>®</sup> et ainsi renforcer l'efficacité de cette stratégie ciblée (Burris *et al.*, 2011). Ce nouveau type d'agent thérapeutique permet aussi de réduire considérablement les effets secondaires indésirables de la chimiothérapie dans la mesure où la molécule cytotoxique (un agent anti-microtubule : l'emtansine ou DM1), conjuguée à un anticorps spécifique (trastuzumab), va cibler plus précisément les cellules tumorales à éliminer (Chari, 2008). En février 2013, la FDA a autorisé l'utilisation du Kadcylla<sup>®</sup> en monothérapie, pour le traitement du cancer du sein HER2+ métastatique, chez les patients ayant reçu au préalable un traitement par le trastuzumab et un taxane, séparément ou en combinaison (Verma *et al.*, 2012 ; Welslau *et al.*, 2014).

Enfin d'autres agents ciblés anti-HER2 sont encore en voie de développement ou en phase d'essai clinique. Parmi les plus prometteurs, l'**ertumaxomab**, un anticorps bispécifique ciblant à la fois HER2 exprimé dans les cellules tumorales et l'antigène CD3 présent sur les cellules T, et le **neratinib**, un inhibiteur irréversible des tyrosine kinases de l'ensemble des récepteurs de la famille HER, sont actuellement en phase II et III dans plusieurs essais cliniques pour le traitement des patientes présentant un cancer du sein HER2+ métastatique (Kiewe & Thiel, 2008 ; Burstein *et al.*, 2010).

Par ailleurs, comme décrit précédemment dans la partie I.B)3.b), l'activation aberrante de la voie PI3K/AKT/mTOR est l'un des principaux mécanismes de résistance aux thérapies ciblées anti-HER2 (Berns *et al.*, 2007 ; Garrett & Arteaga, 2011). En effet, cette voie de signalisation joue un rôle central dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la survie, la migration, ou encore l'angiogenèse, et, est fréquemment dérégulée dans les cancers du sein, notamment dans les tumeurs HER2+ résistantes aux principaux agents anti-HER2 utilisés en clinique (Liu *et al.*, 2009b ; Kataoka *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2011 ; Hanker *et al.*, 2013). Bien que de nombreux inhibiteurs de l'activité kinase de PI3K aient été développés en études précliniques, tels que le **LY294002** et la **wortmannine**, leur application en clinique restait limitée en raison de leur faible solubilité, leur instabilité et de leur haute toxicité (Walker *et al.*, 2000 ; Stein, 2001). Toutefois, d'autres molécules inhibitrices d'activité kinase de PI3K comme le **GDC-0941** et le **XL147**, ou d'AKT comme le **GSK690693**, sont actuellement en phase I/II d'essais cliniques (Marone *et al.*, 2008 ; Rhodes *et al.*, 2008 ; Engelman, 2009 ; Junttila *et al.*, 2009 ; Burris, 2013 ; Zheng *et al.*, 2014). De plus, des approches thérapeutiques alternatives plus prometteuses, visent à inhiber la protéine mTOR, sous-jacente à la voie PI3K/AKT. En effet, des dérivés de la rapamycine (inhibiteur



## INTRODUCTION

naturel de mTOR) présentant une meilleure solubilité et stabilité, comme l'**évérolimus** (Afinitor<sup>®</sup>) ou le **temsirolimus** (Torisel<sup>®</sup>), sont entrés respectivement en phase II et III d'essais cliniques dans le cancer du sein (Nahta & O'Regan, 2010). Par exemple, la combinaison de l'évérolimus avec le trastuzumab et la vinorelbine est en cours d'évaluation pour le traitement en deuxième ou troisième intention des cancers du sein HER2+, localement avancés ou métastatiques, réfractaires au trastuzumab, et ayant été prétraités avec un taxane (Lauring *et al.*, 2013).

Enfin, une autre cible thérapeutique attrayante est la protéine chaperonne HSP90 (*Heat Shock Protein 90*). Cette protéine intervient dans la maturation post-traductionnelle et la stabilisation de nombreuses oncoprotéines, parmi lesquelles on retrouve des RTK (HER2, EGFR, PDGFR), des protéines de signalisation (p53, Src, Akt, Raf-1, IKK, *IκB Kinase*), des régulateurs du cycle cellulaire (Cdk4/6) ou encore des récepteurs aux stéroïdes (récepteurs aux androgènes, œstrogènes et progestérone). Ainsi, une seule molécule inhibitrice ciblant HSP90 permettrait de court-circuiter simultanément de multiples voies de signalisation oncogéniques, réduisant ainsi la possibilité de boucles de rétrocontrôles et de mutations conduisant à la résistance tumorale (Li *et al.*, 2009). Des composés bloquant le site de fixation de l'ATP de la protéine HSP90, tels que la **tanespimycine** et l'**alvespimycine**, ont donc été développés et leur efficacité est actuellement appréciée dans de nombreux essais cliniques. Etant donné que HER2 figure parmi les protéines cibles de HSP90, ces études ont principalement été menées chez des patientes atteintes d'un cancer du sein HER-2+ métastatique (Zagouri *et al.*, 2013). Par exemple, la tanespimycine a fait l'objet d'un essai de phase II évaluant l'inhibiteur de la HSP90 en association avec le trastuzumab chez des patientes réfractaires à l'Herceptine<sup>®</sup>. Les résultats obtenus sont encourageants puisque les auteurs ont relevé une activité anti-tumorale significative en combinant la tanespimycine avec le trastuzumab (Modi *et al.*, 2011).

### ✓ Les cancers du sein hormono-dépendants (Luminal A et Luminal B) :

Outre les principales thérapies ciblées visant à inhiber l'action hormonale (tamoxifène, anti-aromatases, fulvestrant...), que nous ne développerons pas ici, d'autres agents thérapeutiques ciblant des RTK et/ou leur signalisation sous-jacente ont notamment été développés pour le traitement de cancers du sein hormono-dépendants réfractaires aux anti-œstrogènes (Liedtke & Kiesel, 2012). En effet, ces résistances sont principalement liées à l'activation de voies de signalisation indépendantes aux œstrogènes, *via* un dialogue croisé entre ER et des RTK ou entre leurs signalisations sous-jacentes respectives (Schiff *et al.*, 2004).

## INTRODUCTION

Les cancers du sein hormono-dépendants de sous-type Luminal B sont corrélés à un phénotype plus agressif que les Luminal A et sont davantage concernés par la résistance aux traitements anti-hormonaux. Certaines études ont associé ces observations au fait que 10-20% des tumeurs Luminal B présentent un phénotype (ER+/HER2+), mais celles-ci restent sujettes à de nombreuses controverses (Bhargava & Dabbs, 2008 ; Tran & Bedard, 2011). Toujours est-il que ces observations ont conduit au développement de stratégies thérapeutiques combinatoires, alliant à la fois l'hormonothérapie et des agents ciblés anti-HER2, afin de contrecarrer la résistance aux anti-œstrogènes. Ainsi, l'utilisation du lapatinib en combinaison avec le letrozole (inhibiteur de l'aromatase) a été approuvée en traitement de première intention pour les cancers du sein métastatiques ER+/HER2+ (Johnston *et al.*, 2009). Un autre essai clinique en phase III a également démontré que l'addition du trastuzumab au traitement seul par un inhibiteur de l'aromatase (anastrozole) diminue significativement la progression des cancers du sein métastatiques ER+/HER2+ (Kaufman *et al.*, 2009a). De plus, la voie PI3K/AKT/mTOR, fréquemment dérégulée dans les cancers du sein réfractaires aux anti-œstrogènes, agirait également comme un mécanisme de résistance à l'hormonothérapie (Stemke-Hale *et al.*, 2008). Récemment, la FDA a ainsi validé la thérapie combinatoire évérolimus + exemestane (un inhibiteur irréversible de l'aromatase) pour le traitement des cancers du sein ER+ avancés et résistants aux inhibiteurs de l'aromatase (Baselga *et al.*, 2012b ; Lauring *et al.*, 2013). Une autre stratégie ciblée prometteuse vise à inhiber les Cdk4/6, deux protéines kinases impliquées dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire. En effet, il a été rapporté qu'une activation aberrante de ces protéines participerait également à la résistance à l'hormonothérapie dans les cancers du sein hormono-dépendants (Lange & Yee, 2011). Actuellement, un essai clinique en phase III semble montrer des résultats très encourageants (en attente de confirmation) lorsque le **palbociclib** (PD-0332991), petite molécule inhibitrice d'activité kinase des Cdk4/6, est administré, en combinaison avec le letrozole, à des patientes ménopausées atteintes d'un cancer du sein ER+/HER2- (Rocca *et al.*, 2014).

## INTRODUCTION

### ✓ Les cancers du sein « triple négatifs » (TN)<sup>2</sup> :

Les cancers du sein TN constituent un groupe très hétérogène de tumeurs mammaires défini par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et de surexpression de HER2 (ER-, PgR-, HER2-) (Brenton *et al.*, 2005 ; Bertucci *et al.*, 2008 ; Carey *et al.*, 2010 ; Perou, 2011). Ils représentent 15-20% de tous les cancers du sein diagnostiqués et sont corrélés à un pronostic global très défavorable (Mersin *et al.*, 2008 ; Blows *et al.*, 2010 ; Foulkes *et al.*, 2010). En effet, compte tenu de l'absence de thérapie ciblée (hormonothérapie, agents anti-HER2), la chimiothérapie est le seul traitement systémique disponible pour la prise en charge des cancers du sein TN. Les régimes de chimiothérapies standards peuvent s'avérer efficaces pour un sous-groupe de patientes atteintes d'un cancer du sein TN précoce. Pour autant, la majorité des patientes ont un mauvais pronostic vital qui peut s'expliquer par la mise en place d'une maladie résiduelle micro-métastatique et chimiorésistante et par la survenue de rechutes précoces et très agressives (Carey *et al.*, 2007 ; Liedtke *et al.*, 2008 ; Oakman *et al.*, 2010). A l'heure actuelle, les patientes présentant un cancer du sein TN chimiorésistant n'ont aucune option thérapeutique s'offrant à elles et c'est pourquoi de nombreux agents thérapeutiques ciblant des RTK, leurs facteurs de croissance ou des protéines de signalisation sous-jacentes sont en cours de développement (Gelmon *et al.*, 2012 ; Liedtke & Kiesel, 2012 ; Bayraktar & Gluck, 2013 ; Shastry & Yardley, 2013).

Une des approches les plus prometteuses pour le traitement des patientes atteintes d'un cancer du sein TN vise à développer des thérapies anti-angiogéniques. En effet, la nature hautement proliférative des tumeurs de sein TN et les niveaux élevés de VEGF intratumoral retrouvés dans ce type de cancers justifient l'utilisation de ces agents anti-angiogéniques (Linderholm *et al.*, 2009). L'angiogenèse est principalement régulée par des interactions entre les VEGFs et leurs différents récepteurs VEGFRs (Carmeliet, 2005 ; Fox *et al.*, 2007). Ainsi, les stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques actuelles reposent sur le développement d'anticorps monoclonaux humanisés anti-VEGF tels que le **bevacizumab** (Avastin<sup>TM</sup>), d'anticorps monoclonaux humanisés anti-VEGFR comme le **ramucirumab** (IMC-1121B), et d'inhibiteurs « multi-kinases » ciblant non seulement les VEGFR mais également d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase impliqués dans l'angiogenèse : **sorafenib** (Nexavar<sup>®</sup>) et **sunitinib** (Sutent<sup>®</sup>) (Rapisarda & Melillo, 2012 ; Bayraktar & Gluck, 2013). En février 2008,

---

<sup>2</sup> Le cancer du sein « triple négatif » est souvent assimilé au sous-type moléculaire Basal-like en raison de leur profil génique très similaire. Toutefois, il y a une discordance notable entre ces deux groupes de tumeurs puisque plus de 20% des cancers Basal-like ne sont pas TN et environ 25% des cancers du sein TN ne sont pas Basal-like. De plus, les cancers du sein TN comprennent aussi d'autres sous-types moléculaires tels que le sous-type « claudin-low » (Bertucci *et al.*, 2008 ; Carey *et al.*, 2010 ; Perou, 2011).

## INTRODUCTION

l'utilisation du bevacizumab en combinaison avec le paclitaxel fut approuvé par la FDA, pour le traitement des patientes présentant un cancer du sein métastatique « HER2 négatif » (HER2-) et n'ayant pas reçu de chimiothérapie préalable, avant d'être finalement retiré en novembre 2011 par ce même organisme, après avoir jugé que le rapport efficacité/toxicité de ce traitement était insuffisant (Miller *et al.*, 2007 ; Pivot *et al.*, 2011 ; Robert *et al.*, 2011 ; Sasich & Sukkari, 2012). Toutefois, l'indication du bevacizumab pour le traitement des cancers du sein métastatiques HER2-, a été maintenue en Europe par l'EMA (*European Medicines Agency*), et en France par l'ANSM (*Agence nationale de sécurité du médicament*) et la HAS (*Haute autorité de santé*). De plus, de nombreux autres essais cliniques sont en cours pour évaluer l'Avastin<sup>TM</sup> dans les cancers du sein TN en thérapies adjuvantes et néoadjuvantes (Shastry & Yardley, 2013). Par ailleurs, de nouveaux agents anti-angiogéniques ont également vu le jour. Par exemple, le ramucirumab, un anticorps monoclonal bloquant spécifiquement VEGFR2, est actuellement en essai clinique de phase III, en association avec le docétaxel, chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique HER2- (Mackey *et al.*, 2009 ; Crown *et al.*, 2012). Des inhibiteurs « multi-kinases » (sunitinib, sorafenib), déjà approuvés pour le traitement d'autres cancers, ont aussi été évalués dans des essais cliniques de phases II et III, chez des patientes présentant un cancer métastatique HER2-. Concernant le sunitinib (cibles : VEGFR2, PDGFR- $\beta$ , RET (*REarranged during Transfection*), FLT3 (*FMS-Like Tyrosine kinase 3*), et c-kit), les études démontrent une activité limitée en monothérapie et une toxicité significative lorsqu'il est utilisé en combinaison avec des drogues chimiothérapeutiques (Barrios *et al.*, 2010 ; Gelmon *et al.*, 2012 ; Crown *et al.*, 2013). Les résultats obtenus pour le sorafenib (cibles : VEGFR1, 2 et 3, PDGFR- $\beta$ , FLT3, Raf-1, et c-kit) en association avec la chimiothérapie semblent plus encourageants, malgré une toxicité parfois trop importante nécessitant des réductions et des interruptions de dose fréquentes (Chen *et al.*, 2014). En effet, un essai clinique en phase IIb a notamment démontré qu'un co-traitement sorafenib + capécitabine, en traitement de première ou deuxième ligne, améliore significativement la survie sans progression de la maladie en comparaison à un placebo (Baselga *et al.*, 2012d). Néanmoins, la dose de sorafenib utilisée dans cette étude a entraîné une toxicité intolérable pour de nombreux patients ; c'est pourquoi une étude confirmatoire de phase III a été lancée avec une dose de sorafenib réduite (Baselga *et al.*, 2013a).

Le récepteur EGFR est plus fréquemment exprimé et phosphorylé dans les tumeurs TN que dans les autres sous-types moléculaires (Nielsen *et al.*, 2004 ; Reis-Filho & Tutt, 2008 ; Hochgrafe *et al.*, 2010). De plus, il a été décrit que son expression élevée et sa signalisation

## INTRODUCTION

aberrante sont corrélées à un pronostic défavorable et un phénotype agressif dans les cancers du sein TN (Viale *et al.*, 2009 ; Eccles, 2011). Par conséquent, des anticorps monoclonaux spécifiques de l'EGFR tels que le **cetuximab** (Erbix<sup>®</sup>) ou le **panitumumab** (Vectibix<sup>®</sup>), et, des petites molécules inhibitrices d'activité kinase bloquant spécifiquement le domaine tyrosine kinase de l'EGFR, comme le **gefitinib** (Iressa<sup>®</sup>) ou l'**erlotinib** (Tarceva<sup>®</sup>), ont été testés en monothérapie ou en association avec différentes chimiothérapies, pour le traitement des cancers du sein TN. Néanmoins, ces inhibiteurs peinent à démontrer leur efficacité en études précliniques et/ou en essais cliniques de phase II (Corkery *et al.*, 2009 ; Carey *et al.*, 2012 ; Crown *et al.*, 2012 ; Duffy *et al.*, 2012 ; Baselga *et al.*, 2013b).

La protéine tyrosine kinase Src, impliquée dans la promotion de nombreux événements oncogéniques comme la prolifération, la survie, la migration/invasion et l'angiogenèse, est également une cible privilégiée pour le traitement des cancers du sein TN (Hochgrafe *et al.*, 2010 ; Mayer & Krop, 2010). Ainsi, plusieurs inhibiteurs ont été évalués, dont le **dasatinib** (Sprycel<sup>®</sup>) et le **bosutinib** (Bosulif<sup>®</sup>), ciblant non seulement l'activité kinasique de Src et des SFKs (*Src Family Kinases*), mais aussi celle de Bcr-Abl, du PDGFR et de c-kit (Gnoni *et al.*, 2011). Le dasatinib et le bosutinib sont actuellement en phase I et II d'essais cliniques, en monothérapie ou en association avec différentes chimiothérapies (Finn *et al.*, 2011 ; Fornier *et al.*, 2011 ; Campone *et al.*, 2012).

D'autres stratégies ciblées visent à inhiber les différents partenaires de signalisation de la voie Ras/Raf/MEK/ERK, fréquemment dérégulée dans les cancers du sein et intervenant, *via* des cascades de phosphorylation, dans la prolifération, la survie, la dissémination métastatique et l'angiogenèse (Whyte *et al.*, 2009). De plus, les hauts niveaux d'expression des protéines ERK sont corrélés à un mauvais pronostic, en particulier dans les cancers du sein TN (Bartholomeusz *et al.*, 2012). L'axe Ras/Raf/MEK/ERK est donc une cible potentielle et de nombreuses stratégies thérapeutiques visent à bloquer soit l'ancrage membranaire de la protéine Ras *via* des inhibiteurs de farnésyl transférase tels que le **tipifarnib** (Zarnestra<sup>®</sup>) et le **lonafarnib** (Sarasar<sup>™</sup>), soit l'activité kinase de Raf par le **sorafenib** ou celle des MEK1/2 par le **selumetinib** (Head & Johnston, 2004 ; Moreno-Aspitia, 2010 ; Akinleye *et al.*, 2013). Néanmoins, ces drogues ont principalement été testées dans d'autres cancers comme le mélanome ou le cancer du pancréas, dans lesquels les mutations activatrices de la voie des MAPK sont plus fréquentes, et à ce jour, peu d'essais cliniques ont été menés pour évaluer leur efficacité dans le cancer du sein (Normanno *et al.*, 2009 ; Sparano *et al.*, 2009 ; De Luca *et al.*, 2012 ; McCubrey *et al.*, 2012 ; Zardavas *et al.*, 2013).

## INTRODUCTION

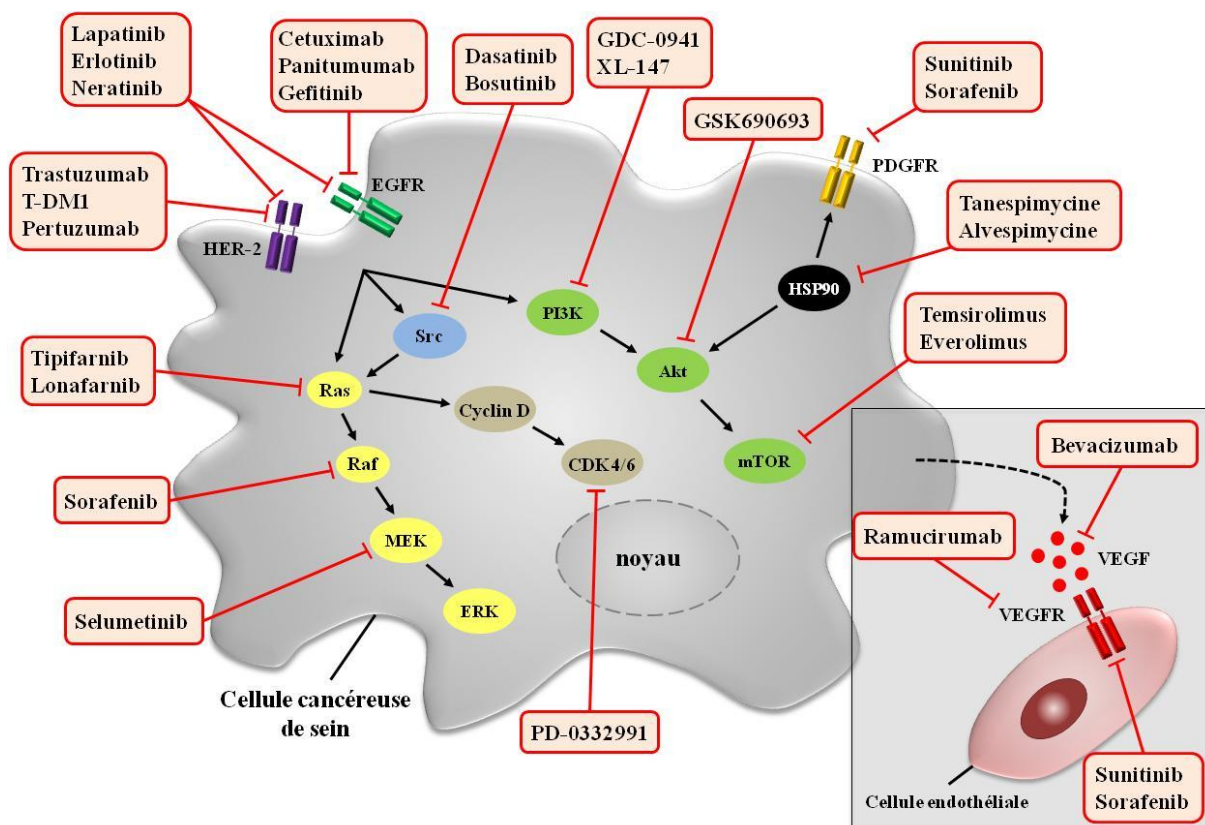
La voie PI3K/AKT/mTOR peut également être une cible thérapeutique intéressante dans la mesure où une perte de PTEN a été rapportée dans plus de 30% des cancers du sein TN (Bayraktar & Gluck, 2013). De ce fait, l'évérolimus et le temsirolimus, ont été évalués en association avec différentes chimiothérapies chez des patientes atteintes d'un cancer du sein TN. Toutefois, les inhibiteurs de mTOR peinent à franchir les phases II d'essais cliniques. Une étude a notamment montré que l'ajout de l'évérolimus à une chimiothérapie néo-adjuvante standard n'améliore pas les taux de réponse (Gonzalez-Angulo *et al.*, 2014).

Récemment, une méta-analyse a montré que les combinaisons de thérapies ciblées avec des chimiothérapies conventionnelles sont potentiellement efficaces pour le traitement des cancers mammaires TN (Clark *et al.*, 2014). Pour autant, seule l'association de l'Avastin<sup>TM</sup> avec des drogues cytotoxiques est indiquée (uniquement en Europe) pour la prise en charge de ces cancers. De plus, le pronostic vital des patientes ayant reçues ce traitement reste défavorable, en particulier chez celles qui ont développées des métastases (Bramati *et al.*, 2014). D'une manière générale, ces échecs thérapeutiques sont principalement liés à l'absence de biomarqueurs permettant de définir précisément l'hétérogénéité des tumeurs TN. En effet, la sélection des patientes atteintes de cancers du sein TN dans les essais cliniques est souvent réalisée sur la base du phénotype (ER-, PgR-, HER2-) qui ne suffit pas à caractériser cette hétérogénéité (Gelmon *et al.*, 2012). L'identification des facteurs moléculaires à l'origine des différents sous-groupes de cancers TN est donc cruciale pour mieux discriminer ces patientes, et ainsi leur assigner le traitement le plus adapté (Podo *et al.*, 2010 ; Metzger-Filho *et al.*, 2012 ; Xu *et al.*, 2014). Dans ce sens, l'équipe de Jennifer A. Pietsenpol a notamment identifié 6 sous-types de cancers du sein TN présentant chacun des profils d'expression génique uniques (Lehmann *et al.*, 2011).

Depuis l'approbation du trastuzumab par la FDA en 1998, le nombre de thérapies ciblées développées dans le cancer du sein ne cesse de s'accroître. La liste, non exhaustive, des composés cités précédemment permet d'avoir un aperçu des stratégies actuelles les plus prometteuses (Figure 12). Cependant, la plupart des agents ciblés ne sont actifs que dans certains types de cancers du sein et peinent encore à démontrer leur efficacité. En effet, de par la multiplicité et la diversité des altérations génétiques contribuant à leur croissance maligne, certaines tumeurs de sein sont réfractaires aux thérapies ciblées (résistance primaire ou intrinsèque ou *de novo*). En outre, même lorsqu'un début de réponse est observé, les effets des thérapies ciblées sont souvent temporaires et la grande majorité des tumeurs développe une

## INTRODUCTION

résistance (résistance secondaire ou acquise), au cours de laquelle les cellules cancéreuses vont mettre en place différentes voies d'échappement aux drogues utilisées. Les patientes finissent alors généralement par succomber à la progression de la maladie (Ellis & Hicklin, 2009). Le trastuzumab illustre bien cet état de fait. Comme nous l'avons vu précédemment, son indication pour le traitement des cancers du sein HER2+ a significativement amélioré la prise en charge des patientes. Toutefois, le bénéfice clinique de l'Herceptine® reste limitée dans la mesure où les cancers du sein HER2+ ne représentent que 15-20% des cancers du sein, et que parmi ces 15-20%, on évalue à seulement 30% les patientes répondant à ce traitement, lorsqu'il est utilisé seul en première ligne (Vogel *et al.*, 2002). De plus, près de 70% des patientes ayant initialement répondu au trastuzumab développent une résistance dans l'année suivant le début du traitement, pouvant alors conduire à des rechutes et/ou à la progression des métastases (Slamon *et al.*, 2001 ; Narayan *et al.*, 2009 ; Vu & Claret, 2012).



**Figure 12: Les principaux agents thérapeutiques ciblant les voies de signalisation des facteurs de croissance dans le cancer du sein**

Le schéma ci-dessus illustre les principales thérapies ciblées actuellement en développement clinique ou préclinique dans le cancer du sein ainsi que leurs cibles protéiques. A l'heure actuelle, seuls le trastuzumab (Herceptine®), le lapatinib (Tyverb®), le pertuzumab (Perjeta®), le T-DMI (Kadcyla®) et le bevacizumab (Avastin®) sont utilisés en clinique pour le traitement des cancers du sein métastatiques (Adapté de Normanno *et al.*, 2009 et Zardavas *et al.*, 2013).

## INTRODUCTION

A travers l'exemple de l'Herceptine<sup>®</sup>, nous allons décrire les principaux mécanismes moléculaires mis en jeu par les cellules cancéreuses de sein pour s'adapter et résister à l'inhibition de HER2 (Mohd Shariar *et al.*, 2012 ; Vu & Claret, 2012 ; Thery *et al.*, 2014).

### *b) Mécanismes de résistances aux thérapies ciblées : exemple de la résistance aux thérapies anti-HER2 dans le cancer du sein*

La compréhension des mécanismes de résistance par lesquels les cellules cancéreuses échappent au traitement par le trastuzumab passe d'abord par la connaissance des mécanismes d'action de la drogue. Bien que ces mécanismes ne soient pas complètement définis, plusieurs effets moléculaires et cellulaires ont été observés en expérimentation *in vitro* et dans des modèles *in vivo* (Nahta & Esteva, 2006 ; Valabrega *et al.*, 2007 ; Spector & Blackwell, 2009 ; Vu & Claret, 2012). L'effet le plus connu est l'inhibition des voies de signalisation sous-jacentes PI3K/Akt et MAPK, conduisant à l'arrêt de la croissance et de la prolifération cellulaire. En effet, il a été montré que le trastuzumab peut empêcher l'hétérodimérisation de HER2 avec HER3, bloquant ainsi l'activité du complexe et la signalisation sous-jacente de PI3K/Akt (Junttila *et al.*, 2009). Le trastuzumab inactive également la protéine kinase Src, augmentant ainsi la relocalisation membranaire et l'activité de PTEN, inhibiteur de la PI3K. PTEN entraîne alors une déphosphorylation de Akt et inhibe la prolifération cellulaire (Nagata *et al.*, 2004). D'autres mécanismes d'action de l'Herceptine<sup>®</sup> ont été plus ou moins décrits, tels que la dégradation de HER2 *via* l'ubiquitine ligase c-Cbl, le blocage du clivage protéolytique du récepteur, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par la modulation de la formation du complexe p27/Cdk2, l'induction de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, ou encore l'inhibition de l'angiogenèse (Klapper *et al.*, 2000 ; Lane *et al.*, 2001 ; Molina *et al.*, 2001 ; Izumi *et al.*, 2002 ; Arnould *et al.*, 2006).

Les mécanismes de résistance au trastuzumab sont multiples et peuvent être regroupés en quatre grandes catégories : les obstacles à la liaison trastuzumab/HER2, la « réactivation » de la signalisation de HER2 *via* des altérations au niveau de voies de signalisation intracellulaires, l'intervention de voies de signalisation compensatoires *via* les RTK, et l'échec du déclenchement de la réponse immunitaire à médiation cellulaire pour détruire les cellules cancéreuses de sein. (Pohlmann *et al.*, 2009 ; Vu & Claret, 2012 ; Thery *et al.*, 2014). Ainsi, il a été montré en premier lieu qu'une forte proportion de tumeurs HER2+ de mauvais pronostic exprime une forme tronquée du récepteur HER2, p95HER2, privée du domaine extracellulaire renfermant le site de liaison du trastuzumab (Saez *et al.*, 2006). Ces fragments



## INTRODUCTION

C-terminaux p95HER2 peuvent être générés *via* au moins deux mécanismes différents : le clivage protéolytique de l'ectodomaine du récepteur par la métalloprotéase ADAM10 (*A Disintegrin And Metalloprotease 10*) ou l'initiation alternative de la traduction de l'ARNm codant pour HER2 (Anido *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2006 ; Arribas *et al.*, 2011). p95HER2 possède une activité kinase constitutive qui lui permet non seulement de maintenir l'activation des cascades de signalisation oncogéniques, mais aussi de contrôler l'expression d'un ensemble de gènes non régulés par p185HER2 comme *MET*, *CD44*, *EPHA2* et *MMP1*, impliqués dans la progression métastatique (Scaltriti *et al.*, 2007 ; Pedersen *et al.*, 2009). Par conséquent, p95HER2 constitue un mécanisme d'échappement *de novo* aux effets du trastuzumab, mais pas au ciblage de son activité kinase par le lapatinib (Scaltriti *et al.*, 2010). Un autre obstacle à l'association trastuzumab/HER2 est le masquage de l'épitope de l'anticorps monoclonal sur le récepteur par la surexpression d'autres protéines membranaires à la surface des cellules cancéreuses. En effet, Nagy et ses collègues ont observé que la forte expression de la glycoprotéine MUC4 à la surface cellulaire d'une lignée cancéreuse de sein HER2+ résistante au trastuzumab, bloque l'accès de la drogue à son récepteur (Nagy *et al.*, 2005). De plus, en utilisant le même modèle préclinique, une autre équipe a montré que la molécule d'adhésion cellulaire CD44 et son ligand l'acide hyaluronique (HA) peuvent aussi entraver la liaison du trastuzumab au récepteur HER2 en masquant son épitope apparenté (Palyi-Krekk *et al.*, 2007).

La déficience de PTEN et/ou les mutations oncogéniques de *PIK3CA* contribuent également largement à la résistance à l'Herceptine® *via* la réactivation de la voie PI3K/Akt/mTOR, soulignant ainsi l'importance de la résistance modulée par l'altération de voies de signalisation intracellulaires (Nagata *et al.*, 2004 ; Berns *et al.*, 2007 ; Kataoka *et al.*, 2010 ; Razis *et al.*, 2011). Par ailleurs, la protéine Src a été identifiée comme étant un modulateur clé de la réponse au trastuzumab et constitue un « nœud » central de signalisation à de multiples voies de résistance à cet agent ciblé (Muthuswamy, 2011 ; Zhang *et al.*, 2011 ; Logue & Morrison, 2012 ; Peiro *et al.*, 2014). L'une d'entre elles concerne la phosphorylation du récepteur EphA2 (*Ephrin type-A receptor 2*), un RTK surexprimé dans les tumeurs mammaires et intervenant dans l'initiation tumorale et la progression métastatique (Zelinski *et al.*, 2001 ; Brantley-Sieders *et al.*, 2008 ; Vaught *et al.*, 2008). En effet, la transactivation d'EphA2 par Src dans les cellules tumorales de sein résistantes au trastuzumab, conduit à l'amplification des voies de signalisation PI3K/Akt et MAPK. De façon intéressante, le ciblage d'EphA2 rétablit la sensibilité des cellules au traitement (Zhuang *et al.*, 2010).

## INTRODUCTION

Un des mécanismes majeurs responsables de la résistance observée dans les tumeurs mammaires proviendrait de la surexpression de corécepteurs membranaires à la surface des cellules cancéreuses, qui seraient capables, du fait de la redondance de signalisation, d'induire les mêmes voies oncogéniques PI3K/Akt, MAPK et Src. Les corécepteurs en question sont principalement des RTK (EGFR, HER3, IGF1-R, c-Met, EphA2 et AXL) mais peuvent aussi être des molécules d'adhésion cellulaire (MAC) telles que CD44 et les intégrines  $\alpha_6\beta_{1/4}$  et  $\alpha_v\beta_6$  (Lu *et al.*, 2001 ; Moulder *et al.*, 2001 ; Wobus *et al.*, 2002 ; Shattuck *et al.*, 2008 ; Junttila *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2009a ; Wang *et al.*, 2009a ; Zhuang *et al.*, 2010 ; Moore *et al.*, 2014). Cette observation fait référence au concept de « co-activation des RTK », dans lequel les cellules cancéreuses activeraient simultanément deux ou plusieurs récepteurs afin d'établir un réseau de signalisation robuste conduisant à un maintien de leur phénotype agressif, y compris si une des voies ou un des effecteurs est affecté (Stommel *et al.*, 2007 ; Xu & Huang, 2010). En effet, ces réseaux de signalisation assurent une redondance de signalisation de par le fait que les différents RTK activés partagent des voies de signalisation similaires et/ou compensatoires, retrouvées dans de nombreux modèles de résistance aux thérapies ciblées tels que la résistance aux monothérapies anti-EGFR dans les glioblastomes, les mésothéliomes, ou encore les cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS) (Huang *et al.*, 2007 ; Ratushny *et al.*, 2009 ; Brevet *et al.*, 2011). Ce phénomène de résistance semble d'autant plus prononcé lorsque la thérapie ciblée affecte un oncogène dominant, comme en atteste le résultat d'une thérapie anti-ALK dans le cancer du poumon non à petites cellules ou d'une thérapie anti-EGFR dans le glioblastome multiforme (Pillay *et al.*, 2009 ; Voena *et al.*, 2013). Par ailleurs, les voies de signalisation compensatoires peuvent également impliquer des coopérations entre récepteurs membranaires (RTK et autres) à la surface cellulaire. Dans le cadre des résistances au trastuzumab dans le cancer du sein, une étude récente a ainsi démontré l'existence d'un complexe hétérotrimérique entre les formes actives des récepteurs HER2, HER3 et IGF1-R. Dans cette étude, l'inhibition de l'expression de HER3 ou de l'IGF1-R n'altère pas l'association entre les deux RTK restants mais restaure la sensibilité des cellules à la drogue en induisant notamment p27. Néanmoins, cette « re-sensibilisation » passe par des mécanismes différents selon le RTK co-inhibé : le ciblage de HER3 diminue l'activation d'Akt mais n'affecte pas la signalisation des MAPK ou de Src, alors que l'inhibition de l'IGF1-R réduit la phosphorylation des MAPK et de Src, tout en ayant un effet mineur sur l'activité d'Akt (Huang *et al.*, 2010). L'interaction de CD44 avec EGFR et HER2 pourrait constituer un autre mécanisme de résistance au trastuzumab (Wobus *et al.*, 2002). En effet, de nombreuses études ont mis à jour le rôle de CD44 en tant que corécepteur de RTK, y

## INTRODUCTION

compris HER2, dans la progression tumorale et métastatique de nombreux cancers (Bourguignon *et al.*, 2001 ; Orian-Rousseau, 2010 ; Bao *et al.*, 2011 ; Louderbough & Schroeder, 2011 ; Zoller, 2011 ; Perez *et al.*, 2013). De façon intéressante, il a également été rapporté que la metformine détruisait spécifiquement les cellules initiatrices de cancer du sein CD44+/CD24-, réfractaires au trastuzumab (Cufi *et al.*, 2012). Enfin, un dernier exemple concerne la coopération entre HER2 et TrkA, le récepteur de haute affinité pour le NGF. En effet, il a été montré que l'interaction de TrkA avec HER2 contribue à la croissance des cellules tumorales mammaires (Tagliabue *et al.*, 2000). De plus, notre laboratoire a mis en évidence les effets de TrkA sur la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de sein (Descamps *et al.*, 2001b ; Dolle *et al.*, 2004 ; Lagadec *et al.*, 2009 ; Demont *et al.*, 2012).

A travers les récents essais cliniques cités précédemment, il est aisé de constater que les nouveaux concepts thérapeutiques visent soit à développer de nouvelles cibles moléculaires pour le traitement des cancers du sein TN, soit à contrecarrer la résistance aux principaux agents thérapeutiques (tamoxifène, trastuzumab...) dans les cancers homono-dépendants et/ou HER2+ (Liedtke & Kiesel, 2012). Le ciblage des RTK dans les cancers du sein HER2-, en particulier TN, s'avère être une opportunité thérapeutique majeure (Anandappa & Turner, 2013). Toutefois, les nouvelles stratégies thérapeutiques doivent aussi prendre en compte les réseaux de signalisation compensatoires potentiels, impliquant notamment les coopérations entre récepteurs membranaires (RTK et autres), afin de mettre en place des combinaisons de traitement efficaces. L'identification et la compréhension des coopérations membranaires entre les récepteurs tyrosine kinase et les voies de signalisation associées sont donc un enjeu majeur et doivent amener à définir des thérapies plus efficaces dans le traitement du cancer du sein (Ellis & Hicklin, 2009 ; Groenendijk & Bernards, 2014).

## II. Le (pro)NGF et ses récepteurs

### A) Le NGF et son précurseur

Le NGF est le membre prototypique des neurotrophines, une famille de protéines jouant un rôle crucial dans la survie et la différenciation des neurones du système nerveux central et périphérique au cours du développement (Huang & Reichardt, 2001).

#### 1. Découverte des neurotrophines

La découverte du NGF remonte au début des années 50, lorsque Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger et Stanley Cohen observèrent que la transplantation d'un sarcome de souris dans un embryon de poulet conduisait à l'innervation de la tumeur. Rita Levi-Montalcini émit alors l'hypothèse de l'existence d'un agent diffusible, libéré par la tumeur et capable de stimuler la croissance et la différenciation des cellules nerveuses (Levi-Montalcini & Hamburger, 1951 ; Aloe, 2011). Elle nomma cette substance « *Nerve Growth Factor* ». Par la suite, le NGF fut isolé en 1954, séquencé en 1971 et valut, en 1986, le prix Nobel de physiologie ou médecine à Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen pour la découverte du premier facteur de croissance (Cohen *et al.*, 1954 ; Angeletti & Bradshaw, 1971 ; Weltman, 1987). Il a fallu ensuite attendre 1982 pour que le deuxième facteur neurotrophique, le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), soit découvert et purifié à partir de tissu issu du cerveau de cochon (Barde *et al.*, 1982). Feront suite les découvertes de la NT-3 (*Neurotrophin-3*), identifiée par plusieurs équipes en 1990 grâce à l'étude des homologies de la structure primaire entre le NGF et le BDNF (Hohn *et al.*, 1990 ; Jones & Reichardt, 1990 ; Maisonpierre *et al.*, 1990 ; Rosenthal *et al.*, 1990), et de la NT-4/5 (*Neurotrophin-4/5*), découverte chez le xénope, le rat et l'Homme (Berkemeier *et al.*, 1991 ; Hallbook *et al.*, 1991 ; Ip *et al.*, 1992).

#### 2. Structure du (pro)NGF : du gène aux protéines

Selon l'arbre phylogénétique établi par Finn Hallböök en 1999, les gènes des neurotrophines sont très conservés au cours de l'évolution et ont été générés à partir de deux duplications successives d'un gène ancestral (Hallbook, 1999 ; Lanave *et al.*, 2007). Chez l'Homme, les gènes codant les neurotrophines NGF, BDNF, NT-3 et NT-4/5 sont localisés respectivement sur les chromosomes 1, 11, 12 et 19. Leurs traductions, à partir d'un seul exon codant, aboutissent à des précurseurs protéiques de tailles voisines présentant une forte homologie de séquence (Tableau 7).

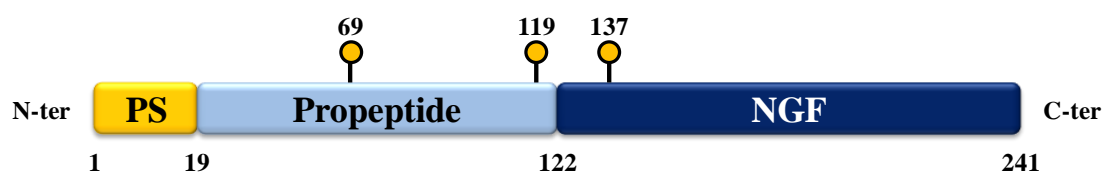
## INTRODUCTION

**Tableau 7 : Caractéristiques des neurotrophines humaines**

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

### a) Le produit du gène NGF

Le NGF est initialement synthétisé sous la forme d'un précurseur protéique ou préproneurotrophine (Shooter, 2001) (Figure 13). Deux transcrits majeurs ont été identifiés et peuvent conduire, par épissage alternatif, à deux formes de préproNGF de 27 et 34 kDa (Fahnestock *et al.*, 2004a). Quel que soit le préproNGF immature produit, celui-ci est acheminé et séquestré au niveau du réticulum endoplasmique, où débute un processus de maturation post-traductionnelle. L'élimination du peptide signal aboutit alors dans un premier temps à une molécule de proNGF de 25 ou 32 kDa. Ce dernier subit ensuite un clivage protéolytique au niveau de résidus d'acides aminés dibasiques par des protéases intracellulaires telles que la furine ou des proconvertases (Bresnahan *et al.*, 1990 ; Seidah *et al.*, 1996 ; Mouri *et al.*, 2007) ou, après sécrétion, par des protéases extracellulaires comme la plasmine et la métalloprotéase MMP-7 (Lee *et al.*, 2001 ; Bruno & Cuello, 2006 ; Le & Friedman, 2012), pour générer une forme C-terminale mature de 13,2 kDa, le NGF.



**Figure 13 : Représentation schématique de la protéine (pro)NGF**

*Le gène du NGF code une préproneurotrophine contenant un peptide signal (PS, jaune), un propeptide (bleu clair), et la protéine mature (bleu foncé). Les motifs ☺ représentent les sites potentiels de N-glycosylation.*

Les deux N-glycosylations situées au niveau du propeptide interviendraient dans la régulation du trafic intracellulaire et de la sécrétion du NGF, *via* des mécanismes encore méconnus (Suter *et al.*, 1991 ; Lessmann *et al.*, 2003).

## INTRODUCTION

### *b) Le proNGF : plus qu'un simple précurseur protéique*

Le proNGF a longtemps été considéré comme une simple forme intermédiaire dans la synthèse du NGF mature, sans activité biologique, et il a fallu attendre le début des années 2000 pour qu'il devienne une réalité physiologique. En effet, Lee et ses collaborateurs montrèrent que le proNGF pouvait être sécrété et avoir une action pro-apoptotique sur les neurones, là où le NGF induisait la survie et la différenciation cellulaires (Lee *et al.*, 2001). Par la suite, plusieurs équipes ont reporté une sécrétion *in vitro* du proNGF par de nombreuses populations cellulaires neuronales comme les neurones corticaux (Bruno & Cuello, 2006), les neurones sympathiques (Hasan *et al.*, 2003), les cellules microgliales (Srinivasan *et al.*, 2004) et les astrocytes (Domeniconi *et al.*, 2007). *In vivo*, le proNGF serait la forme majoritaire des produits du gène *NGF* dans les neurones sympathiques et sensoriels ainsi que dans la plupart de leurs tissus cibles périphériques (Bierl *et al.*, 2005). D'un point de vue physiopathologique, le proNGF semble également avoir un rôle biologique dans plusieurs maladies neurodégénératives humaines telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Fahnestock *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2008), l'encéphalomyélopathie spongiforme (Stoica *et al.*, 2008), le syndrome de Down (Iulita *et al.*, 2014) et la maladie de Pick (Belrose *et al.*, 2014), où son expression est augmentée. Dans ces différents troubles neuronaux, le proNGF serait responsable de la mort neuronale *via* l'induction de voies pro-apoptotiques alors que le NGF assurerait un rôle neurotrophique, comme tendent à le montrer les nombreuses expériences *in vivo* réalisées sur des modèles murins présentant une lésion du système nerveux (Beattie *et al.*, 2002 ; Harrington *et al.*, 2004 ; Volosin *et al.*, 2006 ; Volosin *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010).

Les réponses biologiques adverses générées par le NGF et le proNGF ont fait l'objet de plusieurs investigations. Ainsi, des signatures transcriptionnelles complètement distinctes, entre la forme mature du NGF et son précurseur, ont été caractérisées dans les cellules de phéochromocytome de rat PC12 (D'Onofrio *et al.*, 2011). De plus, le proNGF induit la mort neuronale malgré la stimulation trophique du NGF, ce qui suggère que l'effet de la proneurotrophine peut éventuellement dépasser celui de la neurotrophine (Sobottka *et al.*, 2008). Toutefois, le proNGF pourrait également promouvoir la survie cellulaire mais à un degré moindre que le NGF (Clewes *et al.*, 2008 ; Sobottka *et al.*, 2008 ; Armugam *et al.*, 2012). Récemment, il a été suggéré que la disponibilité relative *in vivo* du NGF et de son précurseur serait déterminante dans l'activité biologique de ces ligands (Arisi *et al.*, 2014). De même, l'expression relative des récepteurs du (pro)NGF pourrait être à la base de l'activité

## INTRODUCTION

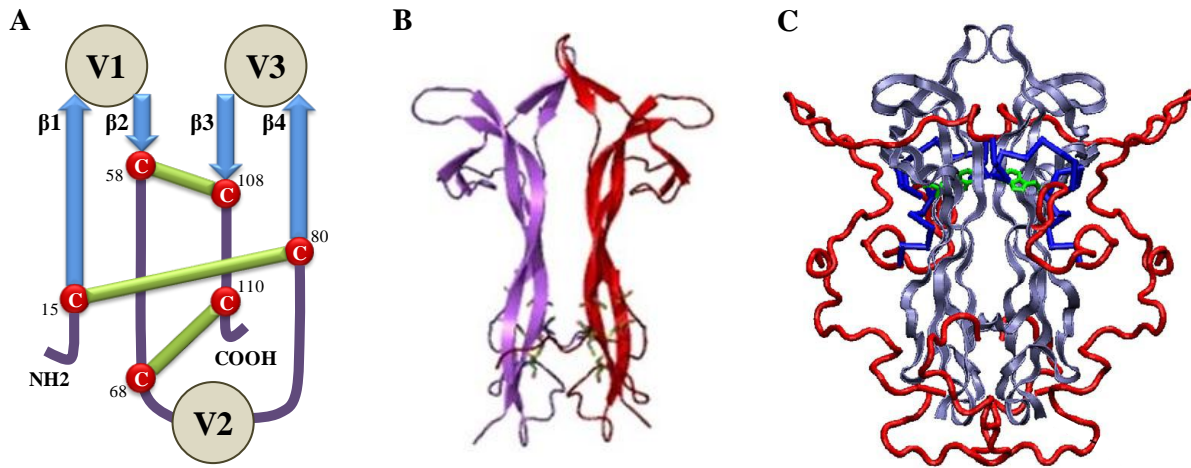
pro-neurotrophique ou pro-apoptotique du proNGF (Masoudi *et al.*, 2009 ; Capsoni *et al.*, 2010). En outre, une étude plus récente a démontré que les différentes réponses biologiques observées entre la forme mature et la proforme du (pro)NGF dépendraient des rapports stœchiométriques dynamiques entre les ligands et leurs récepteurs, entraînant des changements conformationnels distincts (Pimenta *et al.*, 2014).

De façon intéressante, les effets du proNGF ne se limitent pas aux tissus neuronaux puisque cette proneurotrophine induit également l'apoptose des cellules NK et des cellules musculaires lisses, et favorise la migration des cellules de mélanome (Truzzi *et al.*, 2008 ; Rogers *et al.*, 2010 ; Campagnolo *et al.*, 2014). En outre, notre laboratoire a récemment mis en évidence que le proNGF est sécrété de manière autocrine par les cellules cancéreuses de sein, afin de stimuler leurs capacités migratoires et invasives (Demont *et al.*, 2012).

### *c) Conformation active du (pro)NGF*

A pH physiologique, le NGF mature s'homodimérise de façon non covalente en complexe d'environ 26 kDa pour former la sous-unité  $\beta$ -NGF portant l'activité biologique du facteur de croissance (Bradshaw *et al.*, 1994). Chaque monomère de NGF est constitué d'une chaîne de 118-120 acides aminés comportant 4 feuillets  $\beta$  arrangés de façon anti-parallèle ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ), 3 boucles variables en épingle à cheveux (V1-V3), et 6 cystéines conservées. Ces dernières forment 3 ponts disulfures et constituent un nœud de cystéines (en anglais, « *cystine knot* ») permettant de rigidifier la structure (Figure 14A) (McDonald *et al.*, 1991 ; Wiesmann & de Vos, 2001). La figure 14B représente l'homodimère  $\beta$ -NGF où deux protomères parallèles sont orientés en tête à tête. De façon intéressante, des études *in vitro* ont montré que le propeptide se comporte comme une chaperonne intramoléculaire jouant un rôle essentiel dans la conformation du NGF, par la mise en place des ponts disulfures (Rattenholl *et al.*, 2001a ; Rattenholl *et al.*, 2001b). En outre, le propeptide seul, isolé du NGF, se présente sous la forme de monomère plus lâche et moins stable qu'en étant couplé à la forme mature du proNGF, suggérant ainsi que les deux entités se stabilisent mutuellement par une interaction intramoléculaire (Kliemann *et al.*, 2004). Cette interaction met en jeu les résidus W<sup>19</sup> et A<sup>40</sup> du propeptide et le tryptophane en position 21 du NGF (soit en position 142 du proNGF) (Figure 14C) (Kliemann *et al.*, 2007 ; Paoletti *et al.*, 2009 ; Paoletti *et al.*, 2011).

## INTRODUCTION



**Figure 14 : Structure du NGF et du proNGF**

**A)** Monomère de NGF composé de 3 boucles variables (V1-V3, en marron), 4 feuillettes  $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 4, en bleu) et de 6 cystéines conservées (en rouge) établissant 3 ponts disulfures (en vert). **B)** Dimère de NGF constitué de 2 protomères (un violet et un rouge) orientés en miroir. **C)** Dimère de proNGF avec au centre, le dimère des parties matures (en gris), et en périphérie, les propeptides de chaque monomère de proNGF (en rouge). L'interface d'interaction entre le propeptide (en bleu foncé) et la partie mature (en vert) assure la bonne mise en conformation du proNGF et inhibe sa liaison au récepteur TrkA (adapté de Kliemannel *et al.*, 2004 ; Paoletti *et al.*, 2011).

Le proNGF et le NGF présentent donc des organisations tridimensionnelles distinctes et dynamiques leur permettant de moduler leurs affinités vis-à-vis des récepteurs TrkA, p75<sup>NTR</sup> (p75 Neurotrophin Receptor) et sortiline (Pimenta *et al.*, 2014). Aussi, le résidu W<sup>21</sup> du NGF, décrit initialement comme étant impliqué dans l'interaction avec TrkA, est masqué par le propeptide, ce qui expliquerait la faible affinité du proNGF pour ce récepteur, ainsi que la faible activité pro-neurotrophique de ce précurseur biologique (Kliemannel *et al.*, 2007). Par ailleurs, Nykjaer et ses collaborateurs ont montré que le proNGF se lie simultanément à p75<sup>NTR</sup> par sa partie mature et à la sortiline par son propeptide (Nykjaer *et al.*, 2004). De façon intéressante, le proNGF se fixe sur p75<sup>NTR</sup> avec une meilleure affinité que le NGF. Une hypothèse suggère que le propeptide entraînerait une modification structurale de la partie mature, accroissant ainsi l'affinité du proNGF pour ce récepteur.

### **B) Les récepteurs du (pro)NGF**

Le NGF et le proNGF exercent leurs effets biologiques *via* trois types de récepteurs membranaires : le récepteur à activité tyrosine kinase, TrkA ; un récepteur de la famille des récepteurs au TNF (TNFR), p75<sup>NTR</sup> ; et un récepteur transmembranaire à domaine Vps10p (*Vacuolar protein sorting 10 protein*), la sortiline.



# INTRODUCTION

## 1. La sortiline

La sortiline est le récepteur commun à toutes les proneurotrophines, y compris le proNGF.

### a) *Découverte*

A la fin des années 90, trois équipes de recherche travaillant sur des sujets complètement différents, ont identifié trois protéines auxquelles ont été attribués les noms suivants : sortiline, NTR3 (*Neurotensin receptor 3*) et GP110 (*Glycoprotein 110*). Par la suite, il s'est avéré qu'il s'agissait en réalité de la même protéine (Lin *et al.*, 1997 ; Petersen *et al.*, 1997 ; Mazella *et al.*, 1998).

### b) *Structure : du gène à la protéine*

Le gène de la sortiline (*SORT1*) contient 20 exons qui s'étendent sur 50 kb du chromosome 1, en région p13.1-p21.3 (Tableau 8). Son transcrit a été identifié dans de nombreux tissus humains de façon quasi-ubiquitaire (Petersen *et al.*, 1997 ; Mazella, 2001).

Tableau 8 : Caractéristiques de la sortiline humaine

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	832	Q99523

Après clivage de son peptide signal (33 aa), la sortiline se présente sous la forme d'un pro-récepteur contenant un propeptide (44 aa) à son extrémité N-terminale. Ce propeptide est ensuite éliminé *via* un clivage protéolytique, opéré par la furine, dans les compartiments tardifs de l'appareil de Golgi, conférant à la sortiline la capacité de lier ses ligands. La libération de ce propeptide aboutit alors à une protéine mature N-glycosylée de type I (755 acides aminés) possédant une longue portion N-terminale (681 aa), un seul segment transmembranaire (21 aa), et une courte queue cytosolique (53 aa) (Figure 15) (Munck Petersen *et al.*, 1999).

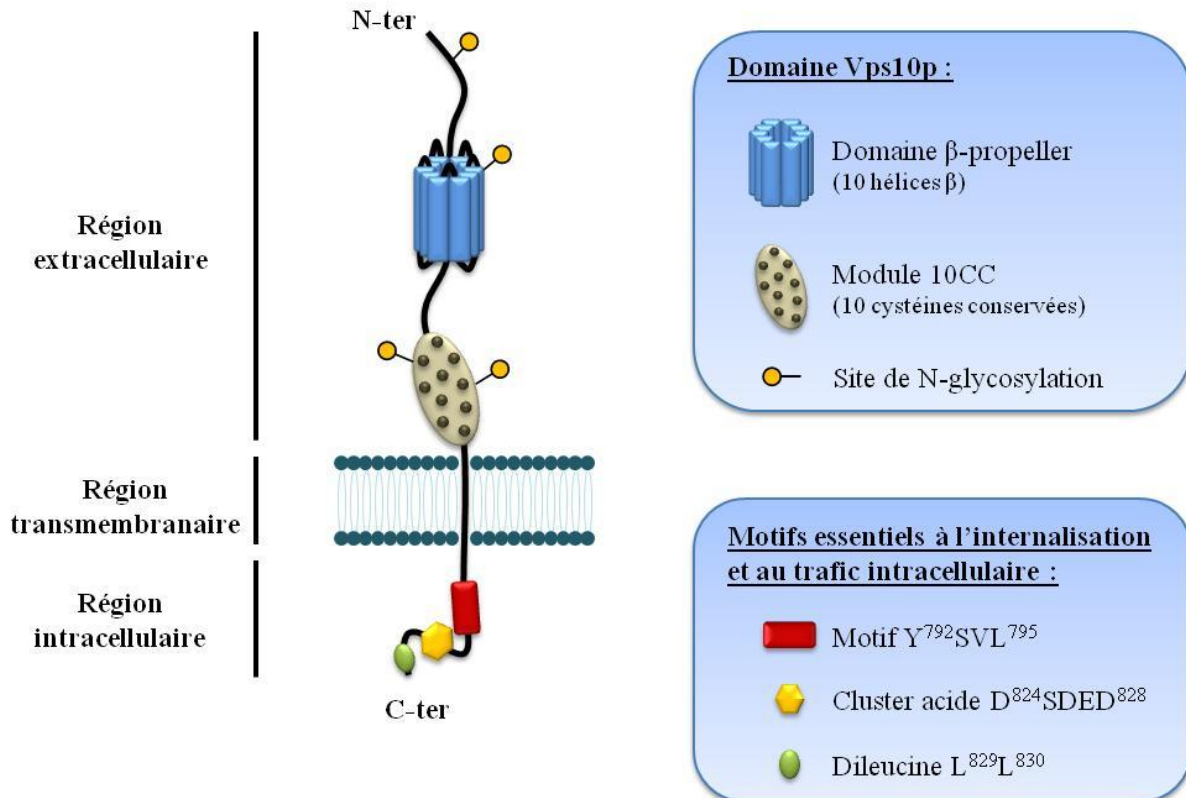
Au niveau de la région extracellulaire, la sortiline contient un module d'environ 700 acides aminés : le **domaine Vps10p**. Ce module renferme le **domaine  $\beta$ -propeller** constitué de 10 hélices  $\beta$ , et un **module 10CC** (C<sup>612</sup>-C<sup>740</sup>), dans lequel 10 cystéines conservées établissent des jonctions intramoléculaires *via* 5 ponts disulfures (Westergaard *et al.*, 2004). Deux études

## INTRODUCTION

successives ont proposé que l'interaction de la sortiline avec ses ligands passe soit par le module 10CC, soit par le domaine  $\beta$ -propeller (Westergaard *et al.*, 2004 ; Paiardini & Caputo, 2008). Toutefois, les travaux d'une autre équipe ont conforté la seconde hypothèse en montrant que la neurotensine, l'un des ligands de la sortiline, lie le récepteur en rentrant à l'intérieur du domaine  $\beta$ -propeller. Les sites d'interaction au sein de ce domaine ne seraient néanmoins pas partagés entre tous les ligands de la sortiline. En outre, la capacité de ces ligands à entrer en compétition les uns avec les autres serait due à la place restreinte à l'intérieur du  $\beta$ -propeller plutôt qu'à un même site de fixation (Quistgaard *et al.*, 2009). Par ailleurs, une autre étude a révélé l'existence d'un épitope linéaire intervenant dans la liaison des proneurotrophines (Serup Andersen *et al.*, 2010).

Dans sa partie cytosolique, la sortiline possède des motifs similaires à ceux retrouvés dans la queue cytoplasmique du récepteur M6P (*Mannose 6-phosphate*). Il s'agit de 3 séquences caractéristiques : le **motif Y<sup>792</sup>SVL<sup>795</sup>** impliqué dans l'endocytose du récepteur, un **cluster acide D<sup>824</sup>SDED<sup>828</sup>** potentiellement phosphorylable par la CKII (*Casein kinase II*) et une **dileucine L<sup>829</sup>L<sup>830</sup>**, intervenant à la fois dans l'internalisation du récepteur et dans le trafic intracellulaire de protéines cytoplasmiques (Petersen *et al.*, 1997 ; Nielsen *et al.*, 2001).

## INTRODUCTION



**Figure 15 : Représentation schématique de la sortiline**

La sortiline est une glycoprotéine de type I dont le domaine Vps10p constitue la quasi-totalité de sa région extracellulaire. Ce module est essentiel à la liaison des ligands. Il est composé d'un domaine  $\beta$ -propeller formé de 10 hélices  $\beta$ , et d'un module 10CC où 10 cystéines conservées établissent 5 ponts disulfures. La partie cytoplasmique est très courte et comprend 3 motifs impliqués dans son internalisation et son trafic intracellulaire : un motif Y<sup>792</sup>SVL<sup>795</sup>, un cluster acide phosphorylable D<sup>824</sup>SDED<sup>828</sup> et la dileucine L<sup>829</sup>L<sup>830</sup>.

La sortiline joue un rôle essentiel dans le trafic intracellulaire de nombreuses protéines, en assurant leur transport entre l'appareil de Golgi, les endosomes et les lysosomes (Marcusson *et al.*, 1994 ; Hermey, 2009). La sortiline est donc en grande partie localisée au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi mais environ 10% de la protéine est également exprimé à la membrane plasmique, notamment au niveau de microdomaines riches en cholestérol, les radeaux lipidiques (Nielsen *et al.*, 2001 ; Canuel *et al.*, 2009).

Au cours de ces dernières années, un nouveau rôle a été attribué à la sortiline ; celle-ci contribue à la régulation de la viabilité et des fonctions neuronales (Nykjaer & Willnow, 2012). En effet, une fois exposée à la surface cellulaire, la sortiline peut former un complexe ternaire avec p75<sup>NTR</sup> et le proNGF, afin d'induire l'apoptose dans les cellules neuronales (Nykjaer *et al.*, 2004). L'expression de la sortiline à la membrane est sous le contrôle de la protéine NRH2 (*Neurotrophin Receptor Homolog-2*) qui, en interagissant avec les domaines cytoplasmiques du récepteur, empêche sa dégradation par les lysosomes et contribue donc au

## INTRODUCTION

maintien de la signalisation des proneurotrophines (Kim & Hempstead, 2009). Un niveau de complexité supplémentaire a été identifié dans la signalisation de la sortiline puisqu'elle agit également en tant que corécepteur de nombreuses protéines, comme les RTK. Par exemple, la sortiline peut interagir avec le récepteur TrkA pour assurer son transport antérograde et son adressage à la surface cellulaire, et ainsi stimuler la survie et la différenciation neuronale (Vaegter *et al.*, 2011).

### **2. Le récepteur p75<sup>NTR</sup>**

p75<sup>NTR</sup> est le récepteur commun à toutes les proneurotrophines et neurotrophines (Tomellini *et al.*, 2014).

#### *a) Découverte*

Le récepteur p75<sup>NTR</sup> fut identifiée en 1973 en tant que récepteur du NGF, ce qui lui valut le premier nom de NGFR (*NGF Receptor*) (Herrup & Shooter, 1973). Puis, suite à son clonage en 1986, des expériences de transfection ont révélé une faible affinité du NGF vis-à-vis de ce récepteur ( $K_d = 10^{-9}$  M) ; le NGFR fut alors renommé LNGFR (*Low affinity NGFR*) (Chao *et al.*, 1986 ; Johnson *et al.*, 1986 ; Radeke *et al.*, 1987). Enfin, au début des années 90, il a été mis en évidence que le LNGFR était capable de lier chacun des autres membres de la famille des neurotrophines (BDNF, NT-3, NT-4/5) avec la même affinité, dans la plupart des types cellulaires ; d'où le nom de p75<sup>NTR</sup> (*p75 Neurotrophin Receptor*) (Rodriguez-Tebar *et al.*, 1990 ; Rodriguez-Tebar *et al.*, 1992).

#### *b) Structure : du gène à la protéine*

Le gène *NGFR* humain codant le récepteur p75<sup>NTR</sup> contient 6 exons qui couvrent environ 23 kb de la région chromosomique 17q21-q22. Ce gène est transcrit en un ARNm de 3,4 kb ; ce dernier qui est traduit en une protéine de 427 acides aminés (Tableau 9).

**Tableau 9 : Caractéristiques du récepteur p75<sup>NTR</sup> humain**

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

## INTRODUCTION

L'élimination du peptide signal conduit alors à un récepteur transmembranaire de type I, composé de 399 acides aminés répartis sur trois domaines extracellulaire (222 aa), transmembranaire (19 aa) et intracellulaire (ou cytoplasmique) (158 aa) (Figure 16) (Roux & Barker, 2002).

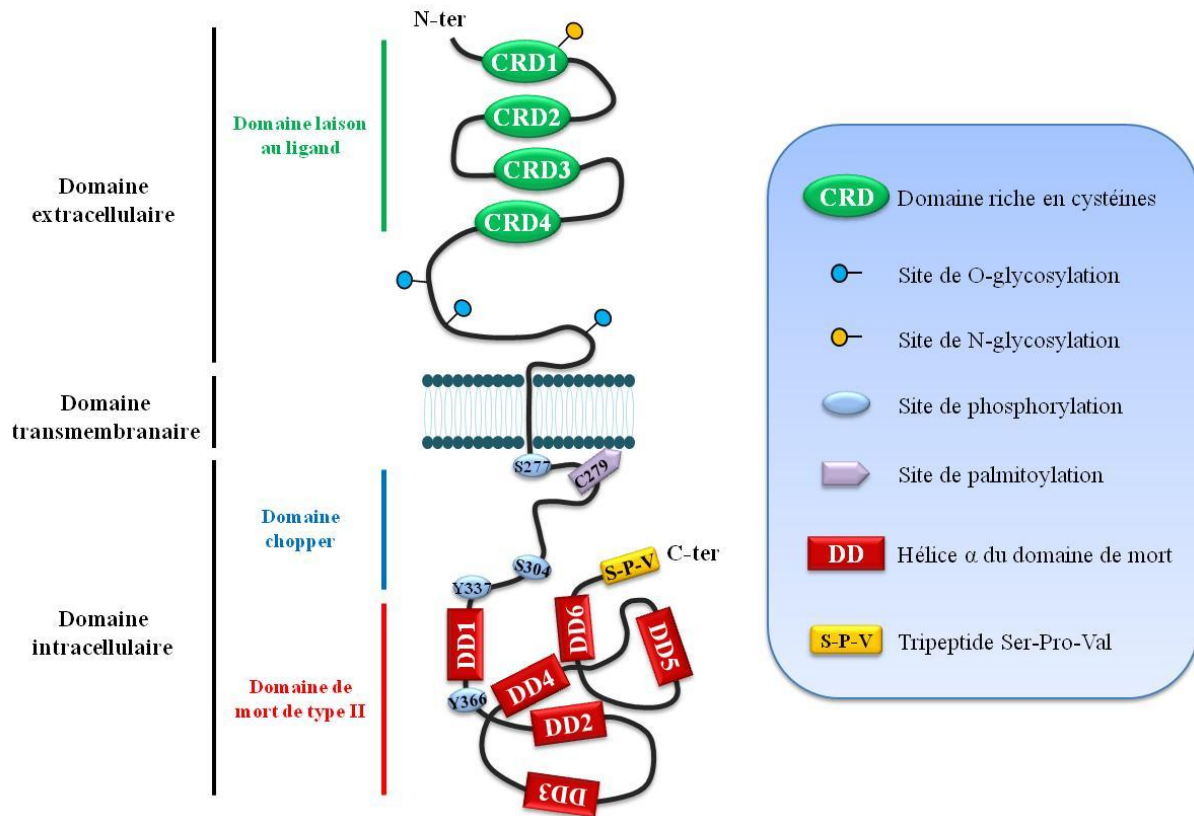
Le récepteur p75<sup>NTR</sup> appartient à la superfamille des récepteurs au TNF (Aggarwal, 2003). Dans son domaine extracellulaire, il possède 4 domaines riches en cystéines, les CRD (*Cystein-Rich Domain*), contenant chacun 3 ponts disulfures impliqués dans la mise en conformation du récepteur et dans la liaison aux ligands (Yan & Chao, 1991 ; Barker, 2007 ; Barker, 2009). La protéine p75<sup>NTR</sup> présente également un site de N-glycosylation et plusieurs sites de O-glycosylation, localisés respectivement en N-terminal et au niveau du domaine juxtamembranaire, qui interviendraient à la fois dans l'adressage du récepteur à la membrane et dans la l'interaction avec ses ligands (Large *et al.*, 1989 ; Breuza *et al.*, 2002 ; Gong *et al.*, 2008).

Le domaine transmembranaire de p75<sup>NTR</sup> se compose d'une seule hélice de 19 acides aminés dans laquelle le résidu C<sup>257</sup>, hautement conservé entre les espèces, joue un rôle crucial dans la dimérisation du récepteur, le changement conformationnel induit par la liaison du ligand et dans la transduction du signal (Vilar *et al.*, 2009).

Contrairement aux RTK, p75<sup>NTR</sup> ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque dans son domaine cytoplasmique. Sa signalisation intracellulaire nécessite donc le recrutement de protéines adaptatrices cytoplasmiques qui interagissent avec différentes régions du récepteur (Roux & Barker, 2002 ; Tomellini *et al.*, 2014). L'une de ces régions est le **domaine de mort (DD, Death Domain)**, qui consiste en une structure globulaire d'environ 80 acides aminés comportant 6 hélices  $\alpha$ . Le DD de p75<sup>NTR</sup> est de type II, ce qui lui confère des propriétés de multimérisation différentes du DD des autres membres de la superfamille des récepteurs au TNF, comme celui de Fas qui est de type I. Cette différence, principalement liée à un réarrangement de l'hélice 1 dans le DD de p75<sup>NTR</sup> (Liepinsh *et al.*, 1997), entraîne d'importantes conséquences physiologiques puisqu'elle permet le recrutement d'adaptateurs spécifiques (Wang *et al.*, 2001). Un autre domaine localisé dans la partie juxtamembranaire intracellulaire de p75<sup>NTR</sup>, joue également un rôle prépondérant dans la signalisation pro-apoptotique du récepteur. En effet, il a été démontré que ce domaine de 29 acides aminés, appelé **domaine chopper**, est suffisant et nécessaire pour induire la mort neuronale. De façon intéressante, le domaine chopper n'est pas conservé au sein des membres de la famille du TNFR (Coulson *et al.*, 2000 ; Coulson *et al.*, 2004). A son extrémité C-terminale, p75<sup>NTR</sup>

## INTRODUCTION

contient une séquence consensus de liaison aux protéines à domaines PDZ (*Postsynaptic Disc-large Zona*) : le **tripeptide Sérine-Proline-Valine (SPV)**. Ces protéines participent à la mise en place de complexes protéiques servant de plateforme de signalisation. Elles joueraient également un rôle dans la localisation cellulaire en interagissant directement avec les lipides membranaires (Sheng & Sala, 2001 ; Gallardo *et al.*, 2010).



**Figure 16 : Représentation schématique du récepteur p75<sup>NTR</sup>**

Le récepteur p75<sup>NTR</sup> est composé d'un domaine extracellulaire contenant 4 régions riches en cystéines (CRD 1-4) impliquées dans la liaison du ligand, d'un domaine transmembranaire unique avec une cystéine conservée intervenant dans la dimérisation du récepteur et d'un domaine intracellulaire comprenant un domaine Chopper juxtamembranaire, un domaine de mort constitué de 6 hélices α et un tripeptide S-P-V en C-terminal permettant la liaison de protéines à domaines PDZ. Ce récepteur présente également plusieurs modifications post-traductionnelles comme des N- et O-glycosylations, une palmitoylation assurant l'ancrage à la membrane, ainsi que plusieurs phosphorylations impliquées dans le recrutement de partenaires protéiques et dans la transduction du signal (Adapté de Roux & Barker, 2002).

Plusieurs modifications post-traductionnelles sont également présentes dans le domaine intracellulaire de p75<sup>NTR</sup>. Une palmitoylation a notamment été reportée sur la cystéine juxtamembranaire C<sup>279</sup>, laquelle régule le clivage du récepteur par la  $\gamma$ -sécrétase (Barker *et al.*, 1994 ; Underwood *et al.*, 2008). En outre, il a été montré qu'après fixation du NGF, p75<sup>NTR</sup> pouvait être sujet à 2 phosphorylations dans son domaine de mort, au niveau des résidus tyrosine Y<sup>336</sup> et Y<sup>368</sup>, conduisant alors à l'activation/inactivation des GTPases Ras et

## INTRODUCTION

RhoA, associées toutes les deux à la croissance des neurites (Blochl *et al.*, 2004 ; Blochl & Blochl, 2007). La phosphorylation de la tyrosine Y<sup>336</sup> est également impliquée dans la fixation d'une E3 ubiquitine ligase c-Cbl qui favorise l'ubiquitination de p75<sup>NTR</sup> (Ohrt *et al.*, 2004). Enfin, deux autres sites de phosphorylation ont été identifiés en dehors du domaine de mort du récepteur, sur les résidus sérine S<sup>304</sup> et S<sup>277</sup>. Alors que le premier résidu, phosphorylé par la PKA (*c-AMP-dependent Protein Kinase A*) interviendrait dans la relocalisation de p75<sup>NTR</sup> dans les radeaux lipidiques (Higuchi *et al.*, 2003), le second serait phosphorylé par la PKC (*Protein Kinase C*) et permettrait de réguler la durée du signal du complexe ligand/p75<sup>NTR</sup>, après son transport rétrograde dans les neurones (Butowt & von Bartheld, 2009).

### c) *Les différentes formes de p75<sup>NTR</sup>*

Le récepteur p75<sup>NTR</sup> peut se présenter sous différentes formes tronquées dans la cellule. Celles-ci résultent soit d'un épissage alternatif de l'ARNm, soit d'une protéolyse.

#### ✓ Epissage alternatif

Le gène *NGFR* peut, *via* l'élimination de l'exon 3 par épissage alternatif, générer une isoforme dépourvue des CRD 2, 3 et 4 de son ectodomaine, qui est alors incapable de fixer les neurotrophines (Dechant & Barde, 1997). La fonction biologique de cette isoforme tronquée demeure inconnue à ce jour, bien que des expériences *in vivo* aient montré des malformations du système nerveux plus importantes dans des souris KO pour les deux isoformes de p75<sup>NTR</sup> par rapport aux souris KO pour la forme complète du récepteur (von Schack *et al.*, 2001).

#### ✓ Protéolyse de p75<sup>NTR</sup>

Le récepteur p75<sup>NTR</sup> est la cible d'une protéolyse de type RIP (*Regulated Intramembrane Proteolysis*), qui consiste en deux clivages séquentiels successifs (Brown *et al.*, 2000 ; Skeldal *et al.*, 2011). Le premier clivage est opéré dans la partie extracellulaire juxtamembranaire de p75<sup>NTR</sup> par la métalloprotéase ADAM17/TACE (*A Disintegrin And Metalloprotease 17/TNF $\alpha$  Converting Enzyme*), une enzyme protéolytique de la famille des  $\alpha$ -sécrétases, et entraîne la libération d'un fragment soluble : p75<sup>NTR</sup>-ECD (*ExtraCellular Domain*). Ce fragment comporte les 4 domaines CRD de l'ectodomaine et conserve donc sa capacité de liaison aux ligands de p75<sup>NTR</sup>. Des expériences de mutagénèse dirigée et de spectrométrie de masse ont révélé deux sites potentiels de clivage par les  $\alpha$ -sécrétases dans la séquence de p75<sup>NTR</sup> ; ils seraient localisés 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). En plus de libérer

## INTRODUCTION

l'ectodomaine ECD, ce premier clivage produit également un second fragment, **p75<sup>NTR</sup>-CTF** (*C-Terminal Fragment*), qui reste quant à lui associé à la membrane plasmique par les domaines transmembranaire et intracellulaire du récepteur. Le fragment p75<sup>NTR</sup>-CTF constitue un pré-requis pour la réalisation d'un second clivage par un complexe protéique  $\gamma$ -sécrétase intracellulaire, dont fait notamment partie la préséniline-1 (*presenilin-dependent  $\gamma$ -secretase*) (Zampieri *et al.*, 2005). Ce second clivage est opéré dans la partie transmembranaire de p75<sup>NTR</sup>-CTF et permet de générer le fragment intracellulaire **p75<sup>NTR</sup>-ICD** (*IntraCellular Domain*). Le site de clivage menant à p75<sup>NTR</sup>-ICD a été identifié par spectrométrie de masse et se situe entre les résidus **V<sup>263</sup>** et **V<sup>264</sup>** (Jung *et al.*, 2003). De plus, la cystéine **C<sup>257</sup>** et les résidus **A<sup>262</sup>** et **G<sup>266</sup>** du motif de dimérisation **AXXXG** seraient requis pour le clivage par la  $\gamma$ -sécrétase, suggérant ainsi que la structure de l'hélice transmembranaire de p75<sup>NTR</sup> est également un élément clé dans la seconde étape de la protéolyse du récepteur (Sykes *et al.*, 2012). Par ailleurs, la génération du fragment p75<sup>NTR</sup>-ICD semble nécessiter l'association entre la préséniline-1 et l'E3 ubiquitine ligase TRAF6 (*TNF Receptor-Associated Factor 6*) (Powell *et al.*, 2009).

Le rôle de ces fragments a été très peu étudié et n'est pas encore bien défini. Ainsi, bien que p75<sup>NTR</sup>-CTF ait longtemps été décrit comme une simple forme transitoire à la protéolyse du récepteur, sans activité biologique propre, une équipe a mis en évidence que ce fragment induit la mort neuronale, suite à sa relocalisation dans les radeaux lipidiques *via* la palmitoylation de la **cystéine 279** (Underwood *et al.*, 2008). En outre, de récents travaux réalisés au sein de notre laboratoire ont montré que ce même fragment est impliqué dans la survie des cellules cancéreuses de sein, alors que p75<sup>NTR</sup>-ICD ne semble pas avoir d'effet (Verbeke *et al.*, 2013). Pour autant, plusieurs études ont reporté une translocation nucléaire de p75<sup>NTR</sup>-ICD, suggérant que ce fragment ait une activité transcriptionnelle (Kanning *et al.*, 2003 ; Frade, 2005 ; Podlesniy *et al.*, 2006). Dans ce sens, le gène codant la cycline E1 a été identifié comme étant la cible du fragment p75<sup>NTR</sup>-ICD qui, en réponse au NGF, interagit avec son promoteur et réprime sa transcription (Parkhurst *et al.*, 2010). Par ailleurs, p75<sup>NTR</sup>-ICD est impliqué dans la mort ou la survie des neurones, l'invasion des cellules de gliomes, et dans la prolifération des cellules initiatrices de tumeur cérébrale (Underwood *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2008 ; Kommaddi *et al.*, 2011 ; Forsyth *et al.*, 2014).

Ainsi, la protéolyse du récepteur p75<sup>NTR</sup> fait partie intégrante de sa signalisation et est donc un mécanisme finement régulé. De façon intéressante, il a été reporté que l'activation du récepteur TrkA induite par le NGF augmente le clivage de p75<sup>NTR</sup> (Kanning *et al.*, 2003 ;



## INTRODUCTION

Urta *et al.*, 2007). Par exemple, dans les cellules PC12, le NGF contribuerait, en activant TrkA, au clivage de p75<sup>NTR</sup> par ADAM17, et à la relocalisation du fragment p75<sup>NTR</sup>-CTF dans les endosomes précoces, afin qu'il y soit clivé par le complexe protéique  $\gamma$ -sécrétase (Urta *et al.*, 2007). De plus, la protéolyse de p75<sup>NTR</sup> par l'axe NGF/TrkA aurait recours à la voie des MAPK qui, en favorisant la génération de p75<sup>NTR</sup>-ICD, activerait indirectement la voie Akt et provoquerait l'arrêt du cycle cellulaire (Ceni *et al.*, 2010). Par la suite, la même équipe confirme qu'une cascade de signalisation impliquant MEK1 est activée par TrkA, et participe au clivage du récepteur p75<sup>NTR</sup> et à la formation du fragment p75<sup>NTR</sup>-ICD en phosphorylant ADAM17 sur la thréonine 735. Ce mécanisme faciliterait en retour la signalisation de TrkA et serait notamment requis pour l'induction de la survie des cellules PC12 par le NGF, via l'activation des voies Erk (*Extracellular signal-regulated kinase*) et Akt (Kommaddi *et al.*, 2011). De façon intéressante, une étude plus récente a validé que le fragment p75<sup>NTR</sup>-ICD potentialise la signalisation de TrkA, en provoquant un changement conformationnel dans son domaine extracellulaire pour augmenter la liaison du NGF (Matusica *et al.*, 2013). L'implication de l'axe de signalisation NGF/TrkA dans la protéolyse de p75<sup>NTR</sup> a également été reportée dans les glioblastomes multiformes, où l'activation de TrkA par le NGF contribue à la génération de p75<sup>NTR</sup>-ICD qui, en activant Akt, favorise à son tour la prolifération des cellules initiatrices de tumeur du cerveau (Forsyth *et al.*, 2014). Dans un autre modèle de lignée cellulaire, les HEK293, c'est la simple co-expression de TrkA qui faciliterait le premier clivage de p75<sup>NTR</sup> (Underwood *et al.*, 2008 ; Sykes *et al.*, 2012). Ce clivage est entravé par un inhibiteur de Erk, confirmant ainsi l'implication de la voie des MAPK dans la protéolyse de p75<sup>NTR</sup>. En revanche, dans cette étude, l'activité de TrkA inhibe la translocation de p75<sup>NTR</sup>-CTF dans les radeaux lipidiques, nécessaire au second clivage par le complexe  $\gamma$ -sécrétase, remettant ainsi en question le rôle de TrkA dans la protéolyse du récepteur (Underwood *et al.*, 2008).

Récemment, il a été montré que la sortiline joue également un rôle essentiel dans la protéolyse de p75<sup>NTR</sup>. En effet, par ses motifs **Y<sup>792</sup>SVL<sup>795</sup>** et **L<sup>829</sup>L<sup>830</sup>**, la sortiline faciliterait l'internalisation de p75<sup>NTR</sup> pour augmenter la production du fragment p75<sup>NTR</sup>-ICD dans les endosomes et ainsi promouvoir la mort cellulaire en présence du proNGF (Skeldal *et al.*, 2012).

### **3. Le récepteur TrkA**

TrkA est le récepteur de haute affinité pour le NGF.

## INTRODUCTION

### *a) Découverte*

En 1986, Martin-Zanca et ses collaborateurs isolèrent un oncogène impliqué dans le cancer du côlon, qu'ils proposèrent de nommer *trk* (*tropomyosin receptor kinase*) en raison de sa structure moléculaire particulière. En effet, cet oncogène contient les 7 premiers des 8 exons de la tropomyosine non-musculaire, fusionnés à une séquence codant les domaines transmembranaire et cytoplasmique d'une tyrosine kinase encore inconnue à l'époque (Martin-Zanca *et al.*, 1986). Au même moment, alors que le LNGFR (ancien nom de p75<sup>NTR</sup>) fut identifié, plusieurs équipes soupçonnaient l'existence d'un autre récepteur capable de lier le NGF avec une plus forte affinité ( $K_d = 10^{-11}$  M), le HNGFR (*High affinity NGFR*) (Ross, 1991). Ce n'est qu'en 1989 que les investigations menèrent à la conclusion que le HNGFR est une glycoprotéine de 140 kDa similaire au produit du proto-oncogène *trk* (gp140<sup>Trk</sup>) (Martin-Zanca *et al.*, 1989). Par la suite, de façon quasi-concomitante avec la découverte des neurotrophines, il est apparu que gp140<sup>Trk</sup> liait non seulement le NGF (Kaplan *et al.*, 1991 ; Klein *et al.*, 1991a), mais qu'il représentait également le premier membre d'une famille de récepteurs à activité tyrosine kinase (Trk), dont TrkB et TrkC font partie, et auxquels ont été attribuée la liaison d'une neurotrophine spécifique (Klein *et al.*, 1989 ; Barbacid *et al.*, 1991 ; Klein *et al.*, 1991b ; Lamballe *et al.*, 1991 ; Klein *et al.*, 1992). La protéine gp140<sup>Trk</sup> fut alors renommée TrkA (Huang & Reichardt, 2003).

### *b) Structure : du gène à la protéine*

Le gène *NTRK1* humain codant le récepteur TrkA contient 17 exons qui s'étendent sur 23 kb de la région chromosomique 1q21-q22. Ce gène est transcrit en un ARNm de 2,7 kb (Martin-Zanca *et al.*, 1989) (Tableau 10).

**Tableau 10 : Caractéristiques du récepteur TrkA humain**

Nom du gène	Localisation du gène	Taille de l'ARNm (pb)	N° NCBI	Taille en acides aminés	N° Uniprot
NTRK1	1q21-q22	2663	NM_002529	790	P04629

Le récepteur TrkA appartient à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Il s'agit d'un récepteur transmembranaire de type I, N-glycosylé, et de 790 acides aminés organisés en un domaine extracellulaire (407 aa, peptide signal inclus), une seule hélice

## INTRODUCTION

transmembranaire (26 aa) et un domaine intracellulaire (357 aa). Son poids moléculaire est de 140 kDa (Figure 17).

Le domaine extracellulaire de TrkA est composé de cinq sous-domaines : une **région de trois motifs riches en leucines (LRM, *Leucine Rich Domain* ou domaine **TrkA-D2**)**, flanquée de deux **régions riches en cystéines (TrkA-D1, -D3)**, et suivies dans la région juxtamembranaire de deux **sous-domaines de type « immunoglobulin-like » (Ig-C1 et Ig-C2, ou, **TrkA-D4 et -D5**)** (Schneider & Schweiger, 1991). Les sous-domaines Ig-C1 et Ig-C2 porteraient les déterminants de la liaison du NGF, en particulier TrkA-D5 qui s'associe directement au ligand avec une affinité similaire au récepteur natif (Perez *et al.*, 1995 ; Urfer *et al.*, 1995 ; Holden *et al.*, 1997 ; Wiesmann & de Vos, 2001). La structure cristallographique du NGF dimérique lié à une paire de TrkA-D5 a permis d'identifier deux aires essentielles dans l'interface d'interaction ligand/récepteur. La première région, appelée « *conserved patch* » ou aire conservée, met en jeu le feuillet  $\beta$  central formant le noyau du NGF homodimérique et les boucles C-terminales de TrkA-D5. La seconde région de l'interface ligand-récepteur, appelée « *specificity patch* » ou aire de spécificité fait intervenir les résidus 2-13 de la partie N-terminale du NGF et les 4 brins ABED constituant l'un des deux feuillets de TrkA-D5. Cette seconde aire, et plus particulièrement les résidus N-terminaux du NGF, sont responsables de la spécificité de liaison pour les neurotrophines NGF et NT-3 (Wiesmann *et al.*, 1999). Plus récemment, la structure du NGF associé à l'ectodomain complet de TrkA a également été modélisée par cristallographie et a confirmé que TrkA-D5 constitue le domaine de liaison du NGF (Wehrman *et al.*, 2007). Bien que TrkA-D4 n'intervienne pas directement dans l'interaction NGF/TrkA, sa présence serait nécessaire à l'expression, la mise en conformation et la translocation du récepteur TrkA à la membrane plasmique (Urfer *et al.*, 1995 ; Holden *et al.*, 1997). Les sous-domaines Ig-C1 et Ig-C2 empêcheraient également la dimérisation spontanée et l'auto-activation de TrkA en absence de NGF, en stabilisant les formes monomériques du récepteur TrkA jusqu'à la liaison du ligand (Arevalo *et al.*, 2000). Les autres régions de l'ectodomain de TrkA, notamment TrkA-D2, participeraient aussi à la fixation du ligand et à la régulation de l'activité constitutive du récepteur (MacDonald & Meakin, 1996 ; Arevalo *et al.*, 2001). En outre, le domaine extracellulaire comporte 13 sites potentiels de N-glycosylation, dont seulement 6 ont été identifiés lors de la modélisation du complexe NGF/TrkA par cristallographie. Ces 6 glycosylations n'entrent pas en contact physique avec le ligand et ne semblent donc pas influencer directement la liaison du NGF et l'activation de TrkA (Wehrman *et al.*, 2007). En revanche, les 13 sites potentiels de N-glycosylation semblent essentiels à l'adressage du

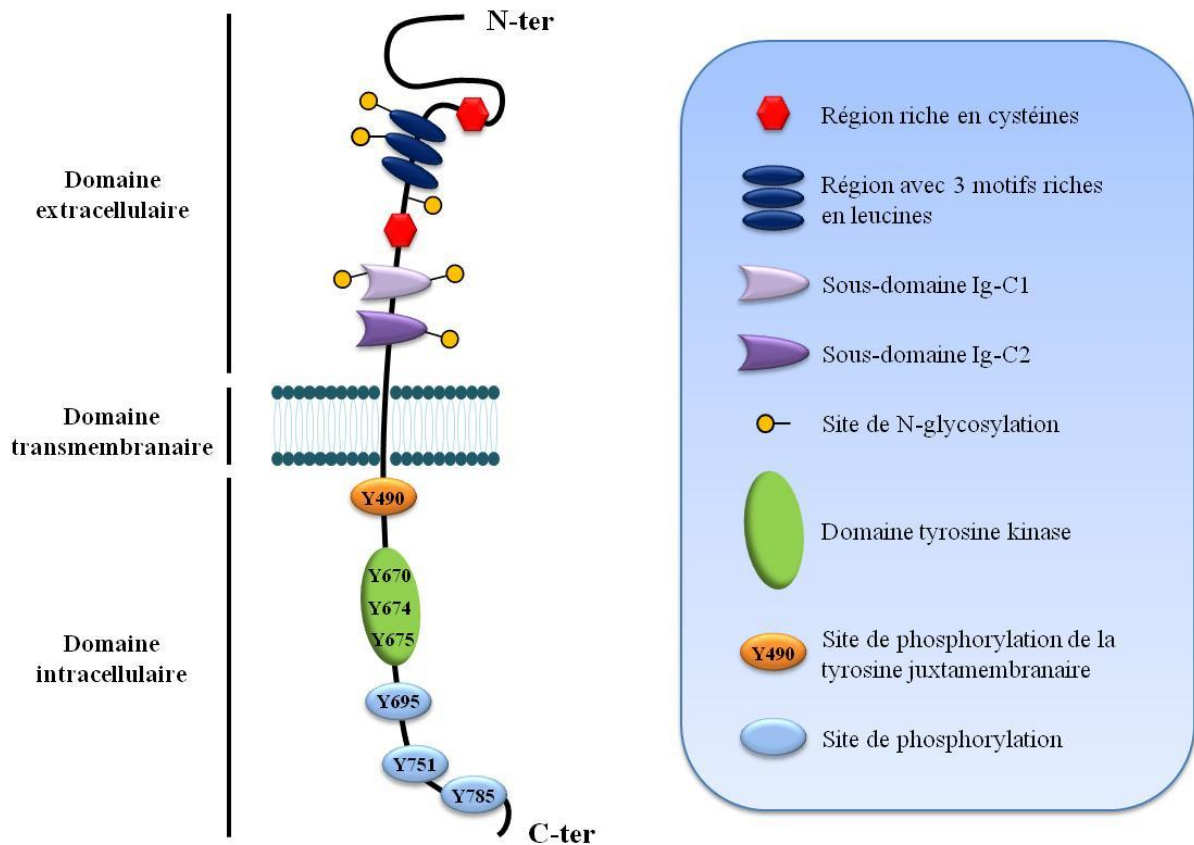
## INTRODUCTION

récepteur TrkA à la surface cellulaire, à la prévention de son activation spontanée en absence de ligand, et à sa signalisation (Friedman & Greene, 1999 ; Watson *et al.*, 1999).

Le domaine transmembranaire stabilise le récepteur TrkA à la surface cellulaire et jouerait un rôle majeur dans la transduction du signal, puisque l'introduction d'une mutation ponctuelle dans ce domaine altérerait de manière sélective l'activation de la voie Erk par le NGF (Monshipouri *et al.*, 2000).

Le domaine intracellulaire du récepteur TrkA possède un **domaine tyrosine kinase** et de nombreuses tyrosines phosphorylables. Trois résidus tyrosines  $Y^{670}$ ,  $Y^{674}$  et  $Y^{675}$ , contenues au sein du domaine tyrosine kinase, sont responsables de la trans-autophosphorylation du récepteur (Cunningham *et al.*, 1997). D'autres sites de phosphorylation localisés en dehors du domaine tyrosine kinase, dans la région juxtamembranaire (le résidu  $Y^{490}$ ) et en C-terminal ( $Y^{695}$ ,  $Y^{751}$ , et  $Y^{785}$ ), interviennent dans le recrutement de protéines adaptatrices spécifiques, nécessaires à la signalisation du récepteur (Obermeier *et al.*, 1993a ; Obermeier *et al.*, 1993b ; Stephens *et al.*, 1994 ; de Pablo *et al.*, 2008). La région juxtamembranaire, en dehors des tyrosines phosphorylables telles que  $Y^{490}$ , jouerait également un rôle clé dans la transduction du signal, suggérant ainsi que d'autres régions intracellulaires, encore inconnues à ce jour, peuvent contribuer à l'établissement des effets biologiques en réponse au NGF (Peng *et al.*, 1995).

## INTRODUCTION



**Figure 17 : Représentation schématique du récepteur TrkA-I**

Le récepteur *TrkA* est composé d'un domaine extracellulaire contenant une région riche en leucine encadrée par deux régions riches en cystéines, suivie dans la région juxtamembranaire de deux domaines de type immunoglobuline Ig-C1 et Ig-C2. Ce domaine est relié par une simple hélice transmembranaire au domaine intracellulaire qui se compose notamment d'un large domaine tyrosine kinase responsable de la trans-autophosphorylation du récepteur et de son activation. D'autres sites de phosphorylations sont localisés de part et d'autre de ce domaine et interviennent 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.

### c) Les isoformes de *TrkA*

Cinq isoformes de *TrkA* sont recensées à ce jour (Figure 18). Les deux premières à avoir été identifiées, **TrkA-I** et **TrkA-II**, ont une expression opposée : *TrkA-I* est préférentiellement exprimée dans les tissus non-neuronaux alors que *TrkA-II* est retrouvée dans les tissus neuronaux et en faible quantité dans le rein et le poumon (Barker *et al.*, 1993). Sur le plan structurel, ces deux isoformes de 790 et 796 acides aminés, ne diffèrent que par l'épissage alternatif de l'*exon 9*. En effet, *TrkA-II* qui contient l'*exon 9*, possède un **insert de 6 acides aminés (Val-Ser-Phe-Ser-Pro-Val)** entre le sous-domaine Ig-C2 et le domaine transmembranaire, dont la présence n'affecte ni l'affinité du récepteur pour le NGF, ni la

## INTRODUCTION

transduction du signal (Barker *et al.*, 1993). En revanche, cet insert contribuerait à la sélectivité de TrkA pour la NT-3 puisque cette neurotrophine ne se lie pas sur TrkA-I (Clary & Reichardt, 1994). Plus récemment, une troisième isoforme, **TrkA-III**, a été identifiée dans les neuroblastomes de stade avancé et le thymus (Tacconelli *et al.*, 2004 ; Tacconelli *et al.*, 2007 ; Ruggeri *et al.*, 2014). Celle-ci résulte de l'épissage alternatif des *exons 6, 7 et 9*, et est donc dépourvue du domaine Ig-C1 et des sites de N-glycosylation associés. Ainsi, contrairement aux isoformes TrkA-I et TrkA-II, TrkA-III n'est pas exprimée à la surface cellulaire, mais est retenue dans les compartiments membranaires intracellulaires, dans lesquels elle est capable d'induire une activation spontanée, indépendante du ligand. Une équipe a montré que TrkA-III favorise les propriétés tumorigènes et métastatiques des cellules de neuroblastomes par un grand nombre de mécanismes qui assurent la mise en place d'un phénotype indifférencié. Par ailleurs, cette isoforme est préférentiellement générée en conditions d'hypoxie, suggérant que son expression dépend fortement du microenvironnement tumoral (Tacconelli *et al.*, 2004 ; Tacconelli *et al.*, 2005 ; Farina *et al.*, 2009 ; Farina *et al.*, 2013 ; Ruggeri *et al.*, 2014). Enfin, deux autres isoformes, **TrkA-L1** et **TrkA-L0**, sont retrouvées dans le thymus, le poumon, le rein et les testicules chez le rat, mais pas dans le système nerveux. Celles-ci sont par ailleurs toujours exprimées en même temps que TrkA-I. Les isoformes TrkA-L1 et TrkA-L0 présentent des modifications dans la séquence de la région riche en leucines. En effet, l'épissage des *exons 2 et 3* dans TrkA-L1 se traduit par l'absence d'un des trois domaines riches en leucines alors que ces derniers sont totalement manquants dans l'isoforme TrkA-L0, de par l'épissage supplémentaire de l'*exon 4* (Dubus *et al.*, 2000).

## INTRODUCTION

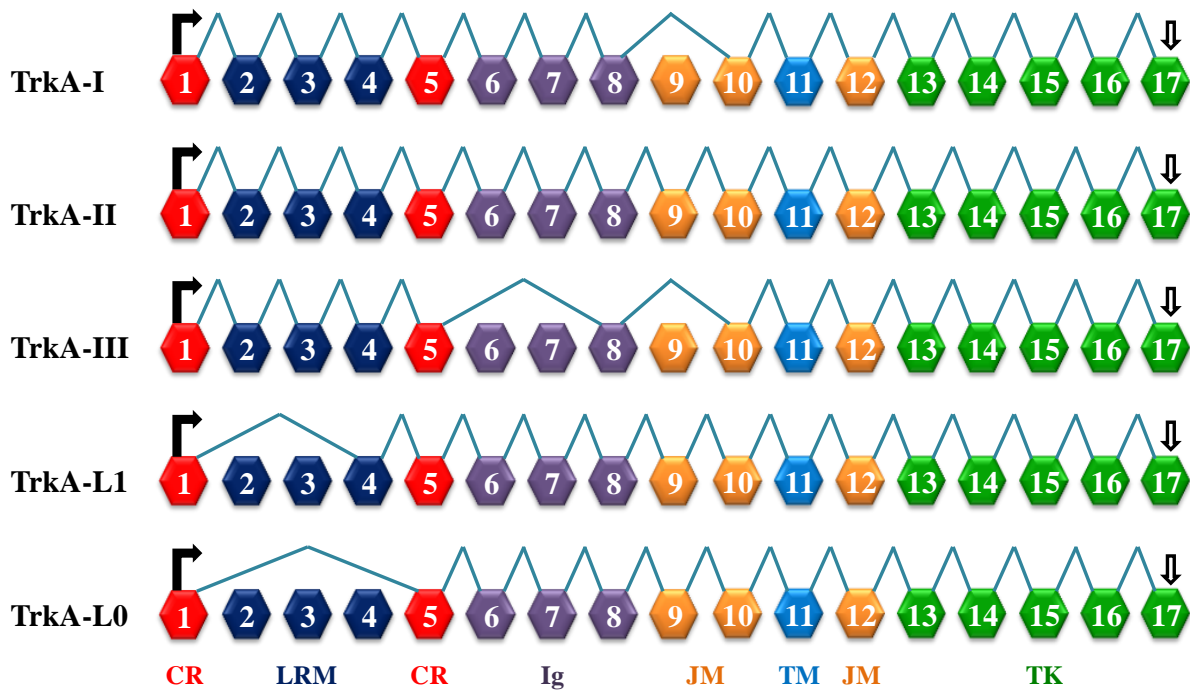


Figure 18 : Isoformes du récepteur TrkA

Les hexagones représentent les 17 exons du gène *NTRK1*. *TrkA-II* est l'isoforme la plus longue. *TrkA-I* est dépourvue de l'exon 9 ; *TrkA-III*, des exons 6, 7 et 9 ; *TrkA-L1* des exons 2 et 3 ; et *TrkA-L0*, des exons 2, 3 et 4. La flèche partant vers la droite désigne le point d'initiation de la traduction alors que la flèche descendante marque son arrêt. Une couleur a été attribuée aux différentes régions de la protéine avec leurs exons correspondants : les régions riches en cystéines (CR) en rouge ; le motif LRM (Leucine Rich Motif) en bleu foncé ; les sous-domaines de type immunoglobulin-like (Ig) en violet ; les régions juxtamembranaires (JM) en orange ; le domaine transmembranaire (TM) en bleu clair ; le domaine tyrosine kinase (TK) en vert.

### C) La signalisation du récepteur TrkA

#### 1. Activation du récepteur

Classiquement, les récepteurs à activité tyrosine kinase sont activés par dimérisation, induite suite à la liaison de leur ligand (Hubbard & Miller, 2007 ; Lemmon & Schlessinger, 2010). Néanmoins, l'activation du récepteur TrkA par le NGF ferait appel à un tout autre mécanisme. En effet, bien qu'il ait été décrit que les complexes NGF/TrkA ont une stœchiométrie symétrique 2:2 (Wehrman *et al.*, 2007), plusieurs travaux ont montré que des mimétiques du NGF, qui sont pourtant incapables de former des dimères, peuvent aussi activer TrkA (Maliartchouk *et al.*, 2000a ; Maliartchouk *et al.*, 2000b). En outre, une étude plus récente a mis en évidence que des homodimères inactifs de TrkA sont agencés dans le réticulum endoplasmique avant même la liaison du NGF à la surface cellulaire (Shen & Maruyama, 2011). Cette dernière observation avait déjà été reportée pour d'autres récepteurs membranaires, tels que l'EGFR (Tao & Maruyama, 2008). Dans ce sens, il a également été

## INTRODUCTION

démontré que les domaines transmembranaires de nombreux RTK, y compris TrkA, ont la capacité intrinsèque de former des dimères membranaires stables (Finger *et al.*, 2009). Ainsi, l'activation de ces récepteurs par leur(s) ligand(s) respectif(s) ne dépendrait pas de leur hétéro-/homodimérisation, mais serait plutôt associée à une rotation des domaines transmembranaires de dimères préformés, résultant en un réarrangement des domaines cytoplasmiques (Moriki *et al.*, 2001 ; Tao & Maruyama, 2008 ; Finger *et al.*, 2009). Ce réarrangement conformationnel initierait l'activation des récepteurs en levant la *cis*-autoinhibition du domaine kinase et entraînerait alors leur *trans*-autophosphorylation, au cours de laquelle chaque domaine kinase d'un monomère catalyserait la phosphorylation de l'autre monomère (Ullrich & Schlessinger, 1990). Dans le cadre du récepteur TrkA, les premiers résidus phosphorylés, à savoir ceux contenus au sein du domaine kinase, sont les tyrosines **Y<sup>670</sup>**, **Y<sup>674</sup>** et **Y<sup>675</sup>** (Cunningham *et al.*, 1997). Leur phosphorylation augmenterait l'activité catalytique de la tyrosine kinase (Mitra, 1991), conduisant à la *trans*-autophosphorylation des tyrosines secondaires **Y<sup>490</sup>**, **Y<sup>695</sup>**, **Y<sup>751</sup>** et **Y<sup>785</sup>**, localisées à l'extérieur du domaine kinase (Stephens *et al.*, 1994 ; Bradshaw *et al.*, 2013).

Le récepteur TrkA nouvellement activé et phosphorylé sert alors d'échafaudage pour le recrutement et l'activation d'une multitude de protéines effectrices à domaines **SH2** (*Src homology-2*) et/ou **PTB** (*PhosphoTyrosine Binding domain*), qui assurent la propagation du signal induit par le NGF (van der Geer & Pawson, 1995 ; Segal & Greenberg, 1996 ; Pawson *et al.*, 2001 ; Schlessinger & Lemmon, 2003). Les protéines adaptatrices, soit les premiers composants de la signalisation intracellulaire des RTK, peuvent interagir soit directement avec les phosphotyrosines du récepteur TrkA activé *via* leur(s) propre(s) domaine(s) SH2 et/ou PTB, soit indirectement par leur liaison à des protéines d'amarrage (« *docking proteins* ») phosphorylées par TrkA (Schlessinger, 2000).

### **2. Recrutement des protéines d'amarrage ou “docking proteins”**

Les protéines d'amarrage jouent un rôle indispensable dans la signalisation des RTK. En effet, en plus d'assurer le lien entre les RTK et leurs protéines effectrices sous-jacentes, les protéines d'amarrage mettent en place des plateformes d'assemblage qui interviennent dans l'activation, la coordination et la régulation de la signalisation des RTK. Quatre familles de « *docking proteins* » ont été définies : **Frs2** (*Fibroblast growth factor receptor substrate 2*), les protéines **Gab/DOS** (*Grb2-associated binder/Daughter of sevenless*), les protéines **IRS** (*Insulin Receptor Substrate*) et les protéines **Dok** (*Downstream of tyrosine kinases*) (Brummer *et al.*, 2010).



## INTRODUCTION

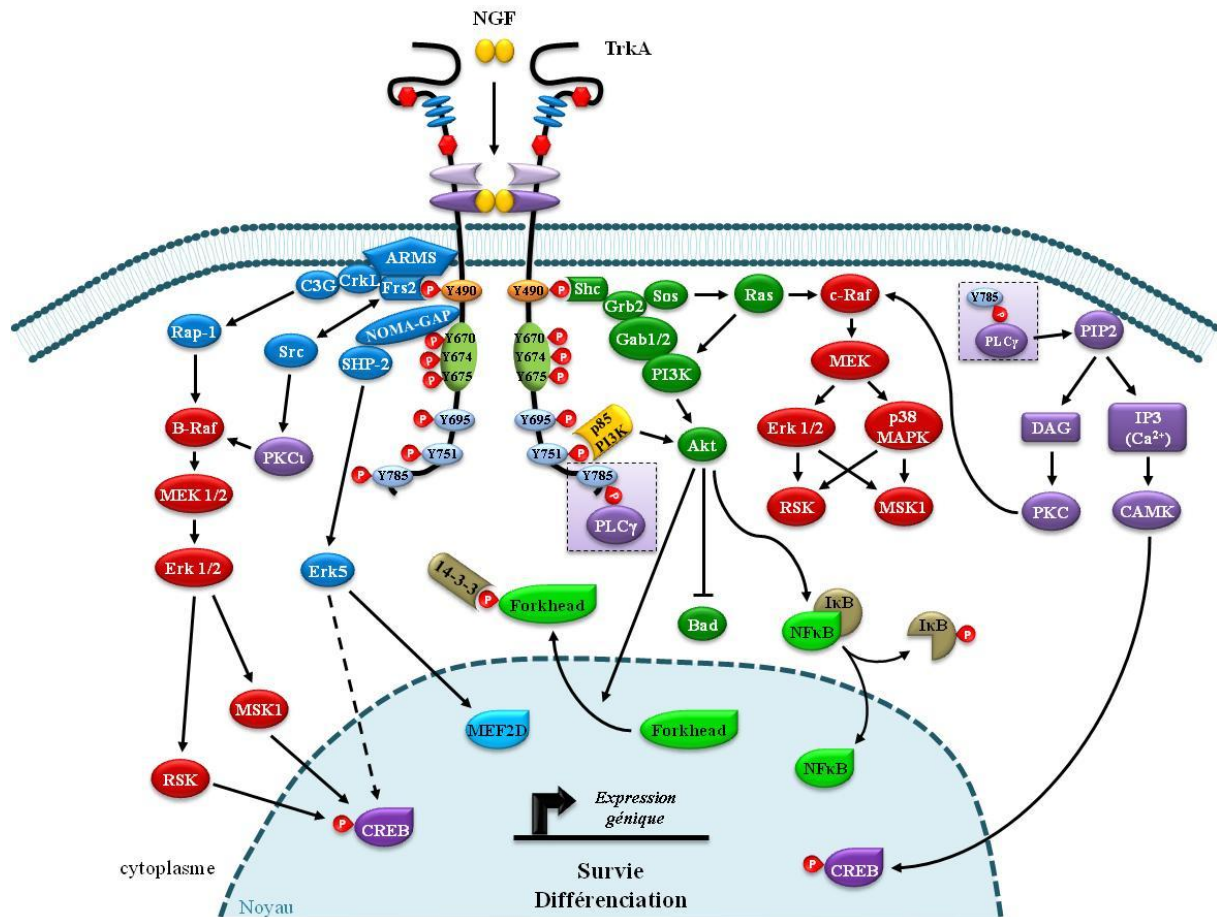
Dans le cadre de la signalisation induite par le récepteur TrkA, les protéines d'amarrage contrôlent le choix et la durée (transitoire ou prolongée) du signal engagé, en fonction du compartiment subcellulaire dans lequel a lieu leur recrutement. Ces protéines s'associent directement ou indirectement à TrkA au niveau de la tyrosine juxtamembranaire Y<sup>490</sup>.

Ainsi, Frs2 est capable de se lier directement au récepteur activé (Meakin *et al.*, 1999 ; Ong *et al.*, 2000), alors que Gab1 nécessite préalablement le recrutement des protéines adaptatrices Shc (*Src homology-2 containing protein*) et Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) (Obermeier *et al.*, 1993b ; Stephens *et al.*, 1994 ; Holgado-Madruga *et al.*, 1997). L'implication de ces deux protéines dans les voies de signalisation associées à TrkA sera précisée par la suite. Une équipe a également reportée que les protéines d'amarrage IRS-1 et IRS-2 sont des substrats du récepteur TrkA dans les cellules HEK293. Leurs phosphorylations sur les résidus tyrosines entraînent alors le recrutement de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K, de la phosphatase SHP-2 (*SH2-containing tyrosine phosphatase*) et de l'adaptateur Grb2, tout en augmentant l'activité de la PI3K (Miranda *et al.*, 2001). Cette interaction est majoritairement localisée sur la tyrosine Y<sup>490</sup>, mais pourrait également dépendre d'autres résidus (Wolf *et al.*, 1995). De façon intéressante, une étude plus récente a montré que TrkA forme un complexe avec IRS-1 et le récepteur à l'insuline dans les cellules PC12 après traitement au NGF ou à l'insuline. Dans ces cellules, la stimulation de l'activité kinasique de TrkA par le NGF serait nécessaire pour induire la phosphorylation du récepteur à l'insuline et d'IRS-1, et influencerait ainsi la signalisation de l'insuline en contribuant à l'activation d'Akt et Erk5 (Geetha *et al.*, 2013). Concernant les protéines Dok, aucune étude n'a, à ce jour, rapporté d'éventuelle interaction entre TrkA et un membre de cette famille de protéines d'amarrage. En revanche, il a été décrit que Dok5 s'associe aux récepteurs TrkB et TrkC, et participe à l'activation des MAPK, après stimulation par les neurotrophines (Shi *et al.*, 2006). En outre, Dok6 serait activée par TrkC et contribuerait à la neuritogenèse induite par la NT-3 dans les neurones corticaux de souris (Li *et al.*, 2010).

### **3. Voies de signalisation associées au récepteur TrkA**

Trois voies de signalisation principales ont été recensées comme étant induites par le récepteur TrkA en réponse au NGF : la voie des MAPK, la voie PI3K/Akt et la voie PLC- $\gamma$ 1 (*Phospholipase C- $\gamma$ 1*)/PKC (*Protein Kinase C*). Ces voies de signalisation ont été essentiellement décrites dans les cellules neuronales et les cellules de phéochromocytome de rat PC12, et sont responsables dans ces types cellulaires, de la survie et la différenciation (Figure 19) (Huang & Reichardt, 2003 ; Reichardt, 2006).

## INTRODUCTION



**Figure 19 : Principales voies de signalisation associées à l'axe NGF/TrkA**

La liaison du NGF aux homodimères de TrkA entraîne un réarrangement conformationnel des domaines cytoplasmiques des récepteurs, permettant ainsi la trans-autophosphorylation des tyrosines Y<sup>670</sup>, Y<sup>674</sup>, Y<sup>675</sup> des domaines kinases, puis la phosphorylation des résidus Y<sup>490</sup>, Y<sup>695</sup>, Y<sup>751</sup> et Y<sup>785</sup>. Des protéines adaptatrices sont alors recrutées sur ces tyrosines phosphorylées : Shc et Frs2 sur Y<sup>490</sup>, la sous-unité p85 de la PI3K sur Y<sup>751</sup>, et la PLC- $\gamma$ 1 sur Y<sup>785</sup>. Le recrutement de NOMA-GAP est indépendant de la phosphorylation de TrkA et le site d'interaction sur le récepteur est encore inconnu. La protéine ARMS s'associe avec TrkA via une interaction entre les domaines transmembranaires. Les voies de signalisation sous-jacentes sont ensuite activées et conduisent, en fonction du type cellulaire, à la survie, la prolifération, la différenciation ou la migration/invasion des cellules. ARMS : Ankyrin repeat-rich membrane spanning protein ; Bad : Bcl-2-associated agonist of cell death ; CAMK : Calcium/calmodulin-regulated protein kinase ; C3G: Crk SH3-domain-binding Guanine-nucleotide releasing factor ; CREB: Cyclic AMP-responsive element-binding protein ; DAG :Diacylglycerol ; Erk : Extracellular signal-regulated kinase ; Frs2 : Fibroblast growth factor receptor substrate 2 ; Gab1/2 : Grb2-associated binding protein 1/2 ; Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2 ; I $\kappa$ B : Inhibitor of kappa B ; IP3 : inositol 1,4,5-triphosphate ; MAPK : Mitogen-activated protein kinase ; MEF2D : Myocyte-specific enhancer factor 2D ; MEK : MAPK kinase ; MSK1 : mitogen- and stress-activated protein kinase 1 ; NF- $\kappa$ B : Nuclear factor-kappa B ; NGF : Nerve Growth Factor ; NOMA-GAP : Neurite outgrowth multiadaptor RhoGTPase-activating protein ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-biophosphate ; PKC : Protein kinase C ; PLC- $\gamma$ 1 : Prosholipase C-gamma 1 ; Rap1 : Ras-related protein 1 ; RSK : Ribosomal protein S6 kinase ; Shc : Src homology-2 containing protein ; SHP-2 : Src homology-2 containing tyrosine-protein phosphatase ; Sos : Son of sevenless ; TrkA : Tropomyosin-receptor kinase A.

## INTRODUCTION

### *a) Voie des MAPK*

L'axe NGF/TrkA peut induire la voie des **MAPK** selon deux modes d'activation (activation transitoire ou prolongée), conduisant à des effets biologiques distincts. La sélection du mode d'activation de la voie des MAPK est déterminée par la nature de la protéine adaptatrice recrutée au niveau de la tyrosine **Y<sup>490</sup>** de TrkA et par la localisation subcellulaire du récepteur (Meakin *et al.*, 1999 ; Kao *et al.*, 2001 ; Arevalo *et al.*, 2006a).

Ainsi, lorsqu'elle est initiée par la fixation de la protéine **Shc** sur **Y<sup>490</sup>**, la voie des MAPK est activée de manière transitoire et résulte en la différenciation des neurones et des cellules PC12 (Marshall, 1995). En effet, une fois liée au résidu **Y<sup>490</sup>** par son domaine PTB, la protéine Shc est phosphorylée et recrute la protéine **Grb2** puis le facteur **Sos** (*Son of sevenless*), un GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) impliqué dans l'activation de la petite protéine G **Ras** (Khosravi-Far & Der, 1994 ; Stephens *et al.*, 1994 ; Dikic *et al.*, 1995). Après liaison du GTP, Ras est activé et engage alors une cascade de signalisation entraînant les activations consécutives de **c-Raf**, des **MEK** (*MAPK Kinase*), puis des MAPK **Erk1/2** (*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*) et **p38MAPK** (Thomas *et al.*, 1992 ; Troppmair *et al.*, 1992 ; Obermeier *et al.*, 1994 ; Xing *et al.*, 1998).

La protéine **Frs2** peut également se lier directement sur le résidu **Y<sup>490</sup>**, afin d'induire la formation d'un complexe protéique TrkA/Frs2/CrkL/C3G qui aboutit à l'activation prolongée de la voie **B-Raf/MAPK** via la petite protéine G **Rap1** (*Ras-related protein 1*) (York *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2001). De façon intéressante, la protéine transmembranaire **ARMS/Kidins220** (*Ankyrin repeat-rich membrane spanning protein*), qui est capable d'interagir constitutivement avec TrkA et CrkL, jouerait également un rôle essentiel dans l'induction soutenue des MAPK (Kong *et al.*, 2001 ; Arevalo *et al.*, 2004). En effet, le NGF phosphoryle ARMS sur sa tyrosine **Y<sup>1096</sup>**, permettant alors à CrkL de recruter C3G qui active Rap1 (Arevalo *et al.*, 2006a). De plus, l'activation prolongée de la voie B-Raf/MAPK nécessite l'internalisation du récepteur TrkA et son trafic intracellulaire, probablement via les endosomes de signalisation (Howe *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2001 ; Howe & Mobley, 2004 ; Hisata *et al.*, 2007). Par ailleurs, une activation prolongée de **Erk5** a aussi été reportée suite à une stimulation au NGF et serait impliquée dans la survie cellulaire (Watson *et al.*, 2001). L'activité de Erk5 nécessiterait l'intervention de la phosphatase **SHP-2** qui est recrutée à TrkA via **NOMA-GAP** (*Neurite Outgrowth Multiadaptor RhoGTPase-activating Protein*), un adaptateur jouant un rôle clé dans la croissance des neurites stimulée par le NGF (Goldsmith & Koizumi, 1997 ; Wright *et al.*, 1997 ; Rosario *et al.*, 2007).

## INTRODUCTION

Quel que soit le mode d'activation engagé, la voie des MAPK induite par l'axe NGF/TrkA aboutit à l'activation des protéines **RSK** (*Ribosomal protein S6 Kinase*) et **MSK1** (*Mitogen and Stress-activated protein Kinase-1*), qui phosphorylent et activent à leur tour **CREB** (*Cyclic adenosine monophosphate Response Element-Binding protein*), un facteur de transcription contrôlant l'expression de nombreux gènes impliqués notamment dans la survie et la différenciation cellulaires (Xing *et al.*, 1996 ; Deak *et al.*, 1998 ; Riccio *et al.*, 1999). En outre, l'activation de Erk5 induirait aussi le facteur de transcription **MEF2D** (*MADS box transcription enhancer factor 2 polypeptide D*), conduisant à la survie neuronale (Watson *et al.*, 2001 ; Heerssen & Segal, 2002 ; Pazyra-Murphy *et al.*, 2009).

Ainsi, l'ensemble de ces données semble indiquer que l'activation transitoire des MAPK surviendrait à la membrane plasmique et induirait la différenciation neuronale, alors que l'activation prolongée nécessiterait l'internalisation du récepteur TrkA et son trafic intracellulaire *via* une voie endosomale afin de conduire à la survie cellulaire (Figure 19).

### *b) Voie PI3K/Akt*

Le recrutement des protéines Shc et Grb2 sur le résidu **Y<sup>490</sup>** phosphorylé peut également conduire à la voie de signalisation **PI3K/Akt**, impliquée notamment dans la survie et la différenciation. En effet, le NGF peut induire la phosphorylation de la protéine d'amarrage **Gab1** qui opère alors la jonction entre TrkA et la PI3K *via* son association avec Grb2. L'intervention de Gab1 joue un rôle déterminant dans cette signalisation puisqu'elle induirait non seulement l'activation de la PI3K par la formation d'un complexe actif Gab1/Ras/PI3K, mais elle inhiberait également la voie des MAPK en empêchant probablement la fixation de Sos à Grb2 (Holgado-Madruga *et al.*, 1997). Toutefois, d'autres travaux ont montré que la phosphorylation de Gab1 induite par le NGF peut aussi conduire à la croissance des neurites en régulant la voie Sos/Ras/c-Raf/MEK/MAPK (Korhonen *et al.*, 1999). Par ailleurs, le recrutement de la PI3K sur TrkA peut aussi s'opérer de manière directe, *via* l'interaction de la sous-unité régulatrice p85 sur le résidu **Y<sup>751</sup>** (Ohmichi *et al.*, 1992).

Quel que soit son mode de recrutement à TrkA, la PI3K active ensuite la protéine kinase **Akt**, intervenant dans la régulation de nombreux processus biologiques. En effet, Akt peut dans un premier temps inhiber l'action pro-apoptotique de la protéine **Bad** (*Bcl-2 associated agonist of cell death*) et du facteur de transcription « **Forkhead** » en les phosphorylant. La phosphorylation de Bad par Akt conduit à sa séquestration par les protéines **14-3-3**, restaurant alors l'activité anti-apoptotique de la **Bcl-2** (Datta *et al.*, 1997). De même, une fois le facteur de transcription « **Forkhead** » phosphorylé par Akt, celui-ci quitte le noyau et est séquestré

## INTRODUCTION

par les protéines 14-3-3, inhibant ainsi la transcription de gènes codant des protéines pro-apoptotiques (Brunet *et al.*, 1999 ; Brunet *et al.*, 2002 ; Zheng *et al.*, 2002). Dans un second temps, Akt peut aussi contribuer partiellement à la différenciation neuronale induite par le NGF, en favorisant la translocation du facteur de transcription **NF-κB** dans le noyau, suite à la phosphorylation de sa sous-unité inhibitrice **IκB** (*Inhibitor of kappa B*) (Foehr *et al.*, 2000).

### *c) Voie PLC-γ1/PKC*

A l'extrémité C-terminale de TrkA, la tyrosine **Y<sup>785</sup>** phosphorylée permet le recrutement de la **PLC-γ1**, qui devient active après phosphorylation par la kinase du récepteur (Vetter *et al.*, 1991 ; Obermeier *et al.*, 1993a ; Stephens *et al.*, 1994). La PLC-γ1 active hydrolyse alors le **PIP2** (*Phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate*) pour générer deux messagers secondaires : l'**IP3** (*Inositol 1,4,5-triphosphate*) et le **DAG** (*Diacylglycérol*). L'**IP3** se lie à son récepteur exprimé à la membrane du réticulum endoplasmique et induit la libération transitoire des stocks calciques internes dans le cytoplasme de la cellule, stimulant ainsi les isoformes de la **PKC** régulées par le  $Ca^{2+}$  et activant la **CAMK** ( $Ca^{2+}$ /*calmodulin-regulated protein kinase*). Le DAG active directement les isoformes de la PKC en synergie avec le calcium libéré dans le cytoplasme (Singer *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2000b). La voie PLC-γ1/PKC coopèrerait avec la voie des MAPK afin d'induire la différenciation neuronale dans les cellules PC12, en réponse à un traitement par le NGF (Obermeier *et al.*, 1994). En effet, plusieurs équipes ont montré que certaines isoformes de la PKC interagissent avec la voie Ras/c-Raf/MEK/MAPK en activant les MEK indépendamment de Ras et c-Raf (Corbit *et al.*, 1999 ; Wooten *et al.*, 2000). De façon contrastée, une autre étude a décrit que l'activité de la PLC-γ1 induit les axes Ras/c-Raf/MEK/MAPK et Rap1/B-Raf/MEK/MAPK en amont de Ras et Rap1, probablement *via* la stimulation d'un ou plusieurs GEFs par les messagers secondaires de la voie PLC-γ1/PKC (Rong *et al.*, 2003). En outre, la PLC-γ1 pourrait aussi interagir directement avec Sos *via* son domaine SH3, stimulant ainsi les activités de Ras et de Erk (Kim *et al.*, 2000a).

Enfin, suite à leur activation par le  $Ca^{2+}$ , les CAMK interviendraient directement dans la phosphorylation et l'activation de CREB dans le noyau, conduisant ainsi à la transcription de gènes impliqués notamment dans la différenciation neuronale (Curtis & Finkbeiner, 1999).

De façon intéressante, une autre étude indique que la protéine **Src** peut être recrutée sur le résidu **Y<sup>490</sup>** phosphorylé de TrkA par l'intermédiaire de l'adaptateur Frs2, afin de phosphoryler la **PKC-iota** menant à la survie cellulaire (Wooten *et al.*, 2001b).

## INTRODUCTION

### 4. Mécanismes de régulation de l'activité de TrkA

Plusieurs mécanismes de régulation de l'activité du récepteur TrkA, tels que la transactivation par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), la présence de rétrocontrôle(s), l'existence d'une régulation spatio-temporelle, ou encore l'ubiquitination du récepteur, augmentent considérablement la complexité de la signalisation de TrkA.

#### *a) Transactivation du récepteur TrkA*

L'expression et l'activation de TrkA est sous l'influence d'autres récepteurs co-exprimés dans les cellules. En particulier, les RCPG peuvent transactiver le récepteur TrkA en l'absence de NGF, afin d'altérer des voies de signalisation sous-jacentes, entraînant alors des réponses fonctionnelles distinctes (Lee *et al.*, 2002a ; Chao, 2003). La transactivation de TrkA a été observée dans plusieurs types de cellules neuronales, suite à des traitements avec des agonistes de RCPG tels que l'**adénosine** ou le peptide **PACAP** (*Pituitary adenylate cyclase activating peptide*) (Lee & Chao, 2001 ; Lee *et al.*, 2002b ; Jeanneteau & Chao, 2006). La transactivation de TrkA par l'adénosine ou PACAP nécessite une cinétique d'activation plus longue que celle induite par le NGF, et est sous le contrôle de kinases appartenant à la famille de la tyrosine kinase Src (**SFK**, *Src Family Kinase*) (Rajagopal & Chao, 2006 ; Shi *et al.*, 2010). Une fois transactivé, le récepteur TrkA conduit notamment à l'activation de la voie PI3K/Akt, qui se traduit par une augmentation de la survie cellulaire, induite indépendamment de l'effet du NGF. De façon surprenante, la transactivation de TrkA interviendrait sur des récepteurs TrkA néo-formés présents au niveau de l'appareil de Golgi, avant leur expression à la membrane plasmique (Rajagopal *et al.*, 2004). De façon intéressante, une équipe a récemment montré qu'un co-traitement des cellules PC12 avec PACAP et le NGF entraîne une augmentation synergique de l'expression de la serpine b1a, aboutissant à l'inhibition de l'activité de la caspase 3 et à l'induction de la survie cellulaire (Seaborn *et al.*, 2014). Par ailleurs, **LRP1** (*Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 1*), une protéine impliquée dans l'endocytose, peut également transactiver TrkA *via* les SFK, afin d'induire la croissance des neurites dans les cellules PC12 et les neurones (Shi *et al.*, 2009).

#### *b) Recrutement de phosphatases*

La signalisation de l'axe NGF/TrkA peut aussi être régulée par des rétrocontrôles négatifs faisant notamment intervenir différentes phosphatases capables de déphosphoryler les tyrosines **Y<sup>674</sup>** et **Y<sup>675</sup>** du domaine kinase. Par exemple, il a été montré que la phosphatase

## INTRODUCTION

**SHP-1** se lie au récepteur sur le résidu Y<sup>490</sup> et déphosphoryle le domaine kinase de TrkA, inhibant ainsi la survie des neurones (Marsh *et al.*, 2003). En outre, plusieurs membres de la famille des **RPTP** (*Receptor-like Protein Tyrosine Phosphatase*) ont également été décrits pour inhiber la phosphorylation du domaine kinase de TrkA et la croissance des neurites induite par le NGF (Faux *et al.*, 2007 ; Shintani & Noda, 2008).

De façon intéressante, d'autres phosphatases ont un rôle régulateur positif dans la transduction du signal de TrkA et contribue à l'amplification de la réponse au NGF. Ainsi, comme décrit précédemment, la phosphatase **SHP-2** est impliquée dans l'activation des MAPK et la différenciation neuronale après traitement au NGF (Wright *et al.*, 1997). Par ailleurs, une autre étude a reporté que la sérine/thréonine phosphatase **PP2A** (Protein Phosphatase 2A) peut améliorer et maintenir l'activité tyrosine kinase de TrkA, probablement *via* la déphosphorylation de résidus sérine et/ou thréonine inhibiteurs. L'activation soutenue de TrkA conduit alors à une activation prolongée des voies Erk1/2 et Akt responsables de la différenciation neuronale. (Van Kanegan & Strack, 2009).

### *c) Régulation spatio-temporelle de l'activité de TrkA*

La régulation spatio-temporelle de l'activité du récepteur TrkA peut conduire à des effets biologiques complètement distincts et constitue, par conséquent, un niveau de complexité supplémentaire pour la signalisation de l'axe NGF/TrkA. Cette régulation spatio-temporelle est directement liée à une spécificité de la signalisation de l'axe NGF/TrkA, qui a été largement décrite dans les cellules neuronales : il s'agit de la signalisation rétrograde (Hendry *et al.*, 1974 ; Zweifel *et al.*, 2005). En effet, le récepteur TrkA qui est activé par le NGF au niveau des terminaisons nerveuses, peut induire un signal trophique dans le corps cellulaire du neurone, parfois situé jusqu'à un mètre en aval de l'initiation du signal.

Au cours de ces dernières années, un nombre croissant de données ont mis en avant un modèle dans lequel le NGF et TrkA sont internalisés sous forme de complexes ligand/récepteur, au niveau des terminaisons nerveuses, dans des vésicules spécialisées appelées endosomes de signalisation (« *signaling endosomes* ») (Grimes *et al.*, 1996 ; Howe & Mobley, 2005 ; Ibanez, 2007 ; Wu *et al.*, 2009 ; Ascano *et al.*, 2012). Ainsi, lorsque le NGF se lie à TrkA, le complexe ligand/récepteur peut être rapidement internalisé *via* un processus de macroendocytose, indépendant de la voie des clathrines, pour former des endosomes à longue durée de vie, capables de parcourir de longues distances des terminaisons nerveuses jusqu'aux corps cellulaires des neurones (Valdez *et al.*, 2005 ; Valdez *et al.*, 2007). Ces vésicules spécialisées contiennent des marqueurs caractéristiques des endosomes précoces,

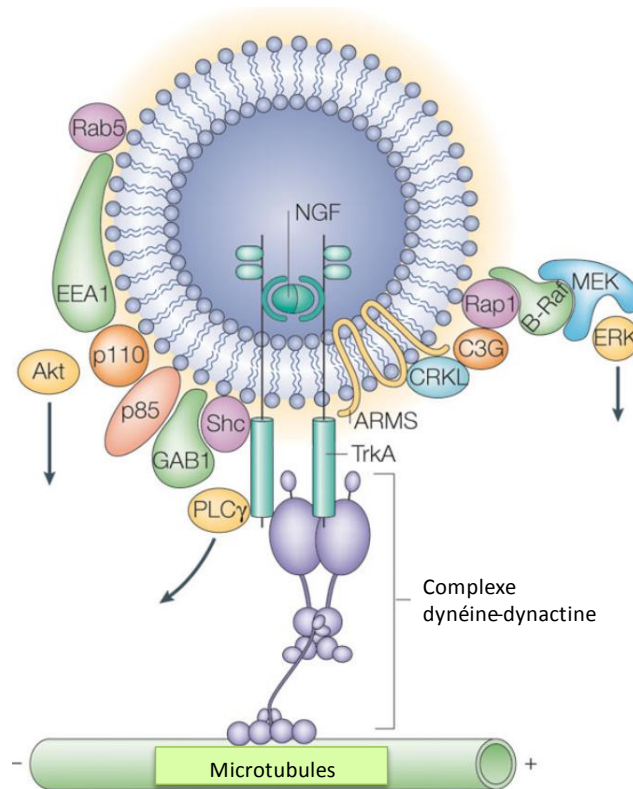
## INTRODUCTION

tels que la petite protéine G Rab5 et son effecteur EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*), empêchant leur maturation en endosomes tardifs ou leur progression vers la voie de dégradation lysosomale (Valdez *et al.*, 2005). En outre, une étude plus récente a montré que la coronine-1 est recrutée au complexe NGF/TrkA dans les endosomes de signalisation, à proximité des corps cellulaires, et joue un rôle essentiel dans la stabilité de ces endosomes en bloquant leur fusion avec les lysosomes (Suo *et al.*, 2014). Les endosomes de signalisation contenant les complexes NGF/TrkA actifs seraient ainsi transportés de façon rétrograde le long de microtubules vers les corps cellulaires neuronaux, où ils activeraient alors sélectivement des voies de signalisation, comme celles de Erk5 et PI3K/Akt, pour favoriser l'expression de gènes impliqués dans la survie neuronale (Bhattacharyya *et al.*, 2002 ; Heerssen & Segal, 2002 ; Ye *et al.*, 2003 ; Heerssen *et al.*, 2004). En effet, la formation de ces endosomes sert de plateformes de signalisation aux complexes NGF/TrkA actifs à partir desquelles les signaux sont initiés *via* le recrutement de plusieurs protéines qui ne sont pas exprimées à la membrane cellulaire (Grimes *et al.*, 1996 ; Delcroix *et al.*, 2003). De façon intéressante, les différents composants de la voie Rap1/B-Raf/MEK/Erk ou de la voie PI3K/Akt seraient recrutés au niveau de ces plateformes de signalisation (Figure 20) (Zweifel *et al.*, 2005). D'autres protéines interagissant avec TrkA au niveau des endosomes précoces, comme **APPL1** (*Adapter protein containing PH domain, PTB domain and Leucine zipper motif 1*) et **GIPC1** (*GAIP-interacting protein, C-terminus 1*), semblent également jouer un rôle majeur dans la transduction du signal induite par le NGF au niveau des endosomes de signalisation (Lin *et al.*, 2006 ; Varsano *et al.*, 2006).

Les endosomes de signalisation seraient également responsables de la sélectivité des cinétiques d'activation des MAPK à l'origine des effets biologiques distincts de la signalisation de TrkA, en favorisant notamment la réponse soutenue par rapport à l'activation transitoire. Ainsi, si une signalisation locale, à proximité des terminaisons nerveuses, induit la croissance axonale par l'activation transitoire d'Erk1/2, la signalisation au niveau du corps cellulaire, après transport rétrograde du complexe NGF/TrkA *via* les endosomes de signalisation, impliquerait plutôt l'activation de Erk5 et l'induction de la survie cellulaire (Heerssen & Segal, 2002 ; Yano & Chao, 2004 ; Zweifel *et al.*, 2005). De plus, l'activité de TrkA doit être maintenue tout au long du transport rétrograde du complexe NGF/TrkA pour induire l'effet de survie, puisqu'une inhibition de sa kinase par le K252a entraîne la mort cellulaire (Ye *et al.*, 2003). Par ailleurs, d'autres travaux soutiennent que la signalisation engagée par le NGF et les effets biologiques associés dépendent de la localisation subcellulaire de TrkA et du type cellulaire (Zhang *et al.*, 2000 ; Yano & Chao, 2005).



## INTRODUCTION



**Figure 20 : Représentation schématique d'un endosome de signalisation**

L'internalisation du récepteur TrkA induite par le NGF au niveau des terminaisons nerveuses conduit à la formation d'endosomes particuliers qui servent de plateformes de signalisation. Les effecteurs recrutés sont des marqueurs des endosomes précoces (la petite protéine G Rab5 et son effecteur EEA1), les composants de la voie Rap1/B-Raf/MEK/Erk, les constituants de la voie PI3K/Akt, et la PLC- $\gamma$ 1. Le récepteur TrkA interagit également avec le complexe dynéine-dynactine qui le relie au réseau des microtubules, permettant ainsi le transport rétrograde le long des axones vers les corps cellulaires des neurones (Zweifel *et al.*, 2005).

### *d) Ubiquitination*

Suite à son activation par le NGF, le récepteur TrkA peut être soit poly-ubiquitinylé par des chaînes d'ubiquitine liées par le résidu **K<sup>63</sup>**, soit multi-mono-ubiquitinylé (Komander & Rape, 2012). L'ubiquitination de TrkA est essentiellement impliquée dans l'endocytose et le trafic intracellulaire du récepteur (Acconcia *et al.*, 2009). Ainsi, la poly-ubiquitination de TrkA sur le résidu **K<sup>485</sup>**, régulée par l'E3 ubiquitine ligase TRAF6, est nécessaire non seulement à l'activation de cascades de signalisation menant à la survie et à la différenciation neuronale, mais également à la dégradation du récepteur dans les lysosomes (Geetha *et al.*, 2005 ; Geetha & Wooten, 2008). En outre, le récepteur TrkA est la cible de multiples mono-ubiquitinations qui sont sous le contrôle de plusieurs enzymes. Par exemple, la protéine NEDD4-2 (*Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated 4-2*) interagit avec TrkA et l'ubiquitinye principalement sur le résidu **K<sup>547</sup>**, contribuant ainsi à une diminution de l'expression du récepteur TrkA et à une inhibition de la survie neuronale (Arevalo *et al.*,

## INTRODUCTION

2006b). En effet, la mono-ubiquitination de TrkA par NEDD4-2 favorise l'adressage du récepteur vers les lysosomes, diminuant ainsi le recyclage à la membrane et l'expression du récepteur à la surface cellulaire, et ce même en absence d'une stimulation par le NGF (Georgieva *et al.*, 2011 ; Yu *et al.*, 2011). Récemment, deux études *in vivo*, réalisées à partir de modèles murins exprimant le récepteur TrkA délété de 3 acides aminés présents dans sa région juxtamembranaire ou muté sur son site d'interaction avec NEDD4-2, ont montré que l'ubiquitination de TrkA est impliquée dans les fonctions *in vivo* régulées par le NGF, telles que la survie neuronale et la sensibilité à la douleur thermique et inflammatoire (Kiris *et al.*, 2014 ; Yu *et al.*, 2014). Par ailleurs, comme pour NEDD4-2, il a été rapporté que l'E3 ubiquitine ligase c-Cbl intervient également dans la mono-ubiquitination du récepteur TrkA et dans la dégradation du récepteur dans les lysosomes (Takahashi *et al.*, 2011).

Enfin, une équipe a révélé que SOCS2, un membre d'une nouvelle famille d'ubiquitine ligase récemment identifiée, joue un rôle majeur dans la croissance des neurites induite par le NGF et dans la localisation de TrkA à la surface cellulaire. De façon intéressante, ces effets seraient corrélés avec l'activation prolongée d'Akt et Erk1/2 (Uren *et al.*, 2014). Toutefois, la qualité de l'ubiquitination et les mécanismes par lesquels SOCS2 affecte intrinsèquement le récepteur TrkA demeurent encore inconnus (Uren & Turnley, 2014).

### **D) Les coopérations entre TrkA, p75<sup>NTR</sup> et sortiline**

Les réponses biologiques induites par le (pro)NGF dépendent en grande partie de la mise en place de coopérations entre leurs principaux récepteurs membranaires : TrkA, p75<sup>NTR</sup> et la sortiline. Par exemple, la coopération entre la sortiline et p75<sup>NTR</sup> induit des réponses pro-apoptotiques lors d'une stimulation au proNGF, alors que la collaboration entre TrkA et p75<sup>NTR</sup> favorise plutôt la survie, la croissance des axones et la différenciation des cellules neuronales, principalement sous l'action du NGF (Figure 21) (Barker, 2004 ; Gentry *et al.*, 2004 ; Nykjaer *et al.*, 2005 ; Reichardt, 2006).

#### **1. Les coopérations entre TrkA et p75<sup>NTR</sup>**

La compréhension du mécanisme par lequel TrkA et p75<sup>NTR</sup> peuvent induire des réponses biologiques opposées, notamment la survie et l'apoptose, a longtemps été sujet à débat. Néanmoins, une succession d'études a mis en évidence que la bidirectionnalité de ces effets était très probablement due à une collaboration de p75<sup>NTR</sup> avec TrkA, permettant d'augmenter

## INTRODUCTION

l'affinité et la spécificité de TrkA pour le NGF et de potentialiser sa signalisation, principalement dans un contexte de survie cellulaire (Figure 21).

En effet, bien que le TrkA ait longtemps été considéré comme le récepteur de haute affinité pour le NGF, son affinité pour ce ligand reste similaire à celle de p75<sup>NTR</sup> ( $K_d \approx 10^{-9}$  M) lorsque les deux récepteurs sont exprimés séparément. En revanche, la co-expression de TrkA et p75<sup>NTR</sup> conduit à la mise en place de sites de haute affinité ( $K_d \approx 10^{-11}$  M), par un mécanisme dépendant des domaines transmembranaires et intracellulaires des deux récepteurs (Hempstead *et al.*, 1991 ; Mahadeo *et al.*, 1994 ; Esposito *et al.*, 2001). En outre, l'expression de p75<sup>NTR</sup> améliore également la spécificité de TrkA pour le NGF. En effet, l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-p75<sup>NTR</sup> favorise l'activation de TrkA par la NT-3, suggérant que p75<sup>NTR</sup> diminue l'affinité de TrkA pour cette neurotrophine (Clary & Reichardt, 1994). Le rôle régulateur de p75<sup>NTR</sup> a été retrouvé *in vivo* dans des neurones sympathiques, où le NGF induit une augmentation de l'expression de p75<sup>NTR</sup>, causant à son tour une diminution de la sensibilité des axones à la NT-3 (Brennan *et al.*, 1999 ; Kuruvilla *et al.*, 2004). De façon intéressante, d'autres travaux ont décrit que l'activation de TrkA est altérée en cas d'inhibition de la liaison du NGF sur p75<sup>NTR</sup> (Barker & Shooter, 1994 ; Lachance *et al.*, 1997). De même, l'utilisation d'une forme mutante du NGF capable de se fixer uniquement sur TrkA est moins efficace que le NGF non muté, pour activer TrkA dans les cellules exprimant les deux récepteurs (Ryden *et al.*, 1997).

L'ensemble de ces données a amené à penser que p75<sup>NTR</sup> et TrkA interagissent directement pour former des complexes de récepteurs à l'origine des sites de haute affinité pour le NGF. Cette idée a été renforcée par plusieurs études de co-immunoprécipitation montrant que p75<sup>NTR</sup> peut s'associer à TrkA (Huber & Chao, 1995 ; Gargano *et al.*, 1997 ; Bibel *et al.*, 1999 ; Lad *et al.*, 2003). Toutefois, une étude structurale plus récente n'a pas pu confirmer la formation d'un complexe tripartite p75<sup>NTR</sup>/NGF/TrkA (stœchiométrie 1:2:1) et les auteurs ont alors proposé un autre modèle pour expliquer la mise en place des sites de haute affinité pour le NGF, dans lequel p75<sup>NTR</sup> présenterait le NGF à TrkA (Barker, 2007 ; Wehrman *et al.*, 2007). Cependant, la constatation qu'une forme mutée de p75<sup>NTR</sup>, empêchant toute liaison au NGF, conserve la capacité d'augmenter l'affinité de TrkA pour le NGF a rendu ce scénario peu probable (Esposito *et al.*, 2001). De plus, la protéine NRH2, homologue de p75<sup>NTR</sup> dépourvu des domaines CRD caractéristiques de la liaison au NGF, peut interagir avec TrkA et aboutit également à la création d'un site de haute affinité pour le NGF (Murray *et al.*,

## INTRODUCTION

2004). Récemment, l'interaction directe entre les domaines intracellulaires de TrkA et p75<sup>NTR</sup> a également été mise en évidence (Iacarusso *et al.*, 2011).

Aussi, une autre théorie soutenant la régulation des effets bidirectionnels du NGF par la coopération entre TrkA et p75<sup>NTR</sup>, serait la mise en place d'interactions entre les voies de signalisation sous-jacentes aux deux récepteurs. En effet, de telles interactions permettraient une convergence des voies de signalisation, aboutissant à un effet biologique différent de celui induit par la seule signalisation de TrkA ou de p75<sup>NTR</sup> (Chao, 2003 ; Barker, 2007). Dans ce sens, une étude a montré que le NGF peut, en se liant à p75<sup>NTR</sup>, induire la voie pro-apoptotique JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) dans les oligodendrocytes qui n'expriment pas TrkA (Casaccia-Bonnel *et al.*, 1996). En revanche, une co-expression de TrkA dans ce type cellulaire restaure la survie neuronale en induisant la voie des MAPK et en supprimant le signal de mort régulé par p75<sup>NTR</sup>/JNK (Yoon *et al.*, 1998). L'inhibition des voies pro-apoptotiques de p75<sup>NTR</sup> par le récepteur TrkA impliquerait notamment l'activation de Ras, de la PI3K et des PKC (Mazzoni *et al.*, 1999 ; Bilderback *et al.*, 2001 ; Plo *et al.*, 2004). Récemment, une autre équipe a décrit que l'activation de TrkA par le NGF, dans des clones de PC12 déficients en p75<sup>NTR</sup>, induit une faible autophosphorylation de la Y<sup>490</sup>, suivie d'une forte anomalie de la cascade de signalisation PI3K/mTORC2, résultant en une diminution marquée de la croissance des neurites. Ainsi, les auteurs ont conclu que la coopération entre TrkA et p75<sup>NTR</sup> induite par le NGF, est nécessaire à l'activation de la cascade de signalisation PI3K/mTORC2, impliquée dans la différenciation neuronale dans les cellules PC12 (Negrini *et al.*, 2013). En outre, la croissance accélérée des neurites induite par la coopération p75<sup>NTR</sup>/TrkA en réponse au NGF, impliquerait une activation soutenue de Erk1/2 et une régulation sélective du facteur de transcription AP-1 (Diolaiti *et al.*, 2007).

De nombreux travaux ont également rapporté que les interactions entre p75<sup>NTR</sup> et TrkA mettent en jeu des complexes multiprotéiques qui comprennent des protéines associées aux signalisations intracellulaires des deux récepteurs, renforçant ainsi l'idée d'une convergence (Gentry *et al.*, 2004 ; Nykjaer *et al.*, 2005 ; Reichardt, 2006). Un premier exemple a été décrit par l'interaction de la calvéoline-1 avec p75<sup>NTR</sup> et TrkA au sein de microdomaines membranaires invaginés, appelés calvéoles. L'association de la calvéoline avec p75<sup>NTR</sup> serait nécessaire à l'hydrolyse des sphingolipides et la formation de céramides, conduisant à la mort cellulaire (Bilderback *et al.*, 1997). Sa liaison à TrkA favoriserait également cette voie pro-apoptotique, en bloquant la phosphorylation du récepteur (Bilderback *et al.*, 1999). En effet, la phosphorylation de TrkA conduit à l'activation de la PI3K, impliquée dans l'inhibition de

## INTRODUCTION

l'hydrolyse des sphingolipides induite par p75<sup>NTR</sup> (Bilderback *et al.*, 2001). La formation d'un complexe entre la protéine adaptatrice p62 et l'E3 ubiquitine ligase TRAF6 semble également servir de plateforme d'interaction à p75<sup>NTR</sup> et TrkA, afin de favoriser l'activation de la protéine NF- $\kappa$ B (Wooten *et al.*, 2001a). Par ailleurs, ce complexe joue un rôle important dans l'internalisation et la signalisation du récepteur TrkA (Geetha *et al.*, 2005). La protéine transmembranaire ARMS a aussi été identifiée dans un complexe ternaire incluant les récepteurs TrkA et p75<sup>NTR</sup> (Chang *et al.*, 2004). En réponse au NGF, la protéine ARMS peut être phosphorylée par TrkA, et conduire alors à l'activation de voies de signalisation intracellulaires (Kong *et al.*, 2001 ; Arevalo *et al.*, 2006a). Une autre étude a suggéré que l'association de la protéine FAIM (*Fas Apoptosis Inhibitor Molecule*) avec les récepteurs TrkA et p75<sup>NTR</sup> influence la croissance des neurites induite par le NGF (Sole *et al.*, 2004). Enfin, p75<sup>NTR</sup> peut interagir directement avec la protéine Shc, stimuler sa phosphorylation et ainsi favoriser la signalisation de TrkA (Epa *et al.*, 2004).

La protéolyse du récepteur p75<sup>NTR</sup> est aussi une bonne illustration de la coopération entre les voies de signalisation intracellulaires des deux récepteurs. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, des travaux récents ont montré que la génération de p75<sup>NTR</sup>-ICD est finement régulé par l'axe NGF/TrkA, et qu'en retour ce fragment influence lui-même l'activité de TrkA (Urrea *et al.*, 2007 ; Ceni *et al.*, 2010 ; Kommaddi *et al.*, 2011). Ainsi, le fragment p75<sup>NTR</sup>-ICD interagirait avec TrkA et provoquerait un changement conformationnel dans son domaine extracellulaire, augmentant ainsi la liaison du NGF et l'activation du récepteur. Il en résulterait alors une promotion de la signalisation trophique du NGF, aboutissant notamment à une croissance accrue des neurites (Matusica *et al.*, 2013).

Enfin, un autre facteur important dans la détermination de la réponse cellulaire induite par le NGF est le ratio d'expression entre les récepteurs TrkA et p75<sup>NTR</sup> (Chao & Hempstead, 1995 ; Twiss *et al.*, 1998 ; Gatzinsky *et al.*, 2001).

### **2. Les coopérations entre p75<sup>NTR</sup> et sortiline**

La découverte des propriétés biologiques du proNGF a permis de mieux élucider les mécanismes responsables de la bidirectionnalité du système TrkA/p75<sup>NTR</sup> (Teng *et al.*, 2010). En effet, le proNGF stimule la mort des neurones sympathiques et des oligodendrocytes *via* le récepteur p75<sup>NTR</sup>, mais est incapable d'induire la survie régulée par TrkA (Lee *et al.*, 2001 ; Beattie *et al.*, 2002). Aussi, il a été suggéré que le proNGF pouvait lier préférentiellement le récepteur p75<sup>NTR</sup> conduisant à la mort cellulaire, alors que le NGF fait plutôt intervenir la signalisation de TrkA ou le complexe TrkA/p75<sup>NTR</sup> pour stimuler la survie cellulaire (Chao,

## INTRODUCTION

2003 ; Nykjaer *et al.*, 2005). Toutefois, le proNGF est capable de lier les deux récepteurs avec la même affinité ( $K_d \approx 15$  nM), suggérant ainsi qu'un autre facteur entre en jeu. L'identification de la sortiline en tant que récepteur des proneurotrophines avec une constante d'affinité d'environ 5 nM a permis de résoudre cette énigme. En outre, la co-expression de p75<sup>NTR</sup> et la sortiline permet la création de sites de haute affinité pour le proNGF ( $K_d \approx 160$  pM). En effet, le proNGF interagit avec la sortiline par son prodomaine et dans le même temps avec p75<sup>NTR</sup> par sa partie mature, formant ainsi un complexe ternaire dont chacun des membres est nécessaire à l'induction de l'apoptose (Nykjaer *et al.*, 2004 ; Feng *et al.*, 2010). Plus récemment, une équipe a cartographié le site d'interaction entre la sortiline et p75<sup>NTR</sup> en réalisant une analyse de résonance plasmonique de surface et des expériences de co-immunoprécipitation et de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) à partir de constructions chimériques des récepteurs et de formes tronquées de p75<sup>NTR</sup>. Les auteurs ont alors montré que la formation du complexe p75<sup>NTR</sup>/sortiline repose sur des points de contact localisés dans les domaines extracellulaires des récepteurs : une séquence juxtamembranaire de 23 acides aminés du récepteur p75<sup>NTR</sup> et très probablement le module 10CC de la sortiline (Skeldal *et al.*, 2012). De façon intéressante, le proBDNF et la proNT-3 permettent également la formation d'un complexe avec la sortiline et p75<sup>NTR</sup> afin d'induire la mort cellulaire des neurones sympathiques (Teng *et al.*, 2005 ; Yano *et al.*, 2009). L'effet pro-apoptotique de la proNT-3 implique l'activation de la voie JNK, qui serait sous-jacente à la coopération p75<sup>NTR</sup>/sortiline (Yano *et al.*, 2009).

A ce jour, peu de données ont été recueillies sur la régulation du complexe ternaire proNGF/p75<sup>NTR</sup>/sortiline, et les voies de signalisation par lesquelles le proNGF induit la mort cellulaire sont encore mal comprises (Skeldal *et al.*, 2011 ; Nykjaer & Willnow, 2012). Néanmoins, une étude a montré que la protéine NRH2 contribue au maintien de la signalisation des proneurotrophines en favorisant l'association p75<sup>NTR</sup>/sortiline et en augmentant l'expression de la sortiline à la surface cellulaire (Kim & Hempstead, 2009). En outre, la sortiline joue un rôle essentiel dans le clivage de p75<sup>NTR</sup> en augmentant la production du fragment p75<sup>NTR</sup>-ICD dans les endosomes, afin de promouvoir la mort cellulaire en réponse d'une stimulation par le proNGF, suggérant ainsi que la protéolyse de p75<sup>NTR</sup> peut être une voie de signalisation sous-jacente au complexe p75<sup>NTR</sup>/sortiline (Skeldal *et al.*, 2012).

### **3. Les coopérations entre TrkA et sortiline**

Au cours de ces dernières années, plusieurs travaux ont rapporté que des formes mutées de proNGF, incapables de générer du NGF mature, pourraient également promouvoir l'activation

## INTRODUCTION

du récepteur TrkA et de sa signalisation sous-jacente, telle que la voie des MAPK, conduisant alors à la survie cellulaire, mais à un degré moindre que celle induite par le NGF (Clewes *et al.*, 2008 ; Sobottka *et al.*, 2008 ; Armugam *et al.*, 2012). En revanche, au même moment, une autre équipe a décrit que le proNGF ne lierait pas directement TrkA, et qu'un clivage intracellulaire par la furine serait nécessaire pour générer le NGF mature, qui pourrait alors activer le récepteur (Boutilier *et al.*, 2008). De façon intéressante, l'activité biologique du proNGF dépendrait du niveau d'expression relative entre les récepteurs p75<sup>NTR</sup> et TrkA. Ainsi, un faible ratio TrkA/p75<sup>NTR</sup> favorise la propriété pro-apoptotique du proNGF, alors que la fonction de survie serait plutôt stimulée lorsque ce même ratio est élevé (Masoudi *et al.*, 2009). Par ailleurs, le proNGF a été co-immunoprécipité avec TrkA dans les cellules PC12, suggérant une possible fixation de la proneurotrophine sur ce récepteur (Fahnestock *et al.*, 2004b). Récemment, l'équipe de Nykjaer a décrit une interaction entre la sortiline et les récepteurs Trk faisant intervenir leurs domaines extracellulaires respectifs. La sortiline permettrait ainsi l'adressage des Trk à la surface cellulaire et leur signalisation, conduisant notamment à la survie neuronale (Vaegter *et al.*, 2011). L'ensemble de ces travaux suggère une éventuelle signalisation *via* l'axe proNGF/TrkA/sortiline et laisse donc entrevoir l'existence d'une régulation plus fine des réponses biologiques induites par le (pro)NGF. Ainsi, notre équipe a montré que le proNGF induit la formation d'un complexe sortiline/TrkA, conduisant à l'activation de TrkA et à l'invasion des cellules cancéreuses de sein. De plus, les capacités invasives de ces cellules ne dépendent pas de l'expression de p75<sup>NTR</sup>, suggérant ainsi que la formation d'un complexe sortiline/p75<sup>NTR</sup> n'est pas requise pour activer la signalisation pro-invasive du proNGF (Figure 21) (Demont *et al.*, 2012).

## INTRODUCTION

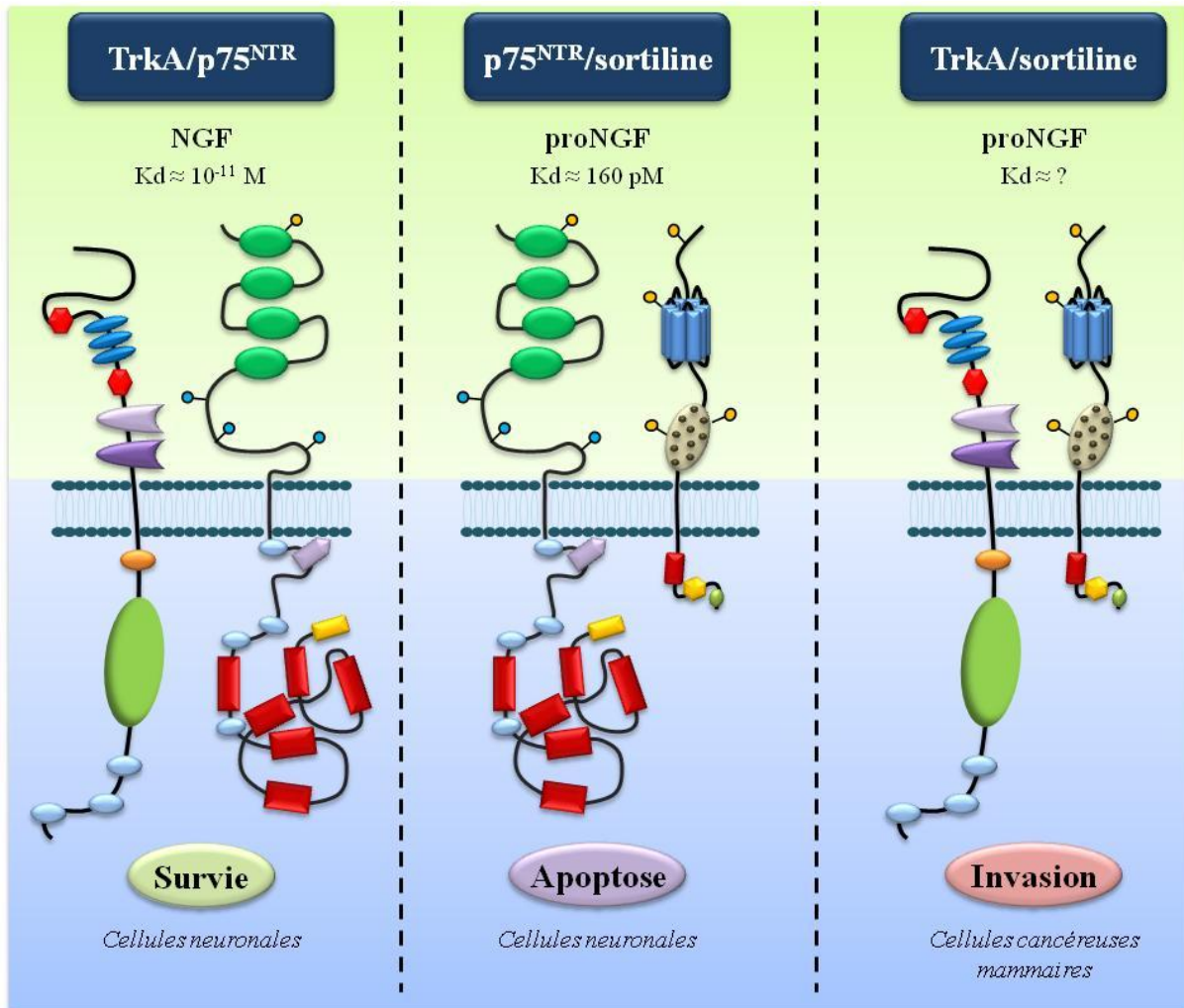


Figure 21 : Les coopérations entre TrkA, p75<sup>NTR</sup> et sortiline

La coopération de p75<sup>NTR</sup> avec TrkA permet la formation d'un site de haute affinité pour le NGF et contribue à potentialiser les voies de signalisation impliquées dans la survie des cellules neuronales. En association avec la sortiline, le récepteur p75<sup>NTR</sup> présente une grande affinité pour le proNGF et induit l'apoptose des cellules neuronales. La collaboration TrkA/sortiline a été mise en évidence dans les cellules cancéreuses de sein et joue un rôle majeur dans l'invasion de ces cellules (adapté de (Lu et al., 2005)).

### E) NGF, proNGF et TrkA dans les cancers

La signalisation de l'axe NGF/TrkA est principalement impliquée dans le développement et le maintien du système nerveux central et périphérique. Cependant, sans oublier que le NGF et TrkA ont été respectivement découverts dans des sarcomes murins et un carcinome du côlon, un nombre croissant de données indique que le NGF et TrkA sont également exprimés dans des cellules non-neuronales et peuvent avoir des effets pro- ou anti-tumoraux dans de nombreux cancers (Kruttschger et al., 2006). En revanche, les travaux associant le proNGF à la pathologie cancéreuse restent encore parcellaires (Tableau 11).



## INTRODUCTION

**Tableau 11 : Effets pro et anti-tumoraux de l'axe NGF/TrkA et du proNGF dans les cancers**

*Vue d'ensemble des effets biologiques pro-tumoraux (en mauve) et anti-tumoraux (en vert) stimulés par l'axe NGF/TrkA et/ou par le proNGF, observés dans le mélanome, le neuroblastome, et les cancers de l'ovaire, du pancréas, du poumon NPC (non à petites cellules), de la prostate et du sein. A ce jour, l'expression du proNGF n'a pas été identifiée dans le neuroblastome et les cancers de l'ovaire et du poumon ; son action dans la migration des cellules cancéreuses pancréatiques et prostatiques est seulement suggérée. L'intervention de la sortiline est importante dans les capacités migratoires induites par le proNGF dans les cellules cancéreuses mammaires et de mélanome, et probablement dans les cellules tumorales pancréatiques.*

<b>Cancer</b>	<b>(NGF)/TrkA</b>	<b>proNGF</b>
<b>Mélanome</b>	Migration/Prolifération	Migration ( <i>via</i> la sortiline)
<b>Neuroblastome</b>	Différenciation	-
	Survie/Angiogenèse/Tumorigenèse ( <i>via</i> TrkA-III)	
<b>Ovaire</b>	Prolifération/Angiogenèse	-
<b>Pancréas</b>	Survie/Prolifération/Croissance/ Invasion cellulaire et péri-neurale	Migration ( <i>via</i> la sortiline) ?
<b>Poumon (NPC)</b>	Survie/Croissance sans ancrage/Angiogenèse	-
<b>Prostate</b>	Prolifération/Migration/Invasion/ Métastases	Migration ?
<b>Sein</b>	Survie/Prolifération/Migration/ Invasion/Angiogenèse/Métastases	Migration/Invasion ( <i>via</i> la sortiline)

L'expression du (pro)NGF et de TrkA contribue le plus souvent à la progression tumorale. Leurs effets peuvent se traduire généralement par une augmentation de la survie, la prolifération, la migration/invasion, l'angiogenèse et des métastases. Ainsi, bien que les données soient encore fragmentaires pour certains cancers, l'action pro-tumorale de l'axe NGF/TrkA a été reportée dans le mélanome (Truzzi *et al.*, 2008) et les cancers de l'ovaire (Campos *et al.*, 2007 ; Odegaard *et al.*, 2007 ; Tapia *et al.*, 2011 ; Urzua *et al.*, 2012), du pancréas (Sakamoto *et al.*, 2001 ; Zhu *et al.*, 2001 ; Okada *et al.*, 2004 ; Diao *et al.*, 2012), du poumon NPC (*Non à Petites Cellules*) (Perez-Pinera *et al.*, 2007 ; Lu *et al.*, 2014), de la prostate (Sortino *et al.*, 2000 ; Festuccia *et al.*, 2007 ; Arrighi *et al.*, 2010) et du sein (Descamps *et al.*, 2001b ; Lagadec *et al.*, 2009). Dans le neuroblastome, TrkA induit la différenciation des cellules cancéreuses sous l'effet du NGF (Nakagawara & Brodeur, 1997 ; Brodeur *et al.*, 2009 ; Light *et al.*, 2012), bien que l'isoforme TrkA-III soit capable, par son auto-activation, d'augmenter la survie, l'angiogenèse *in vivo* et la tumorigenèse (Tacconelli *et*

## INTRODUCTION

*al.*, 2004 ; Ruggeri *et al.*, 2014). En outre, si l'intervention potentielle du proNGF dans la migration des cellules cancéreuses a été suggérée dans les cancers du pancréas (Zhu *et al.*, 2002) et de la prostate (Delsite & Djakiew, 1999), celle-ci a été confirmée dans le cancer du sein (Demont *et al.*, 2012) et dans les mélanomes (Shonukan *et al.*, 2003 ; Truzzi *et al.*, 2008). De façon intéressante, l'expression de la sortiline semble également impliquée dans la capacité migratoire des cellules cancéreuses pancréatiques (Mijatovic *et al.*, 2007), mammaires (Demont *et al.*, 2012), et de mélanomes (Truzzi *et al.*, 2008).

Par ailleurs, des protéines chimériques oncogéniques constitutivement actives, issues de la fusion du domaine kinase du gène *NTRK1* avec des séquences d'autres gènes, ont été identifiées dans des carcinomes thyroïdiens papillaires (Greco *et al.*, 2010), des adénocarcinomes pulmonaires (Vaishnavi *et al.*, 2013) et des carcinomes colorectaux (Ardini *et al.*, 2014).

### **1. NGF et proNGF dans le cancer du sein**

Dans le cadre du cancer du sein, le NGF et le proNGF exercent une influence exclusivement pro-tumorale. En effet, les travaux de notre laboratoire ont mis en évidence la sécrétion de ces deux facteurs par les cellules épithéliales cancéreuses mammaires qui, *via* une boucle autocrine, stimulent leur propre prolifération, survie et/ou migration/invasion (Descamps *et al.*, 2001b ; Dolle *et al.*, 2003 ; Demont *et al.*, 2012). En revanche, les cellules épithéliales normales de sein, qui expriment pourtant elles aussi les récepteurs TrkA et p75<sup>NTR</sup>, ne répondent pas au NGF (Descamps *et al.*, 1998). L'utilisation de modèles de surexpression, d'inhibiteurs pharmacologiques et d'anticorps neutralisants a permis de discriminer le rôle des récepteurs TrkA et p75<sup>NTR</sup> dans les effets pro-tumoraux du (pro)NGF. Ainsi, le récepteur TrkA, qu'il soit activé par le NGF ou de façon constitutive par sa propre surexpression, induit la prolifération, la survie, la migration/invasion des cellules cancéreuses de sein *in vitro* et *in vivo*, et augmente l'angiogenèse et la formation de métastases, en activant notamment les voies de signalisation PI3K/Akt, Erk1/2 et p38MAPK (Descamps *et al.*, 2001b ; Lagadec *et al.*, 2009). Des travaux complémentaires ont également révélé que les protéines Ku70 et Ku86 interagissent avec TrkA et régulent respectivement la survie et l'invasion cellulaire (Com *et al.*, 2007 ; Lagadec *et al.*, 2010). De plus, le ciblage de l'axe NGF/TrkA par l'utilisation d'anticorps bloquant le NGF, de petit ARN interférent anti-NGF ou d'un inhibiteur de l'activité kinasique de TrkA (K252a), réduit significativement la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffes (Adriaenssens *et al.*, 2008). Le récepteur p75<sup>NTR</sup> recrute quant à lui l'adaptateur TRADD (*TNF Receptor-Associated Death Domain protein*) sous l'effet du NGF,

## INTRODUCTION

afin de stimuler NF- $\kappa$ B et la survie cellulaire (Descamps *et al.*, 2001b ; El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003). La surexpression de p75<sup>NTR</sup> favorise également la survie des cellules cancéreuses mammaires *via* la protéine p21<sup>WAF1</sup> (Verbeke *et al.*, 2010). En outre, un inhibiteur spécifique de p75<sup>NTR</sup> (p75<sup>NTR</sup> (p75) induit l'apoptose des cellules cancéreuses de sein (Naderi & Hughes-Davies, 2009). Par ailleurs, le proNGF stimule l'invasion des cellules cancéreuses de sein en activant les voies PI3K/Akt et Src. Cet effet pro-invasif nécessite l'interaction entre TrkA et la sortiline mais ne requiert pas l'intervention de p75<sup>NTR</sup> (Demont *et al.*, 2012).

En plus de son action autocrine, le NGF produit par les cellules cancéreuses mammaires agit également de manière paracrine puisqu'il induit des effets pléiotropes sur les cellules endothéliales en augmentant leur migration/invasion, leur perméabilité, et leur tubulogénèse (Dolle *et al.*, 2005a ; Romon *et al.*, 2010). Ces effets sont corrélés à une activité accrue de MMP-2 et de l'enzyme NOS (*Nitric Oxide Synthase*) et à une augmentation de la sécrétion de VEGF par les cellules endothéliales, en réponse au NGF. En outre, l'invasion des cellules endothéliales est régulée par l'activation du récepteur TrkA et des voies PI3K/Akt et MAPK.

D'un point de vue clinicopathologique, les quantités d'ARNm de TrkA et p75<sup>NTR</sup> dans des homogénats de résections tumorales sont corrélées à un bon pronostic (Descamps *et al.*, 2001a). En revanche, la forme active de TrkA (phospho-TrkA) est fréquemment retrouvée dans les effusions et les récurrences locorégionales (environ 90%) et dans près de 40% des tumeurs primaires, suggérant un rôle dans la progression tumorale (Davidson *et al.*, 2004). De plus, le NGF est surexprimé dans la quasi-majorité des tumeurs mammaires, en comparaison avec l'épithélium normal (Adriaenssens *et al.*, 2008). Récemment, Song et ses collaborateurs ont essayé d'identifier les voies de signalisation impliquées dans le cancer du sein, en étudiant les niveaux d'expression de 1243 ARNm et de 131 (phospho-)protéines entre les tissus sains et tumoraux. Ils ont notamment montré que le NGF est altéré au niveau génique et protéique, confortant ainsi l'idée que la signalisation du NGF joue un rôle fondamental dans le cancer du sein (Song *et al.*, 2014).

### **2. L'axe NGF/TrkA, une cible thérapeutique dans les cancers**

La signalisation de l'axe NGF/TrkA joue un rôle fondamental dans le développement tumoral de nombreux cancers et est, par conséquent, depuis plusieurs années, la cible de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses (Molloy *et al.*, 2011). Ces approches thérapeutiques visent soit à inhiber l'activité kinase des récepteurs Trk *via* des dérivés du **K252a**, soit à

## INTRODUCTION

bloquer l'action du NGF en utilisant des anticorps neutralisants ou des peptides mimétiques antagonistes (Eibl *et al.*, 2012 ; McCarthy & Walker, 2014).

L'efficacité de ces inhibiteurs a notamment été étudiée dans le cancer de la prostate, où la signalisation induite par l'axe NGF/TrkA favorise la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses (Papatsoris *et al.*, 2007 ; Arrighi *et al.*, 2010). Ainsi, des travaux ont d'abord montré les effets antiprolifératifs du K252a dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses prostatiques (Delsite & Djakiew, 1996 ; Sortino *et al.*, 2000). De plus, deux analogues du K252a, le **CEP-751** et le **CEP-701 (lestaurtinib)**, ont montré une efficacité anti-tumorale significative puisqu'ils peuvent induire l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques et diminuer la formation de métastases dans des modèles murins de xénogreffes (Dionne *et al.*, 1998 ; George *et al.*, 1999 ; Weeraratna *et al.*, 2001). Le CEP-701 peut également inhiber l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques *in vivo* (Festuccia *et al.*, 2007) et a fait l'objet d'un essai clinique en phase II dans ce cancer (NCT00081601). Par ailleurs, l'administration conjointe de lestaurtinib et de pertuzumab a un effet synergique sur l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses prostatiques (Festuccia *et al.*, 2009). Outre les approches visant le récepteur TrkA, une étude a rapporté que des anticorps anti-NGF sont capables d'inhiber la migration de deux lignées cellulaires cancéreuses prostatiques (DU 145 et PC-3) (Warrington & Lewis, 2011).

Dans le cancer du pancréas, l'utilisation du lestaurtinib ou d'anticorps neutralisants anti-NGF ont également montré une efficacité anti-tumorale significative dans des modèles précliniques de xénogreffe (Miknyoczki *et al.*, 1999 ; Miknyoczki *et al.*, 2002).

Le K252a apparaît aussi comme une thérapie valable pour le traitement des patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires (Perez-Pinera *et al.*, 2007)

Dans le cancer du sein, en plus du K252a ou des anticorps neutralisants anti-NGF qui entraînent une réduction de la croissance tumorale dans un modèle murin de xénogreffes (Adriaenssens *et al.*, 2008), l'axe NGF/TrkA peut aussi être ciblé de façon indirecte. En effet, l'inhibition de l'expression de HER2 diminue l'effet du NGF sur la prolifération des cellules cancéreuses (Tagliabue *et al.*, 2000). De même, le tamoxifène inhibe l'effet mitogène du NGF (Chiarenza *et al.*, 2001).

Par ailleurs, les cancers du côlon et du poumon présentant un réarrangement du gène *NTRK1* semblent sensibles au ciblage du récepteur TrkA par le **NMS-P626**, **ARRY-470** ou **AZD7451**, ravivant ainsi la nécessité de développer des inhibiteurs anti-TrkA plus spécifiques (Vaishnavi *et al.*, 2013 ; Ardini *et al.*, 2014 ; Tatematsu *et al.*, 2014). En effet, le CEP-701 et

## INTRODUCTION

les autres dérivés du K252a sont des inhibiteurs multi-kinases, ciblant non seulement les récepteurs de la famille Trk mais aussi d'autres protéines à activité tyrosine kinase comme FLT3 ou JAK/STAT (*Janus-Associated Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*). Dans ce sens, d'autres molécules inhibitrices anti-Trk plus spécifiques, comme l'**AZ-23**, le **GNF-5837** ou le **PHA-848125 AC** ont fait l'objet d'études précliniques dans des modèles de xénogreffes ou dans des tumeurs solides métastatiques (Thress *et al.*, 2009 ; Albaugh *et al.*, 2012 ; Weiss *et al.*, 2012).

Au cours de ces dernières années, le développement de thérapies anti-TrkA et anti-NGF s'est accéléré avec la découverte de l'implication de l'axe NGF/TrkA dans la souffrance induite par le cancer (Wang *et al.*, 2009b ; Kumar & Mahal, 2012 ; Lozano-Ondoua *et al.*, 2013 ; McKelvey *et al.*, 2013). En particulier, le développement de métastases osseuses chez des patientes atteintes d'un cancer du sein est généralement accompagné d'une douleur accrue au niveau des os. Les fibres nerveuses qui innervent les cellules cancéreuses mammaires au niveau des os sont notamment sous le contrôle de l'axe NGF/TrkA (Bloom *et al.*, 2011). Le NGF pourrait être sécrété à la fois par les cellules cancéreuses de sein et les cellules stromales associées à la tumeur pour agir ensuite sur les récepteurs TrkA exprimés sur les cellules nerveuses. Un traitement avec le Mab 911 (Rinat/Pfizer), un anticorps monoclonal bloquant la liaison du NGF sur TrkA et p75<sup>NTR</sup> et inhibant la phosphorylation de TrkA, a ainsi montré une inhibition efficace de la dissémination des fibres nerveuses et une diminution de la douleur (Bloom *et al.*, 2011 ; Jimenez-Andrade *et al.*, 2011). Par ailleurs, le **Tanezumab** (RN-624), un autre anticorps monoclonal prévenant la liaison du NGF à TrkA, a fait l'objet d'une évaluation en étude clinique de phase II, en tant que thérapie complémentaire chez les patients souffrant d'une douleur due à des métastases osseuses (NCT00545129). La douleur neuropathique peut également être réduite en utilisant des peptides synthétiques inhibiteurs de TrkA ou des inhibiteurs anti-Trk comme ARRY-470 (Ghilardi *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2010).

En conclusion, l'ensemble de ces données indique que la compréhension et le décryptage de la signalisation pro-tumorale du NGF et de ses récepteurs dans le cancer du sein sont des enjeux majeurs pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques anticancéreuses.

---

# **DEMARCHE EXPERIMENTALE**

---

### Contexte scientifique

Aujourd'hui, la formation de métastases est la principale cause de décès chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (Rabbani & Mazar, 2007). Au cours de ces dernières décennies, des résultats efficaces et prometteurs dans le traitement des tumeurs primaires et des métastases ont été obtenus par le ciblage des RTK. Néanmoins, les effets de ces thérapies ciblées sont souvent contrecarrés par la mise en place de phénomènes de résistance pouvant conduire à la récurrence. Les mécanismes à l'origine de cette récurrence sont principalement générés par l'activation de réseaux de signalisation compensatoires qui impliquent notamment des coopérations entre les récepteurs aux facteurs de croissance et d'autres protéines (RTK, molécules d'adhésion cellulaire) (Guo *et al.*, 2006 ; Jechlinger *et al.*, 2006 ; Brantley-Sieders *et al.*, 2008 ; Drabsch & ten Dijke, 2011 ; Paulson *et al.*, 2013). La compréhension de ces mécanismes est essentielle pour renforcer l'efficacité de la thérapie anticancéreuse (Goltsov *et al.*, 2011). L'identification des facteurs de croissance impliqués, ainsi que leurs récepteurs s'avère donc primordiale pour prévenir ces phénomènes de résistance.

Dans ce contexte, le laboratoire INSERM U908 a mis en évidence que la signalisation de l'axe NGF/TrkA favorise la mise en place des propriétés tumorigènes et métastatiques des cellules cancéreuses de sein. En effet, les travaux de notre laboratoire ont montré que le NGF agit de manière autocrine pour stimuler la croissance et la migration/invasion des cellules épithéliales cancéreuses mammaires, alors qu'il n'a aucun effet sur les cellules épithéliales normales (Descamps *et al.*, 1998 ; Dolle *et al.*, 2003 ; Demont *et al.*, 2012). Les effets mitogènes et invasifs du NGF sont liés à l'activation du récepteur TrkA et des voies de signalisation Erk1/2, PI3K/Akt et Src (Descamps *et al.*, 2001b ; Demont *et al.*, 2012). En outre, nous avons également démontré que le NGF participe à la croissance tumorale dans des modèles précliniques de xénogreffe en souris SCID, et se présente comme une cible thérapeutique potentielle dans le cancer du sein (Adriaenssens *et al.*, 2008). La phosphorylation du récepteur TrkA joue également un rôle majeur dans le développement du cancer du sein puisque l'utilisation du K252a diminue la prolifération, la survie et la migration/invasion des cellules cancéreuses de sein *in vitro* et *in vivo*, ainsi que l'angiogenèse et la formation de métastases (Lagadec *et al.*, 2009). Des travaux complémentaires ont permis d'obtenir un premier aperçu de l'interactome de TrkA avec l'identification des protéines Ku70 et Ku86 intervenant respectivement dans la survie et l'invasion cellulaire (Com *et al.*, 2007 ; Lagadec *et al.*, 2010).

## DEMARCHE EXPERIMENTALE

Le proNGF a longtemps été considéré comme un simple précurseur métabolique du NGF. Néanmoins, nous avons récemment démontré que l'expression du proNGF est aussi capable à lui seul, sans générer de NGF mature, d'induire l'invasion *in vitro* de la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231. Pour ce faire, il se fixe à la sortiline et permet la formation d'un complexe original sortiline/TrkA qui conduit à l'activation du récepteur TrkA. Cette dernière entraîne alors l'activation de deux voies de transduction qui interviennent dans l'invasion cellulaire : la voie PI3K/Akt et la voie Src (Demont *et al.*, 2012).

### **Objectifs de la thèse**

Au début de ma thèse, les découvertes effectuées par notre laboratoire soulignaient l'importance de l'activation de TrkA, *via* sa phosphorylation induite par le NGF et le proNGF, dans le développement tumoral mammaire. Néanmoins, la signalisation sous-jacente au récepteur TrkA restait encore parcellaire. Dans le but de développer des stratégies de thérapie ciblée contre le récepteur TrkA et/ou ses ligands, il était nécessaire d'approfondir notre connaissance sur les mécanismes d'action des axes NGF/TrkA et proNGF/TrkA.

Les objectifs de mon travail de thèse ont donc consisté à décrypter les signalisations des axes proNGF/TrkA et NGF/TrkA impliquées dans l'effet pro-invasif et la croissance tumorale des cellules cancéreuses de sein.

### **Méthodologie**

Afin d'analyser les signalisations induites par le NGF et le proNGF, nous avons réalisé deux études de protéomique fonctionnelle de l'interactome du récepteur TrkA, à partir d'une population stable de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 surexprimant le récepteur TrkA sauvage. La lignée cellulaire MDA-MB-231, utilisée dans de nombreuses études, est de sous-type « Basal-like » et présente donc un intérêt clinique pour comprendre la résistance thérapeutique puisque les tumeurs de ce sous-type ne répondent pas ou peu aux traitements actuels. De plus, une étiquette HA a été introduite en position N-terminale pour améliorer la détection et la purification du récepteur par la technique d'immunoprécipitation.

Au cours de ma thèse, j'ai également développé plusieurs approches complémentaires qui m'ont permis de valider les interactions physiques et fonctionnelles entre TrkA et les partenaires de signalisation identifiés lors des deux études de protéomique réalisées par spectrométrie de masse :



## DEMARCHE EXPERIMENTALE

- Isolement du protéome membranaire induit spécifiquement par la fixation d'un ligand sur son récepteur, par la technique de purification par biotine/streptavidine.
- Suivi cinétique des relocalisations membranaires de récepteurs, induites suite à un traitement, par cytométrie de flux.
- Caractérisation des interactions physiques entre deux protéines par la technique de Duolink® *in vitro* (ou PLA, *Proximity Ligation Assay*).
- Evaluation de l'activité des RhoGTPases (en collaboration avec le Dr. Elisabeth Génot, INSERM U1053, Université Bordeaux Segalen).

En outre, j'ai confirmé systématiquement l'implication des partenaires de signalisation de TrkA nouvellement identifiés, dans l'effet pro-invasif du (pro)NGF, en appliquant des tests d'invasion en chambre de Boyden. Enfin, nous avons évalué la pertinence biologique de nos découvertes dans le cancer du sein en réalisant une étude *in vivo* en souris SCID.

### **Valorisation des résultats**

L'ensemble des résultats obtenus a fait l'objet de deux publications dans des journaux internationaux, et d'un brevet déposé par la SATT (*Société d'Accélération du Transfert de Technologies*) du Nord :

**Brevet d'invention : Utilisation conjointe d'un inhibiteur de TrkA et d'un inhibiteur de EphA2 pour une utilisation dans le traitement de cancers** (numéro de demande : 1458741, numéro de soumission : 1000256348).

**Article 1 : Identification of the ephrin receptor tyrosine kinase A2 as a pivotal component for proNGF signaling in breast cancer cells** (en préparation).

**Article 2 : NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib** (soumis à *Clinical Cancer Research*).

---

# RESULTATS

---

## RESULTATS

### Brevet d'invention :

## **Utilisation conjointe d'un inhibiteur de TrkA et d'un inhibiteur de EphA2 pour une utilisation dans le traitement de cancers**

Numéro de demande : **1458741**

Numéro de soumission : **1000256348**

Date du dépôt auprès de l'INPI : 16 septembre 2014

Déposants : UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE 1,  
Bâtiment A3, Cité scientifique, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex.

Inventeurs : AUBERT, Léo  
CORBET, Cyril  
GUILBERT, Matthieu  
LE BOURHIS, Xuefen  
TOILLON, Robert-Alain

La présente invention décrit une méthode de traitement des cancers par l'utilisation conjointe d'inhibiteurs dirigés contre les récepteurs TrkA et EphA2.

## RESULTATS

### Article 1 :

## **Identification of the ephrin receptor tyrosine kinase A2 as a pivotal component for proNGF signaling in breast cancer cells**

### **A) Introduction**

Les travaux qui ont conduit à ce premier article ont été initiés par le Dr. Cyril Corbet, avant d'être complétés par mes données de thèse. L'objectif était de préciser les mécanismes d'action impliqués spécifiquement dans l'effet pro-invasif du proNGF, dans les cellules cancéreuses de sein. Pour ce faire, nous avons recherché, *via* une analyse en spectrométrie de masse, les protéines associées au récepteur TrkA après traitement au proNGF et au NGF, dans les cellules MDA-MB-231 HA-TrkA.

### **B) Résultats et conclusion**

Dans cet article, nous démontrons que l'interactome du récepteur TrkA dans les cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 diffère selon le type de ligand utilisé (proNGF ou NGF). Ainsi, le proNGF permet la formation d'un complexe sortiline/TrkA à l'origine du recrutement du récepteur à activité tyrosine kinase EphA2. Ce complexe ternaire intervient dans l'induction des deux voies de signalisation PI3K/Akt et Src, et de l'invasion cellulaire, sous l'effet du proNGF. Nous montrons que la phosphorylation de Src est dépendante d'EphA2 alors que la phosphorylation de TrkA mène à l'activation de la voie PI3K/Akt. De plus, le proNGF est également impliqué dans la progression tumorale *in vivo* puisqu'il contribue au développement de tumeurs mammaires dans des souris SCID xénotransplantées. De façon intéressante, alors qu'un traitement au CEP-701 présente des effets limités, l'administration conjointe de CEP-701 et de siEphA2 diminue de manière significative la croissance des cellules tumorales, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de résistance *via* la voie de signalisation EphA2/Src. Enfin, nous mettons en évidence que le proNGF augmente les capacités pro-invasives de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses prostatiques (DU145, PC-3), de la langue (CAL 33) et du pharynx (FaDu), et nous confirmons que cet effet pro-invasif est lié à l'expression d'EphA2 et probablement à sa coopération avec TrkA.

Cet article est en préparation pour soumission dans la revue :

« *The EMBO Journal* »

## RESULTATS

### Identification of the ephrin receptor tyrosine kinase A2 as a pivotal component for proNGF signaling in breast cancer cells

Corbet Cyril<sup>1,2,3,¥</sup>, Aubert Léo<sup>1,2,3,¥</sup>, Guilbert Matthieu<sup>1,2,3</sup>, Adriaenssens Eric<sup>4</sup>, Finetti Pascal<sup>5</sup>, Birbaum Daniel<sup>5</sup>, Chassat Thierry<sup>6</sup>, Magné Nicolas<sup>7,8</sup>, Bertucci François<sup>5</sup>, Le Bourhis Xuefen<sup>1,2,3</sup> and Toillon Robert-Alain<sup>1,2,3,§</sup>

<sup>1</sup>INSERM U908, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

<sup>2</sup>Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

<sup>3</sup>SIRIC OncoLille, 59000 Lille, France.

<sup>4</sup>CNRS UMR 8161, Lille, France.

<sup>5</sup>Département d'Oncologie Moléculaire, Institut Paoli-Calmette, CRCM, UMR1068 Inserm, UMR7258 CNRS, Aix-Marseille Université, 13273 Marseille, France.

<sup>6</sup>PLETHA, Institut Pasteur de Lille, 59000 Lille, France.

<sup>7</sup>Département de Radiothérapie, Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth, 42270 Saint Priest en Jarez, France.

<sup>8</sup>Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, EMR3738 - Equipe 4, Faculté de Médecine Lyon-Sud, 69000 Lyon, France.

§Correspondence: INSERM U908 "Cell plasticity and Cancer", Bâtiment SN3, 3ème étage, Cité scientifique, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, FRANCE.

Tel: 00 33 (0)3 20 43 65 59

Fax: 00 33 (0)3 20 43 40 38

Email: robert.toillon@univ-lille1.fr

¥ The two authors have equally contributed to this work.

**Running title:** Sortilin/TrkA/EphA2 lead to proNGF signaling

## RESULTATS

### ABSTRACT

Metastasis is the leading cause of mortality in cancer. In numerous cancers, Ephrin type-A receptor 2 (EphA2) overexpression is correlated with poor prognosis and metastatic relapse. EphA2 association with other receptor tyrosine kinases may be relevant to its oncogenic activities. We have also described that TrkA stimulation under proNGF increases the pro-invasive capacities of breast cancer cells. In the present study, by deciphering TrkA signaling induced by proNGF, we depicted a functional association between EphA2 and TrkA in breast cancer cells. We confirmed that proNGF-stimulated invasion was due to the activation of Akt and Src. ProNGF induced a functional interaction between sortilin and TrkA, which in turn recruited EphA2. The association of EphA2 with TrkA was independent of TrkA phosphorylation. Moreover, proNGF-induced Src activation required EphA2 but not TrkA phosphorylation, whereas Akt phosphorylation solely required TrkA phosphorylation but not EphA2. EphA2 silencing totally abolished proNGF-induced cell invasion *in vitro* and strongly reduced tumor growth *in vivo* using SCID mice xenograft models. Interestingly, co-treatment with CEP-701 (tyrosine kinase inhibitor of TrkA) and siEphA2 induced a significant decrease of tumor burden as compared to siEphA2 or CEP-701 alone, indicating that TrkA and EphA2 cooperated *in vivo* to enhance tumor cell growth. Finally, gene expression analysis in a total of 6183 non-redundant invasive breast cancers showed significant correlations between the combined mRNA expression of *NTRK1*, *SORT1* and *EPHA2* and clinico-histological parameters of aggressiveness such as pathological involvement of axillary lymph nodes and metastatic relapse. Altogether, our data evidenced that EphA2 and TrkA could be functionally associated to enhance tumor aggressiveness, thus providing a rationale to consider proNGF as well as the involved signaling pathways as potential therapeutic targets.

**Keywords:** EphA2 / TrkA/ proNGF / metastasis / cancer.

# RESULTATS

## INTRODUCTION

Cancer development is a multi-step process depending on primary tumor growth but also on the ability of tumor cells to metastasize to distant organs (Weigelt et al, 2005). Mechanisms underlying this progression are frequently driven by several sets of growth factors and their cognate receptors (Drabsch & ten Dijke, 2011; Jechlinger et al, 2006). Consequently, current strategies in the development and application of targeted therapies for cancer are based on the disruption of activated growth factors and receptor signaling (Alvarez et al, 2010). However, these strategies cannot be applied to all patients and do not always work because of intrinsic or acquired resistance (Gonzalez-Angulo et al, 2007). For instance, in breast cancer, the basal-like subtype, commonly lacking expression of estrogen and progesterone receptors and not overexpressing HER-2, exhibits an aggressive phenotype and is not suitable for hormonal therapies and HER-2-targeting agents, opening the necessity to discover new therapeutic targets (Fornier & Fumoleau, 2012).

Ephrin type-A receptor 2 (EphA2), a 135 kDa tyrosine kinase receptor, has been reported as an important determinant of the oncogenic and invasive capacities of breast cancer cells (Brantley-Sieders et al, 2008; Zelinski et al, 2001). EphA2 overexpression is associated with a basal-like phenotype and an aggressive behavior of tumor cells (Hochgrafe et al, 2010; Zelinski et al, 2001). Foveau *et al.* (2012) have demonstrated that the downregulation of HIC1 (Hypermethylated in cancer 1), a well-known tumor suppressor, leads to the overexpression of EphA2 in basal-like breast cancer cells. In normal breast epithelial cells, EphA2 is expressed at the cell surface and binds its ligand ephrin-A1 that is presented by neighboring cells and the ligand/receptor interaction contributes to tissue homeostasis (Pasquale, 2008). In cancer cells, EphA2 signaling may be altered (Vaught et al, 2008). Indeed, ephrin-A1-independent activation of EphA2 favors cell invasion and metastasis by MAP-kinase, RhoGTPase and Src activation (Fang et al, 2008; Hiramoto-Yamaki et al, 2010; Miao et al, 2009). Although the ligand-independent activation of EphA2 is not fully understood, it has been described that EphA2 is frequently transactivated by other receptor tyrosine kinases like HER-2 (Brantley-Sieders et al, 2008; Zhuang et al, 2010). This association is thought to be responsible for therapeutic failures of HER-2-targeted therapies.

Nerve Growth Factor (NGF), the prototypical member of neurotrophin family, has been described to play a role in non-neuronal cells, in particular in several types of cancer cells (Adriaenssens et al, 2008; Warrington & Lewis, 2011; Zhu et al, 2002). In breast cancer cells, NGF stimulates cell proliferation, invasion and survival in an autocrine manner (Dolle

## RESULTATS

et al, 2003). NGF exerts its biological effects through two receptors: the tyrosine kinase receptor TrkA and p75<sup>NTR</sup>, a TNF receptor superfamily member (Descamps et al, 2001; Lagadec et al, 2009). We have demonstrated that TrkA is not only activated by NGF but also by its precursor (proNGF). Moreover, the proNGF expression in breast tumors is associated with axillary lymph node invasion. Moreover, we showed that proNGF-stimulated invasion involves both TrkA and sortilin, a Vps10p-domain transmembrane receptor, and this pro-invasive effect requires both Akt and Src activation (Demont et al, 2012). Nevertheless, our knowledge on proNGF-induced signaling remains largely unknown. In this study, we depicted that proNGF induced a kinase network between TrkA and EphA2, which is an important determinant of cancer aggressiveness.

## RESULTS

### **Identification of EphA2 in proNGF-induced TrkA interactome in MDA-MB-231 breast cancer cells**

The proNGF effects were assessed using established MDA-MB-231 cells overexpressing a HA-tagged TrkA receptor. Indeed, we have previously shown that TrkA overexpression in pDisplay vector not only permitted HA tag addition but also induced a moderate TrkA overexpression without altering cell responsiveness to proNGF stimulation (Demont et al, 2012). Thus, analyses of signaling components confirmed that proNGF response was still dependent on TrkA phosphorylation, PI3-kinase/Akt and Src pathways, in accordance with data reported in native cells (Demont et al, 2012) (Figure 1). A proteomic study of TrkA interactome, in MDA-MB-231 cells, was then performed by immunoprecipitation of HA-TrkA with an anti-HA antibody, followed by a mass spectrometry analysis (Table I). As expected, TrkA was undoubtedly identified by MS and MS/MS analyses with 12 different peptides sequenced. Seventeen exclusive proteins showing a differential expression level between proNGF and NGF stimulation were identified after 5 or 30 min of proNGF treatment. We showed that sortilin, which is involved in proNGF response (Demont et al, 2012), was identified after 5 min of proNGF stimulation. We also identified several proteins implicated in cell migration/invasion. Among them, EphA2 receptor was of particular interest, as it is known to be expressed in breast cancer where it favors tumor cell invasion, metastases formation and aggressive behavior (Zelinski et al, 2001). Moreover, we identified Src, cortactin and p130 Cas (BCAR1, *Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1*) which are early effectors of EphA2 (Faoro et al, 2010). Proteins



## RESULTATS

such as SHEP1 (SH2D3C, *SH2 domain-containing protein 3C*), PTP-PEST (PTPN12, *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12*) and RIL (PDLI4, *PDZ and LIM domain protein 4*) were also found to be pulled down with TrkA. These proteins are well known to regulate Src and/or p130 Cas-mediated signaling pathways (Chellaiah & Schaller, 2009; Roselli et al, 2010; Zhang et al, 2009). The other identified proteins including Lasp1 (*LIM and SH3 domain protein 1*), SNAP23 (*Synaptosomal-associated protein 23*), FHL2 (*Four and a half LIM domains protein 2*), HAX1 (*HCLS1-associated protein X-1*), adducin, MARCKS (*Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) gelsolin, and integrins  $\alpha 3\beta 1$  are downstream targets of Src and p130 Cas, which are associated with cytoskeleton remodeling and cell migration (Fadeel & Grzybowska, 2009; Grunewald et al, 2006; Kean et al, 2009; Matsuoka et al, 2000; Mitchell et al, 2010; Zhang et al, 2010).

### **EphA2 is implicated in proNGF-induced invasion of various cancer cell lines by a functional interaction with sortilin/TrkA complex**

Previous works have demonstrated that numerous epithelial cancer cells (breast, prostate, head and neck cancers) are responsive to either NGF or proNGF (Adriaenssens et al, 2008; Demont et al, 2012; Festuccia et al, 2007; Kolokythas et al, 2010; Truzzi et al, 2008; Zhu et al, 2002). So, proNGF effects on invasive capacities of various cancer cells lines were tested. Experiments were performed on tongue (CAL 27, CAL 33), larynx (SQ20B), pharynx (FaDu), prostate (DU145, PC-3), and breast cancer cells (BT20, MDA-MB-231, SkBr3, MCF-7, T47D). After 24h of treatment, BT20, MCF-7, T47D and SkBr3 failed to cross the transwell either in control conditions or proNGF treatments (data not shown). NGF and proNGF enhanced invasion of CAL 33, DU145, PC-3 and MDA-MB-231 cancer cells (Figure 2A). In contrast, FaDu, CAL 27 and SQ20B tumor cells were unresponsive to proNGF. Western blots were then performed to evaluate EphA2, sortilin and TrkA levels in proNGF responsive cells (CAL 33, DU145, PC-3 and MDA-MB-231 cells) (Figure 2B). The three receptors were expressed in all cell lines tested but CAL 33 exhibited only weak EphA2 levels. So, the involvement of EphA2 in proNGF pro-invasive effect was assessed using Boyden chambers in EphA2 overexpressing cells (DU145, PC-3 and MDA-MB-231 cells). As shown in Figure 2C, siEphA2 completely abolished proNGF-induced invasion in DU145, PC-3 and MDA-MB-231 cells. These results indicated that EphA2 takes part in the proNGF-induced invasion of EphA2 overexpressing cells.

Complex formation between TrkA, EphA2 and sortilin was then analyzed by immunoprecipitation in MDA-MB-231 HA-TrkA cells and proximity ligation assays (PLA).

## RESULTATS

Immunoprecipitations were conducted using antibodies against HA, sortilin and EphA2 in MDA-MB-231 HA-TrkA cells (Figure 3). In absence of proNGF, no complex was observed between these three receptors. Upon proNGF treatment, sortilin and EphA2 were co-immunoprecipitated with TrkA. In the presence of NGF, sortilin binding to TrkA was only detected after 30 min of treatment whereas EphA2 binding was not observed neither after 5 min nor 30 min of treatment. These results were confirmed by reverse immunoprecipitation of sortilin and EphA2. Thus, NGF treatment seemed to induce late TrkA/sortilin association but not EphA2 binding. These data suggest that, in presence of NGF, sortilin acts as an endocytic receptor, as previously described in neuronal cell models (Vaegter et al, 2011). PLA assays on MDA-MB-231 cells were then assessed to confirm sortilin/HA-TrkA and HA-TrkA/EphA2 interaction in MDA-MB-231 HA-TrkA (Figure 4). In absence of proNGF, no PLA signal was visualized (Figure 4A, B and C) suggesting that the receptors did not form a pre-existing complex. Upon proNGF treatment, PLA showed interaction between sortilin/TrkA (Figure 4A) and EphA2/TrkA (Figure 4B), indicating that TrkA directly interacted with both sortilin and EphA2 (distance <40 nm). Interestingly, no signal was detected in sortilin/EphA2 PLA experiment suggesting that proNGF did not induce direct interaction between these two receptors. In contrast, NGF (5 min) did not induce any PLA signal revealing the absence of receptor complex. Moreover, PLA assays in native MDA-MB-231, DU145 and PC-3 cells confirmed that TrkA and EphA2 were engaged in a complex under proNGF treatment like in MDA-MB-231 HA-TrkA cells (Figure S1).

We then analyzed the impact of a sequential invalidation of each receptor in the formation of this receptor signaling complex. TrkA expression was first silenced by siRNA (Figure 5A). TrkA and EphA2 were co-immunoprecipitated with sortilin upon 5 min of proNGF treatment in control cells. On the contrary, siTrkA-treated cells did not exhibit TrkA and EphA2 association with sortilin, indicating that sortilin did not form a complex with EphA2 in absence of TrkA. Interestingly, in cells stably expressing kinase-dead TrkA, where TrkA phosphorylation was abolished (Figure 5B), proNGF still induced TrkA association with sortilin and EphA2. These results indicated that TrkA phosphorylation was not necessary for the formation of TrkA/sortilin/EphA2 complex. The implication of sortilin in the former complex was then assessed by the use of neurotensin that inhibits, by competition, proNGF binding to sortilin (Figure 5C). In presence of neurotensin, TrkA did not pull down neither sortilin nor EphA2. Thus, the proNGF binding to sortilin seemed to be necessary for the formation of TrkA/sortilin/EphA2 complex. Finally, EphA2 implication in the receptor complex association was investigated by using EphA2 siRNA (Figure 5D). Transient

## RESULTATS

silencing of EphA2 completely abolished expression of this protein and consequently no binding of EphA2 to TrkA was observed. Nevertheless, in absence of EphA2, proNGF still induced association between TrkA and sortilin. Thus, TrkA was associated to sortilin under proNGF treatment independently of EphA2.

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

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

We previously showed that sortilin is essential for the binding of proNGF in MDA-MB-231 cells (Demont et al, 2012). Moreover, both Akt and Src are involved in the pro-invasive effect of proNGF. To decipher the role of TrkA and EphA2 in Akt and Src activation, we treated cells with TrkA inhibitor (K252a), siRNA anti-EphA2, PI3K inhibitor (LY294002) or Src inhibitor (SKI-1). As shown in Figure 6A, proNGF activated both Akt and Src. Inhibition of TrkA phosphorylation by the use of K252a abolished Akt activation but not Src activation. Similar results were obtained by the use of a kinase-dead mutant of TrkA (Figure 6B). This indicated that Akt activation, but not Src activation, was dependent on TrkA phosphorylation. Inhibition of Akt activation with LY294002 did not modify Src phosphorylation. Similarly, inhibition of Src with SKI-1 did not affect Akt phosphorylation (Figure 6A). So, proNGF-activated Akt and Src were independent pathways. We then determined the involvement of EphA2 in Akt and Src activation by transient transfection of cells with siEphA2 (Figure 6C). EphA2 down-regulation decreased Src but not Akt phosphorylation induced by proNGF. Collectively, we showed that proNGF activated Akt through TrkA phosphorylation while it activated Src by EphA2, independently of TrkA phosphorylation.

The effects of NGF were measured in parallel for comparison (Figure 6D, E and F). NGF increased both Akt and Src phosphorylation, and K252a reversed this activation (Figure 6D). This result was confirmed by the use of a kinase-dead mutant of TrkA (Figure 6E), indicating that NGF-induced Akt and Src phosphorylation required TrkA phosphorylation. Src and Akt activations by NGF were not interconnected (Figure 6D) and

## RESULTATS

did not require EphA2 as silencing of EphA2 only reduced the basal activation of phospho-Akt and phospho-Src, but not the phosphorylation induced by NGF (Figure 6F).

Altogether, our data demonstrated that proNGF engaged both TrkA and EphA2 to support signaling. Moreover, proNGF-induced Src activation required both TrkA and EphA2, but was independent of TrkA phosphorylation. In contrast, proNGF-induced Akt activation was dependent on TrkA phosphorylation but not EphA2. Contrary to proNGF, NGF signaling required solely TrkA to activate Akt and Src, with no involvement of EphA2.

### **TrkA-EphA2 complex is involved in tumor development *in vivo***

Tumor xenograft experiments in SCID mice were performed using MDA-MB-231 cells. We have previously shown that K252a decreases growth of TrkA-overexpressing MDA-MB-231 xenograft tumors (Lagadec et al, 2009). Here, we used a lower dose of K252a analogue CEP-701 (10 mg/kg) to ensure a moderate decrease of tumor growth. Moreover, targeting EphA2 strongly decreased MDA-MB-231 tumor xenograft growth. Interestingly, the combinatory treatment of CEP-701 and siEphA2 induced a significant decrease of tumor burden as compared to siEphA2 or CEP-701 alone (Figure 7A, B and C). These results indicated that TrkA and EphA2 cooperate *in vivo* to enhance tumor cell growth. The direct TrkA/EphA2 interaction was further confirmed by biopsy analyses of tumor xenografts using PLA assays (Figure 8).

### ***NTRK1* mRNA expression and histo-clinical correlations**

We searched for correlation between *NTRK1* mRNA expression and histo-clinical features in a large data set of 6183 invasive breast cancers (Supplementary Table I). *NTRK1* upregulation was significantly associated with two unfavorable prognostic features (Supplementary Table II): positive axillary lymph node status (odds ratio (OR)=1.3,  $p=1.29E-03$ ) and PR-negative status (OR=0.83,  $p=7.43E-03$ ). A total of 2286 non-stage IV patients were available for MFS analysis. Among them, 653 patients experienced metastatic relapse within the 5 years after diagnosis and 1633 remained metastasis-free. *NTRK1* expression was not associated with MFS. By contrast, combining the mRNA expression of *NTRK1* with that of *EPHA2* and *SORT1* led to significant differences in MFS: patients with tumor showing upregulation of 3 genes (*NTRK1*, *EPHA2*, *SORT1*) displayed shorter 5-year MFS (68%, CI95 62-74) than patients with tumor downregulated for all 3 genes (72%, CI95 69-79;  $p=4.73E-02$ ; Figure 9). Similarly, the combined upregulation of 3 genes increased the correlation with

## RESULTATS

the positive lymph node status (OR=1.4, p=2.27E-02) when compared to the *NTRK1* upregulation alone.

## DISCUSSION

During the last decade, compelling data have demonstrated that proNGF is more than just a metabolic precursor of NGF, as it exhibits biological activity by binding simultaneously to sortilin *via* its pro-domain, and to p75<sup>NTR</sup> *via* its mature domain (Feng et al, 2010; Teng et al, 2010). This ternary complex is implicated in the induction of neuronal apoptosis (Nykjaer et al, 2004). However, several studies have also reported that proNGF may activate TrkA and its downstream Erk1/2 signaling without requiring a processing into mature NGF (Clewes et al, 2008; Masoudi et al, 2009) and a study reported that TrkA activation needs intracellular cleavage of proNGF by furin (Boutilier et al, 2008). Nevertheless, none cellular response was clearly associated to proNGF/TrkA axis in these studies. Recently, we described that proNGF induces breast cancer cell invasion through TrkA activation, but not p75<sup>NTR</sup> (Demont et al, 2012). Here, we demonstrated that proNGF first interacted with sortilin which in turn recruited TrkA, and then TrkA associated with EphA2 (Figure 10A). This sequential association was demonstrated by immunoprecipitation and PLA experiments. In agreement with our findings, it has been reported that the extracellular domains of sortilin and TrkA can interact (Vaegter et al, 2011) and that proNGF is co-immunoprecipitated with TrkA (Fahnestock et al, 2004). We showed that proNGF/sortilin/TrkA association induced TrkA phosphorylation and subsequent Akt activation. Interestingly, proNGF-induced Src activation was independent of TrkA phosphorylation but required EphA2 recruitment to sortilin/TrkA complex (Figure 10A). These pathways are actually specific for proNGF signaling, as NGF induced TrkA phosphorylation and subsequent Akt and Src activation, without requiring either sortilin or EphA2 (Figure 10B). Together, our results clearly demonstrated that proNGF could induce cancer cell invasion by activating specific signaling pathways.

The discovery of EphA2 involvement in proNGF signaling is of particular interest, as numerous studies raise the impact of EphA2 in cancer cell behaviors and the interest of targeting EphA2 in cancer treatment (Tandon et al, 2011). For instance, Brantley-Sieders et al (2011) have demonstrated that EphA2 expression, in absence of ephrin-A1, is correlated to an increase of metastasis. Furthermore, EphA2-mediated resistance to trastuzumab in breast cancer cells is due to Src activation (Zhuang et al, 2010). Although EphA2 signaling is not

## RESULTATS

fully understood, it has been described that EphA2 transactivation involves Akt and phosphorylation of serine 897 in the intracellular domain of EphA2 (Miao et al, 2009). In our study, it seems that a different mechanism is required. Indeed, Akt was not necessary for EphA2-activated Src. Moreover, our proteomic analysis revealed that several Src-associated signaling proteins like cortactin and p130 Cas were pulled down with TrkA upon proNGF treatment, suggesting that proNGF could activate signaling cascade involving Src/p130 Cas/cortactin complex. This complex is well known to induce cell invasion, in particular in the formation of specific membrane protrusions, called invadopodia, allowing cell migration and extracellular matrix degradation (Guarino, 2010; Murphy & Courtneidge, 2011). Moreover, upon EGF stimulation, EphA2 is described to be transactivated and then to be co-localized in cortactin-rich protrusions at the leading edge of migrating cells (Hiramoto-Yamaki et al, 2010). We hypothesize that EphA2 could be the link between TrkA and Src/p130 Cas/cortactin signaling complex leading to invadopodia formation and could potentially act as a scaffold protein, as suggested by Pasquale (2008). Interestingly, our analysis of correlations between mRNA expression of *NTRK1*, *EPHA2* and *SORT1* and histo-clinical data of breast cancer samples showed that the combined upregulation of 3 genes was more associated with aggressiveness criteria (pathological involvement of axillar lymph nodes and poor MFS) than the upregulation of *NTRK1* alone, suggesting some degree of cooperativity.

Finally, the existence of a proNGF-induced EphA2/Src pathway, independently of TrkA phosphorylation, may lead to a resistance to therapies targeting TrkA kinase domain such as CEP-701, as already described for other tyrosine kinase receptor inhibitors such as trastuzumab (HER-2 inhibitor) (23) or erlotinib and gefitinib (EGFR tyrosine kinase inhibitors) (Gusenbauer et al, 2012). The cooperation between membrane receptors is widely found in several types of human cancers and is thought to mediate acquired resistance to targeted therapies (Stommel et al, 2007; Xu & Huang, 2010). Therefore, combinatory anti-tumor treatments, as proposed here with CEP-701 and siEphA2, may improve the therapeutical benefit in patients (over-)expressing TrkA, EphA2 and proNGF.

In conclusion, our data evidenced that direct functional interactions between sortilin, TrkA and EphA2 are essential for the pro-invasive effect of proNGF in breast cancer cells. Interestingly, proNGF-induced Src activation is mediated by EphA2 and this could explain, at least in part, tumor resistance to some targeted therapies.

# RESULTATS

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture.** CAL 27, CAL 33, SQ20B and FaDu human head and neck cancer cells were obtained from Dr Meignan (Centre Oscar Lambret, Lille), DU145 and PC-3 prostate cancer cells, MCF-7, BT-20, T47D, SkBr3 and MDA-MB-231 breast cancer cells were acquired from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and were maintained in Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM; BT-20, T47D, MCF-7 and MDA-MB-231 cells), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; CAL 27, CAL 33 and SQ20B cells), RPMI 1640 medium (DU145, PC-3 and FaDu cells) or Mc Coy's 5A (SkBr3) (Invitrogen Corporation, France) supplemented with 10% inactivated FBS (Fetal Bovine Serum) (Hyclone, France), 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 40 UI/ml penicillin, 40 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycin and ZellShield™ (1X, Biovalley, France) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>-humidified atmosphere. All experiments were carried out with cells of passage number less than 20.

Before treatment, cells were rinsed twice, left for 24h in culture medium with 0.1% FBS and then treated with 0.5 nM recombinant human non-cleavable proNGF (Alomone Labs, Israel) or 16 nM recombinant human beta-NGF (Scil Proteins, Germany) for indicated times, with or without a pre-incubation for 1h with specific pharmacological inhibitors K252a (10 nM), LY294002 (15 µM), Src Kinase Inhibitor-1 (SKI-1; 50 nM) (Calbiochem, UK). Neurotensin (1 µM) used for cell treatment was from Sigma-Aldrich (France).

**cDNA constructs and transfection.** The HA-TrkA expression vector (pDisplay-TrkA) was prepared by inserting TrkA cDNA from MDA-MB-231 cells (TrkA variant 1: NM\_001012331.1) into the pDisplay vector (Invitrogen) between the restriction enzyme sites SfiI and SacII. Mutated HA-TrkA constructs were generated by replacing tyrosine residue into phenylalanine with the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent technologies, France) and the following primers:

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

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

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

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

## RESULTATS

Cell transfections were done using the Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza) according to the manufacturer's instructions. Cells were selected with 1 mg/ml G418 (Invitrogen), the resulting G418 resistant cell populations were stored as frozen stocks and used for all the experiments within 20 passages. Expression of TrkA was not modified with passages *in vitro* or after as revealed by western blot analysis.

The siRNA sequences used (100 pmol for each transfection) were against EphA2 (Invitrogen): GCAAGGAAGUGGUACUGCUGGACUU, compared to control (siGFP) GAUGAACUUCAGGGUCAGCTT. For TrkA, a pool of 3 siRNA sequences (Eurogentec, Angers, France) was used: GAACCUGACUGAGCUCUAC, UGGAGUCUCUCUCCUGGAA and GCUGCAGUGUCAUGGGCAA. siRNA transfections were performed using INTERFERin™ according to the manufacturer's instructions (POL409-10, Polyplus transfection, Ozyme, France).

**Cell extracts.** Subconfluent cancer cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed and kept on ice 15 min in a buffer containing 40 mM HEPES pH 7.5, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% glycerol, 10 mM sodium pyrophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1.5 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Cells were then harvested with a rubber scraper, the lysates cleared by centrifugation (13 000 g, 10 min, 4°C), and the supernatants collected. Protein concentration was determined using the BCA assay (Sigma-Aldrich) and samples were stored at -80°C until analysis.

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

Whole cell lysates or immunoprecipitated proteins were then separated by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto PVDF membranes (Immobilon, Millipore). The membranes were blocked with 3% skimmed milk (anti-TrkA), 0.2% casein (anti-sortilin) or 5% bovine serum albumin (BSA) (all other antibodies) in TBS-0.1% Tween 20 (TBS-T) and



## RESULTATS

subsequently immunoblotted with primary antibody for overnight incubation at 4°C. The membranes were probed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, France) and reactive proteins were detected using SuperSignal West Pico Substrate (Perbio). Chemiluminescence was detected with Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Limited, France) or with a Fuji LAS-4000 luminescent image analyzer using exposure times at subsaturation levels. The immunoblots were quantified using Fujifilm Multi Gauge software. The antibodies used in this study are: anti-EphA2 (clone 1E3, Abnova, Interchim, France), anti-sortilin (BD Biosciences, France), anti-TrkA (ANT-018, Alomone Labs), anti-actin (A2066, Sigma-Aldrich), anti-phosphotyrosine (clone PY20, Millipore), anti-HA (Covance, Eurogentec), anti-phospho-Akt (Ser-473)(#9271), anti-pan-Akt(#4691), anti-phospho-Src (Tyr-416)(#2105) and anti-Src (#2109) (Cell Signaling Technologies, Ozyme) for western-blot analysis and anti-HA (12CA5, Roche), anti-sortilin (BAF2934, R&D Systems) and anti-EphA2 (clone C-20, Santa Cruz Biotechnologies) for immunoprecipitation.

***In situ* proximity ligation assay (PLA).** MDA-MB-231 HA-TrkA, DU145 and PC-3 cells (10 000 cells per well) were grown on acid-washed eight-well glass slides (Thermo Fischer Scientific) in EMEM-10% FBS for 24h. Cells were left for 1h in culture medium with 0.1% FBS and then treated or not with non-cleavable proNGF (0.5 nM) or NGF (16 nM) for 5 min. Paraformaldehyde-fixed cells were incubated with 4% BSA for 1h at room temperature followed by overnight incubation with primary antibodies (mouse anti-HA, MMS-101R Covance; goat anti-sortilin, AF3154, R&D systems; rabbit anti-EphA2, #6997 Cell Signaling Technology; anti-TrkA, Alomone Labs) diluted 1:50 (anti-sortilin and anti-HA) or 1:100 (anti-EphA2) in 4% BSA. The slides were washed twice in PBS 1X for 5 min each and incubated for 2h, at 37°C, with oligo-labeled anti-mouse or anti-rabbit plus and anti-rabbit or anti-goat minus PLA probes (Olink Bioscience) diluted 1:5 in 4% BSA. The choice in PLA probes depended on the primary antibodies used. The slides were then washed twice for 5 min each with TBS-T and signals were detected by Duolink Detection kit 613 (Olink Bioscience) according to the manufacturer's instructions. To visualize nuclei, cells were counterstained with Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) and samples were mounted with fluorescence mounting medium (Dako). PLA images (fluorescence dots) were acquired using a fluorescence microscope (100X oil immersion objective,  $\lambda_{excitation}$ : 562 nm,  $\lambda_{emission}$ : 624 nm, microscope Eclipse Ti; Nikon, France) and analyzed with NIS-Elements BR software (Nikon). Bright Field PLA was performed as recommended in manufacturer instructions using paraffin-embedded tumor xenograft.

## RESULTATS

***In vitro* invasion assay.** Cells were rinsed twice and left for 24h in culture medium with 0.1% FBS. Invasion assays were performed in 12-well Boyden microchambers (BD Biosciences) with 8  $\mu\text{m}$  pore size membranes. The Transwells were first coated with 100  $\mu\text{l}$  of culture medium with 0.1% FBS plus 40  $\mu\text{g}$  of rat tail collagen I (Millipore) for 1h at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ . 100 000 cells in 400  $\mu\text{l}$  culture medium with 0.1% FBS were loaded in the upper chamber whereas 1.6 ml culture medium with 0.1% FBS was placed in the lower chamber. Cells were treated with human cleavage-resistant proNGF (0.5 nM) or human  $\beta$ -NGF (16 nM) and incubated for 20h, with or without a pre-incubation with specific inhibitors. Cells were then fixed in frozen methanol for 10 min. The membranes were rinsed twice with PBS and the upper surface of the membranes was scrapped to remove cells. The cells remaining on the down side of the membranes were Hoechst-stained (1 mM; 30 min) and mounted on glass slides with glycerol before counting (5 fields per membrane) through a fluorescence microscope (objective 40X,  $\lambda_{\text{excitation}}$ : 345 nm,  $\lambda_{\text{emission}}$ : 478 nm, microscope Eclipse Ti). Data are reported as mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. Statistics were performed with one-way ANOVA test and Bonferroni's post-hoc test ( $p < 0.001$ ) by using GraphPad Prism 5.01 software.

**In gel digestion of proteins for LC-MS/MS analysis.** Gel pieces, previously colloidal Coomassie blue-stained, were washed in water, 50% acetonitrile/water and 100% acetonitrile. All washes were 0.1 ml for 20 min per gel band, at 20°C, performed on a Vibrax shaking platform. The proteins were "in gel" reduced with 100  $\mu\text{l}$  of 10 mM DTT/0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  per gel band on a hot block at 56°C for 1h, and then alkylated with 100  $\mu\text{l}$  of 55 mM iodoacetamide/0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for 45 min at 20°C in darkness. The gel pieces were then washed with 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and 100% acetonitrile. Once colorless, the gel pieces were dried by Speed-Vac. The gel pieces were then swelled in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  containing 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of trypsin and shaken at 37°C overnight.

**Nano-LC-MS/MS Q-Star analysis.** Analysis was performed as previously described (Toillon et al, 2007). Briefly, nanoLC-nanoESI-MS/MS analyses were performed on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-Star, Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) equipped with a nano-electrospray ion source coupled with a nano high pressure liquid chromatography system (LC Packings Dionex, Voisins Le Bretonneux, France). The mass spectrometer was operated in the positive ion mode. Data acquisition was performed in a data-dependent mode consisting of, alternatively, a full-scan MS over the

## RESULTATS

range m/z 300-2000, and a full-scan MS/MS of the ion selected over the range m/z 50-2000 in an exclusion dynamic mode (the most intense ion is selected and excluded for further selection for a duration of 30 sec). MS/MS data were acquired using a mass tolerance of 50 mmu and the collision energy was automatically fixed by the device. For the automated database search of fragment ion spectra, the Analyst QS software and Mascot dll script were used and final database searching was performed using Mascot software with the Swiss-Prot 50.8 database (366 226 sequences and 132 054 165 residues). Carbamidomethylation (cysteine), oxidation (histidine, tryptophane and methionine) and phosphorylation (serine, threonine and tyrosine) were determined as variable modifications. The peptide mass tolerance was set at 50 ppm and 50 mmu for the fragment mass. One trypsin-missed cleavage was allowed.

**Tumor xenograft growth in immunodeficient mice.** Six-week old female SCID-mice were used. MDA-MB-231 HA-TrkA cells ( $3 \times 10^6$ ) were inoculated subcutaneously in each mouse. The mice were randomly separated into groups (seven mice for control group and six mice for other groups), 14 days after cancer cell injection and were treated for a total of three times, with an interval of 3 days. CEP-701 (Calbiochem) was suspended in vehicle (40% polyethylene glycol 1000, 10% povidone C30 and 2% benzyl alcohol in distilled water) and injected intraperitoneally (10 mg/kg). EphA2 siRNA (7.5 ng/mouse) was delivered using *in vivo* jetPEI<sup>®</sup> according to the manufacturer's instructions (Polyplus transfection) and injected subcutaneously near the tumor mass. Tumor volume was determined throughout the experiment by measuring the length (l) and width (w) and then calculating the volume as  $\pi/6 \times l \times w \times (l+w)/2$ . Statistical analyses were performed with Mann and Whitney test by using GraphPad Prism 5.01 software.

**Gene expression analysis in breast cancer samples.** To determine *NTRK1* mRNA expression in breast cancer and normal breast, we analyzed gene expression data generated by our laboratory coupled with 35 publicly available data sets collected from the National Center for Biotechnology Information (NCBI)/Genbank GEO database, the European Bioinformatics Institute (EBI) ArrayExpress database or the authors' websites (Supplementary Table I). This resulted in a total of 6183 non-redundant invasive breast cancers with *NTRK1* mRNA expression and histo-clinical data available for analysis. Pre-analytic treatment of data was then applied. For the Agilent-based data sets, we applied quantile normalization to available processed data. For the Affymetrix-based data sets, we used Robust Multichip Average

## RESULTATS

(RMA) (Irizarry et al, 2003) with the non-parametric quantile algorithm as normalization parameter. To be comparable across data sets and to exclude bias from population heterogeneity, *NTRK1* expression levels were standardized within each data set using the luminal A population as reference, the molecular subtype of tumors being defined using the PAM50 Predictor (Parker et al, 2009). When multiple probes were mapped to the *NTRK1* gene, the one with the highest variance in a particular dataset was selected. *NTRK1* upregulation was defined by expression level above the median level and downregulation by expression level under the median level. We searched for correlations between *NTRK1* expression and histo-clinical variables including patients' age at time of diagnosis ( $\leq 50$  years vs  $>50$ ), pathological axillary lymph node status (pN: negative vs positive), tumor size (pT: pT1 vs pT2-3), grade (1 vs 2-3), immunohistochemical (IHC) estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), ERBB2 status (negative vs positive) for all informative patients, and metastasis-free survival (MFS) for non-metastatic patients at time of diagnosis. MFS was calculated from the date of diagnosis until date of first metastatic relapse. Follow-up was measured from the date of diagnosis to the date of last news for relapse-free patients. Survival was calculated using the Kaplan-Meier method and curves were compared with the log-rank test. To compare the distribution according to categorical variables, we used the Fisher's exact test. All statistical tests were two-sided at the 5% level of significance. Statistical analysis was done in R and associated packages. We followed the reporting REcommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK criteria) (McShane et al, 2006).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Isabelle Lefebvre for their excellent technical assistance. This work was supported by the "Ligue Nationale Contre le Cancer" (Equipe labellisée 2009-2011 and the Comité du Nord), the GEFLUC "Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer", the INSERM, the French Ministry for Research and Education, the "Génopole de Lille". The Mass Spectrometry facility (Director C. Rolando) was funded by the European Community (FEDER), the Region Nord-Pas de Calais (France), the CNRS, and the University Lille 1. We also thank Anne-Sophie Lacoste who performed mass spectrometry analyses.

## RESULTATS

### REFERENCES

- 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
- Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN (2010) Emerging targeted therapies for breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**: 3366-3379
- Boutillier J, Ceni C, Pagdala PC, Forgie A, Neet KE, Barker PA (2008) Proneurotrophins require endocytosis and intracellular proteolysis to induce TrkA activation. *The Journal of biological chemistry* **283**: 12709-12716
- Brantley-Sieders DM, Jiang A, Sarma K, Badu-Nkansah A, Walter DL, Shyr Y, Chen J (2011) Eph/ephrin profiling in human breast cancer reveals significant associations between expression level and clinical outcome. *PloS one* **6**: e24426
- Brantley-Sieders DM, Zhuang G, Hicks D, Fang WB, Hwang Y, Cates JM, Coffman K, Jackson D, Bruckheimer E, Muraoka-Cook RS, Chen J (2008) The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *The Journal of clinical investigation* **118**: 64-78
- Chellaiah MA, Schaller MD (2009) Activation of Src kinase by protein-tyrosine phosphatase-PEST in osteoclasts: comparative analysis of the effects of bisphosphonate and protein-tyrosine phosphatase inhibitor on Src activation in vitro. *Journal of cellular physiology* **220**: 382-393
- Clewes O, Fahey MS, Tyler SJ, Watson JJ, Seok H, Catania C, Cho K, Dawbarn D, Allen SJ (2008) Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin. *Journal of neurochemistry* **107**: 1124-1135
- Demont Y, Corbet C, Page A, Ataman-Onal Y, Choquet-Kastylevsky G, Fliniaux I, Le Bourhis X, Toillon RA, 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
- 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
- Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V, Hondermarck H (2003) Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* **22**: 5592-5601
- Drabsch Y, ten Dijke P (2011) TGF-beta signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **16**: 97-108

## RESULTATS

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

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

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

Faoro L, Singleton PA, Cervantes GM, Lennon FE, Choong NW, Kanteti R, Ferguson BD, Husain AN, Tretiakova MS, Ramnath N, Vokes EE, Salgia R (2010) EphA2 mutation in lung squamous cell carcinoma promotes increased cell survival, cell invasion, focal adhesions, and mammalian target of rapamycin activation. *The Journal of biological chemistry* **285**: 18575-18585

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

Festuccia C, Muzi P, Gravina GL, Millimaggi D, Specia S, Dolo V, Ricevuto E, Vicentini C, Bologna M (2007) Tyrosine kinase inhibitor CEP-701 blocks the NTRK1/NGF receptor and limits the invasive capability of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol* **30**: 193-200

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

Foveau B, Boulay G, Pinte S, Van Rechem C, Rood BR, Leprince D (2012) The receptor tyrosine kinase EphA2 is a direct target gene of hypermethylated in cancer 1 (HIC1). *J Biol Chem* **287**: 5366-5378

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

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

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

Gusenbauer S, Vlaicu P, Ullrich A (2012) HGF induces novel EGFR functions involved in resistance formation to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*

Hiramoto-Yamaki N, Takeuchi S, Ueda S, Harada K, Fujimoto S, Negishi M, Katoh H (2010) Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism. *The Journal of cell biology* **190**: 461-477

Hochgrafe F, Zhang L, O'Toole SA, Browne BC, Pinese M, Porta Cubas A, Lehrbach GM, Croucher DR, Rickwood D, Boulghourjian A, Shearer R, Nair R, Swarbrick A, Faratian D,

## RESULTATS

Mullen P, Harrison DJ, Biankin AV, Sutherland RL, Raftery MJ, Daly RJ (2010) Tyrosine phosphorylation profiling reveals the signaling network characteristics of Basal breast cancer cells. *Cancer research* **70**: 9391-9401

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**: 249-264

Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, Donovan M, Cordon-Cardo C, Beug H, Grunert S (2006) Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *The Journal of clinical investigation* **116**: 1561-1570

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

Kolokythas A, Cox DP, Dekker N, Schmidt BL (2010) Nerve growth factor and tyrosine kinase A receptor in oral squamous cell carcinoma: is there an association with perineural invasion? *J Oral Maxillofac Surg* **68**: 1290-1295

Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, Foveau B, Vanhecke E, Romon R, Toillon RA, Oxombre B, Hondermarck H, Le Bourhis X (2009) TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* **28**: 1960-1970

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

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

McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM (2006) REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Breast Cancer Res Treat* **100**: 229-235

Miao H, Li DQ, Mukherjee A, Guo H, Petty A, Cutter J, Basilion JP, Sedor J, Wu J, Danielpour D, Sloan AE, Cohen ML, Wang B (2009) EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer cell* **16**: 9-20

Mitchell K, Svenson KB, Longmate WM, Gkirtzimanaki K, Sadej R, Wang X, Zhao J, Eliopoulos AG, Berditchevski F, Dipersio CM (2010) Suppression of integrin alpha3beta1 in breast cancer cells reduces cyclooxygenase-2 gene expression and inhibits tumorigenesis, invasion, and cross-talk to endothelial cells. *Cancer research* **70**: 6359-6367

Murphy DA, Courtneidge SA (2011) The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 413-426

## RESULTATS

Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemannel M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**: 843-848

Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* **27**: 1160-1167

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

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

Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R, Stegh AH, Bradner JE, Ligon KL, Brennan C, Chin L, DePinho RA (2007) Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* **318**: 287-290

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

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

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

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. *The Journal of investigative dermatology* **128**: 2031-2040

Vaegter CB, Jansen P, Fjorback AW, Glerup S, Skeldal S, Kjolby M, Richner M, Erdmann B, Nyengaard JR, Tessarollo L, Lewin GR, Willnow TE, Chao MV, Nykjaer A (2011) Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nature neuroscience* **14**: 54-61

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

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

Weigelt B, Wessels LF, Bosma AJ, Glas AM, Nuyten DS, He YD, Dai H, Peterse JL, van't Veer LJ (2005) No common denominator for breast cancer lymph node metastasis. *Br J Cancer* **93**: 924-932



## RESULTATS

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

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

Zhang W, Jiang B, Guo Z, Sardet C, Zou B, Lam CS, Li J, He M, Lan HY, Pang R, Hung IF, Tan VP, Wang J, Wong BC (2010) Four-and-a-half LIM protein 2 promotes invasive potential and epithelial-mesenchymal transition in colon cancer. *Carcinogenesis* **31**: 1220-1229

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

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

Zhuang G, Brantley-Sieders DM, Vaught D, Yu J, Xie L, Wells S, Jackson D, Muraoka-Cook R, Arteaga C, Chen J (2010) Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer research* **70**: 299-308

## RESULTATS

### FIGURE LEGENDS

Figure 1: Analysis of proNGF pro-invasive effect on HA-TrkA MDA-MB-231 cells. Invasion assay was performed on HA-TrkA MDA-MB-231 cells, Y490F and kinase-dead TrkA mutants. Cells were seeded on Boyden chambers and treated with proNGF (0.5 nM) for 20h and/or inhibitors K252a (10 nM), LY294002 (15  $\mu$ M), Src Kinase Inhibitor-1 (SKI-1, 50 nM). Untreated mock cells represented the control and determined 100% of invasion. For the statistics, error bars represent S.D. \*  $p < 0.001$  for proNGF or NGF stimulation *versus* no stimulation; §  $p < 0.001$  for experimental *versus* control under proNGF stimulation.

Figure 2: Analysis of proNGF receptors levels and their pro-invasive effects on epithelial cancer cells. **A.** Invasion assays were performed on tongue (CAL 27, CAL 33), larynx (SQ20B), pharynx (FaDu), prostate (DU145, PC-3) and breast (MDA-MB-231) cancer cells. Cells were seeded on Boyden chambers and treated with non-cleavable proNGF (0.5 nM) for 20h. Untreated cells represented the control and determined 100% of invasion. **B.** The (pro)NGF receptors (EphA2, sortilin, p75<sup>NTR</sup> and TrkA) protein levels were assessed by immunoblot in proNGF responsive cells (CAL 33, DU145, PC-3 and MDA-MB-231 cells). Fifty  $\mu$ g of total protein were loaded. **C.** Invasion assay was performed on MDA-MB-231, DU145 and PC-3 cells transfected with siRNA against EphA2 (siEphA2) or scrambled siRNA (siCTRL). Cells were treated or not with 0.5 nM N.C. proNGF. Untreated siCTRL-transfected cells represented the control and determined 100% of invasion (white bar). For the statistics, error bars represent S.D. \*  $p < 0.001$  for proNGF stimulation *versus* no stimulation; §  $p < 0.001$  for experimental *versus* control under proNGF stimulation. SiRNA efficiency was assessed by Western-blotting using specific antibodies against EphA2, and actin as a loading control.

Figure 3: ProNGF induced TrkA association with sortilin and EphA2. MDA-MB-231 HA-TrkA cells were treated with 0.5 nM N.C. proNGF or 16 nM NGF (5 and 30 min). Sortilin, EphA2 and HA-TrkA were immunoblotted in crude lysates and eluates of immunoprecipitations using anti-HA, anti-sortilin and anti-EphA2.

## RESULTATS

**Figure 4:** ProNGF induced direct interaction of TrkA with sortilin and EphA2. MDA-MB-231 HA-TrkA cells were treated or not with 0.5 nM N.C. proNGF or 16 nM NGF (5 min). Cells were then prepared for PLA experiment as described in Materials and Methods. Direct interactions between TrkA and sortilin (**A**), TrkA and EphA2 (**B**) were detected as red dots, whereas no direct association was found for sortilin and EphA2 (**C**). Experiments were representative of three independent PLA assays.

**Figure 5:** Functional association of sortilin/TrkA/EphA2 under proNGF stimulation. **A.** Sortilin interacted with EphA2 *via* TrkA. MDA-MB-231 HA-TrkA cells were transfected with siTrkA and then treated with N.C. proNGF. Sortilin was immunoprecipitated and EphA2 and HA-TrkA were immunoblotted. **B.** TrkA phosphorylation was not necessary for the interaction with sortilin and EphA2. MDA-MB-231 cells overexpressing HA-TrkA or kinase-dead HA-TrkA were treated with N.C. proNGF. Sortilin and EphA2 recruitment was determined after immunoprecipitation anti-HA. Mutagenesis efficiency was checked with anti-phospho-tyrosine antibody. **C.** ProNGF binding on sortilin was necessary for TrkA association with sortilin and EphA2. MDA-MB-231 HA-TrkA cells were treated with N.C. proNGF in presence or not of 1  $\mu$ M neurotensin. HA-TrkA was immunoprecipitated with anti-HA antibody and sortilin and EphA2 were immunoblotted. **D.** EphA2 was not required for sortilin/TrkA association. MDA-MB-231 HA-TrkA cells were transfected with siEphA2 and then treated with N.C. proNGF (30 min). Sortilin and EphA2 recruitment was determined after anti-HA immunoprecipitation.

**Figure 6:** ProNGF activated Akt and Src through TrkA and EphA2, respectively. **A** and **D.** MDA-MB-231 HA-TrkA cells were treated with N.C. proNGF (**A**) or NGF (**D**) (30 min) in presence or not of 10 nM K252a, 15  $\mu$ M LY294002 and 50 nM SKI-1. Phosphorylation of Akt and Src was determined by using phospho-specific antibodies. Equiloadings were checked with Akt and Src antibodies. **B** and **E.** MDA-MB-231 cells overexpressing HA-TrkA and kinase-dead HA-TrkA were treated with N.C. proNGF (**B**) or NGF (**E**) (5 and 30 min). Phosphorylation of Akt and Src was assessed by Western-blot. **C** and **F.** Akt and Src phosphorylation was determined in crude lysates from MDA-MB-231 cells transfected with siEphA2 and treated 30 min with N.C. proNGF (**C**) or NGF (**F**).

## RESULTATS

Figure 7: Impact of TrkA and EphA2 inhibitions on tumor development *in vivo*. Xenograft experiments were conducted using MDA-MB-231 HA-TrkA cells. Three millions of cancer cells were injected subcutaneously in mice. The tumors were allowed to develop for 14 days and then submitted to 3 injections (every 3 days; black arrows) of vehicle (control), CEP-701, siEphA2 or CEP-701 and siEphA2. Experiments were stopped 31 days after the first treatment injection for ethical consideration after the death of one of the control mice. **A.** Tumor volumes were evaluated by measuring the length (l) and width (w) and then calculating the volume as  $\pi/6 \times l \times w \times (l+w)/2$ ; Mann and Whitney test was performed between control group and CEP-701 (a), between control groups and siEphA2 (b), between control groups and CEP-701+ siEphA2 (c), and between siEphA2 groups and CEP-701+ siEphA2 (d)\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; ns : not significant. **B.** Dot plot representation of tumor volume at the end of the experiment; Mann and Whitney test was performed between control group and CEP-701 (a), between control group and siEphA2 (b), between control group and CEP-701+ siEphA2(c), and between siEphA2 group and CEP-701+ siEphA2 (d) \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; ns : not significant **C.** Photography of representative tumors at the end of the experiment (from left to right: control; CEP-701; siEphA2 and CEP-701 + siEphA2).

Figure 8: Bright field PLA assays of TrkA/EphA2 interaction on MDA-MB-231 tumor xenograft. PLA assays were done on tumor xenograft from control group. Experiments were representative of three independent PLA assays.

Figure 9: Kaplan-Meier MFS curves in breast cancer patients according to concomitant *NTRK1*, *EPHA2* and *SORT1* mRNA deregulation. The 5-year MFS is 68% when all genes are upregulated (N=291) and 72% when all genes are downregulated (N=297).

Figure 10: Schematic representation of proNGF and NGF signaling leading to breast cancer cell invasion. **A.** ProNGF induced sortilin/TrkA association and this former complex then recruited EphA2. The downstream activation of Src required both TrkA and EphA2, but was independent of TrkA phosphorylation whereas Akt activation required only TrkA and its phosphorylation. **B.** NGF bound to TrkA but not to sortilin, leading to its phosphorylation and subsequent Src and Akt activations.

## RESULTATS

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

### SUPPLEMENTARY DATA

Figure S1: ProNGF induced direct interaction between TrkA and EphA2 in native MDA-MB-231, DU145, PC-3 cells. Cells were treated or not with 0.5 nM N.C. proNGF (5 and 30 min). Cells were then prepared for PLA experiment as described in Materials and Methods. Interactions between EphA2 and TrkA) were detected as red dots. Experiments were representative of three independent PLA assays.

Supplementary Table I: Description of the breast cancer data sets used for mRNA expression analysis.

Supplementary Table II: *NTRK1* mRNA expression in breast cancer and histo-clinical correlation.

## RESULTATS

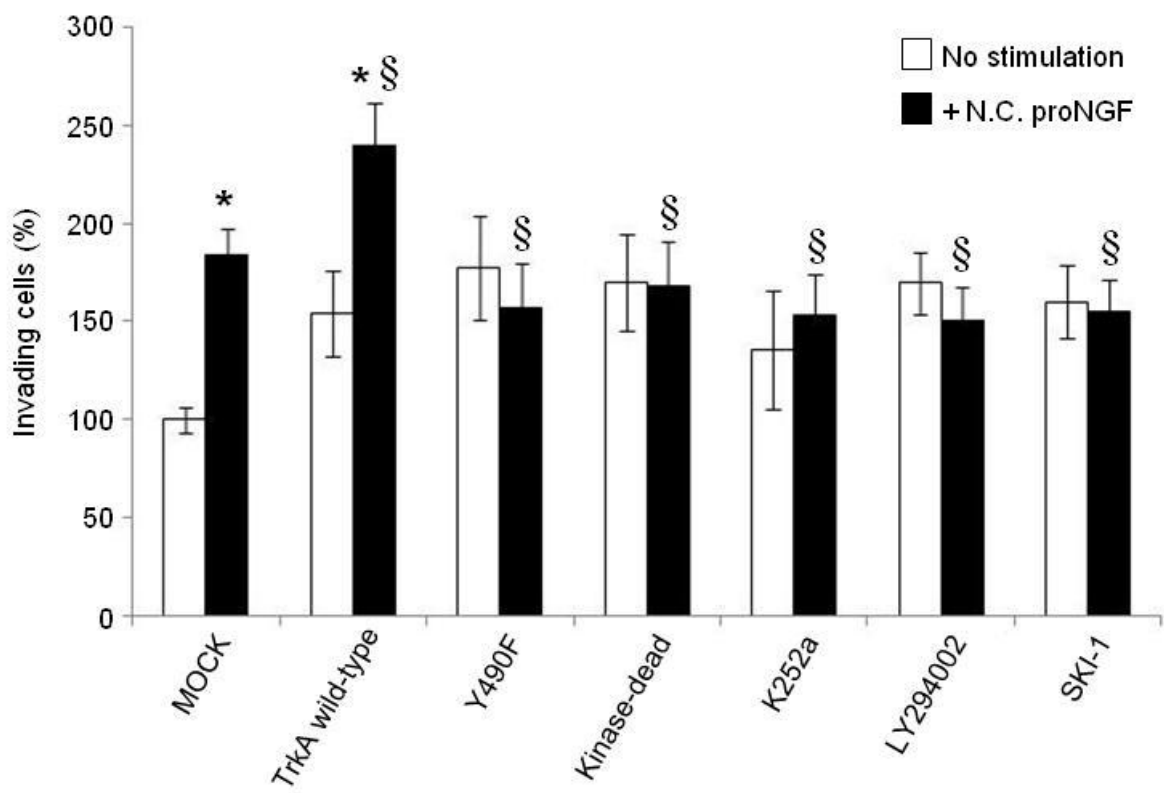
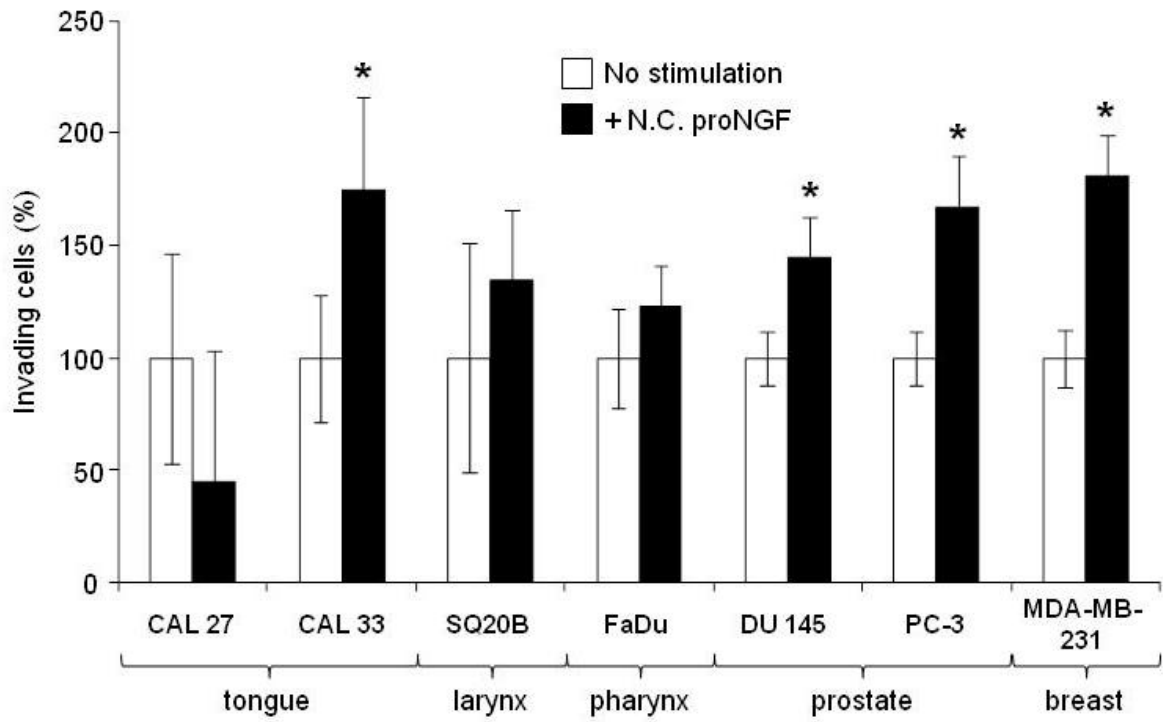


Figure 1

## RESULTS

**A**



**B**

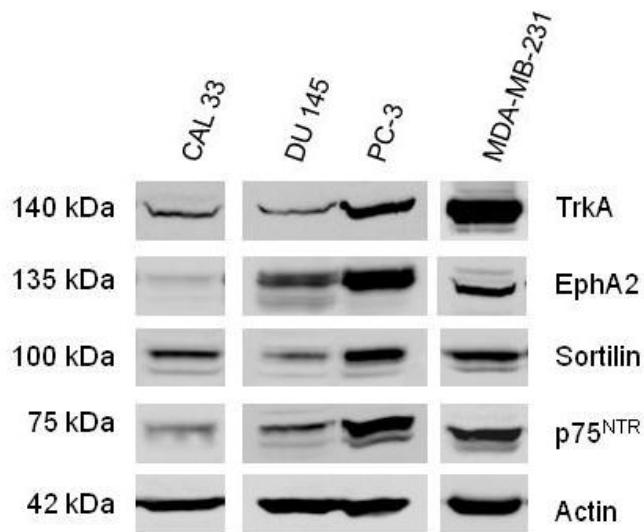
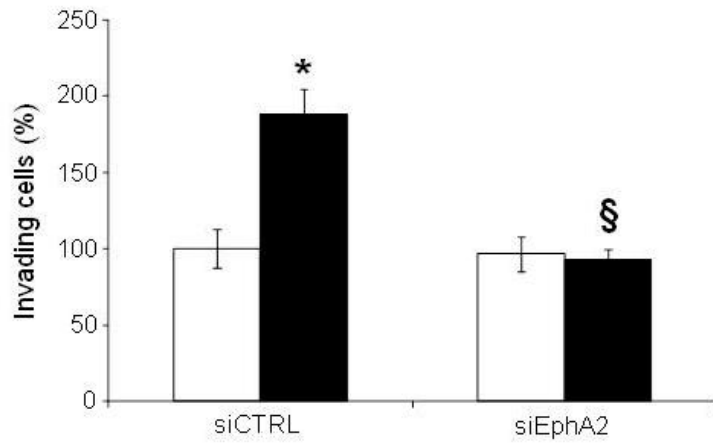


Figure 2

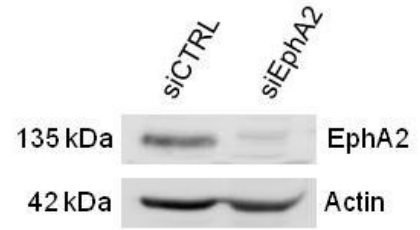
# RESULTATS

C

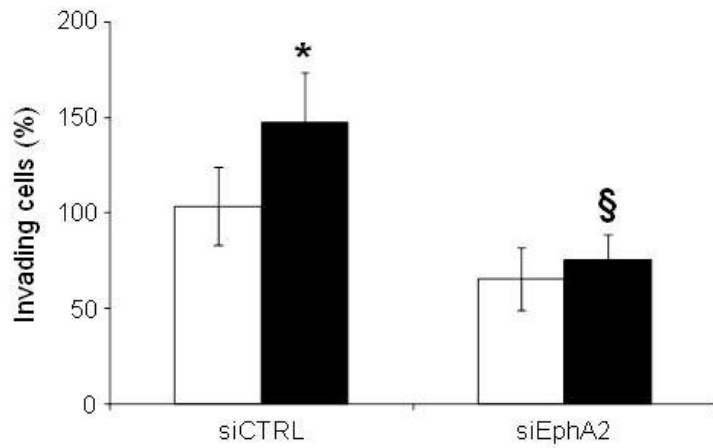
## MDA-MB-231



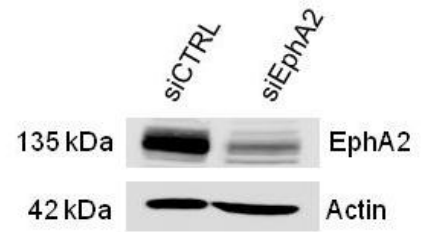
□ No stimulation  
■ + N.C. proNGF



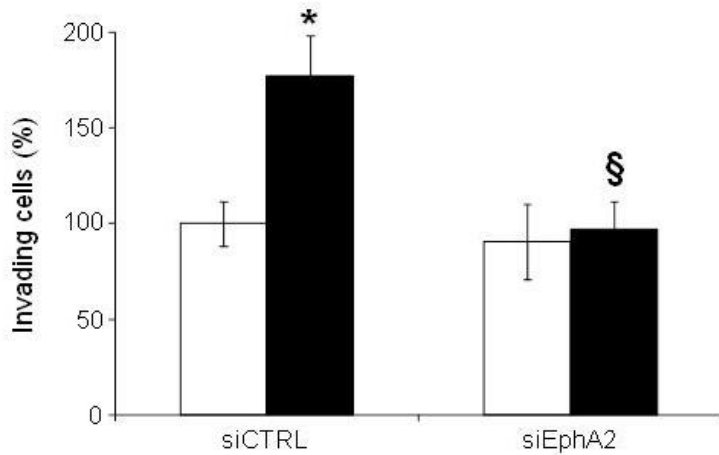
## DU 145



□ No stimulation  
■ + N.C. proNGF



## PC-3



□ No stimulation  
■ + N.C. proNGF

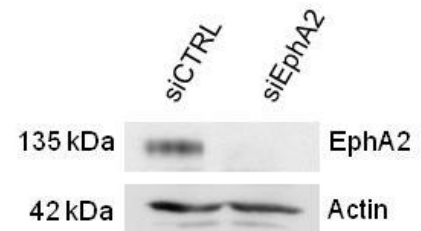


Figure 2



## RESULTATS

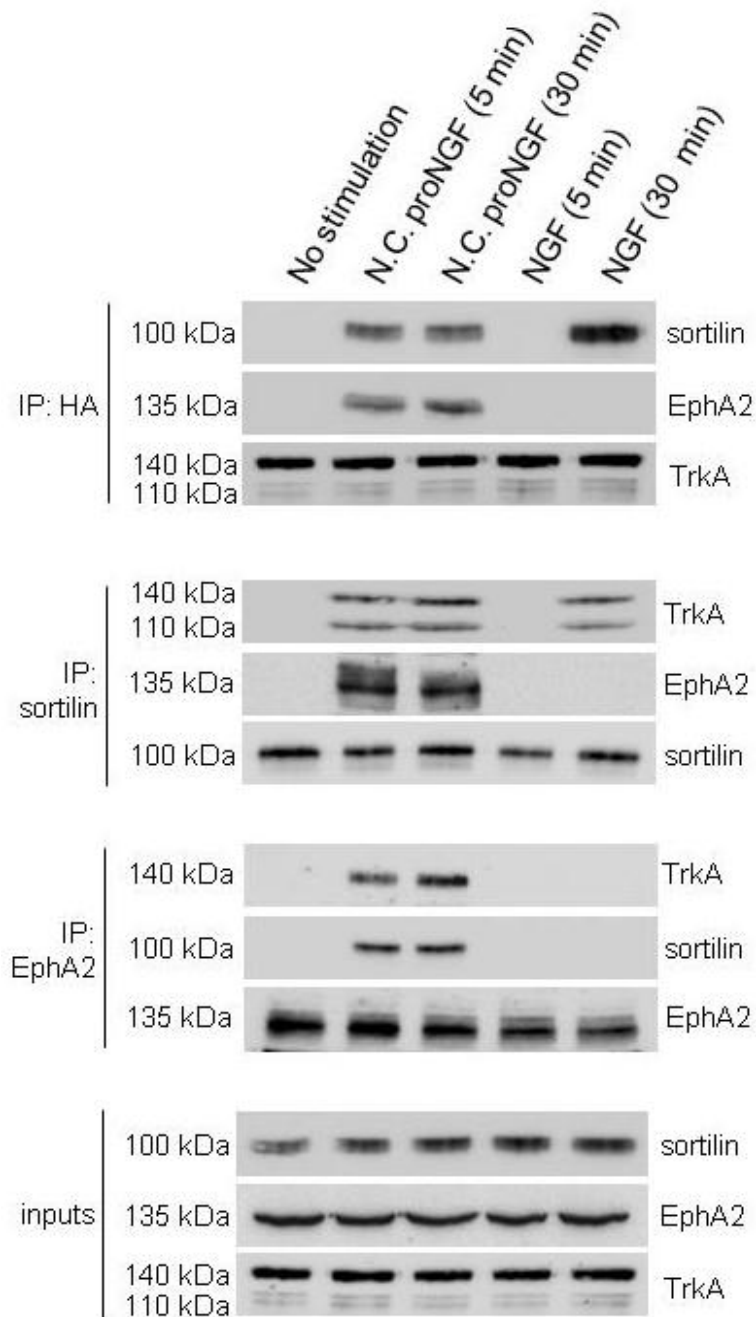


Figure 3

# RESULTATS

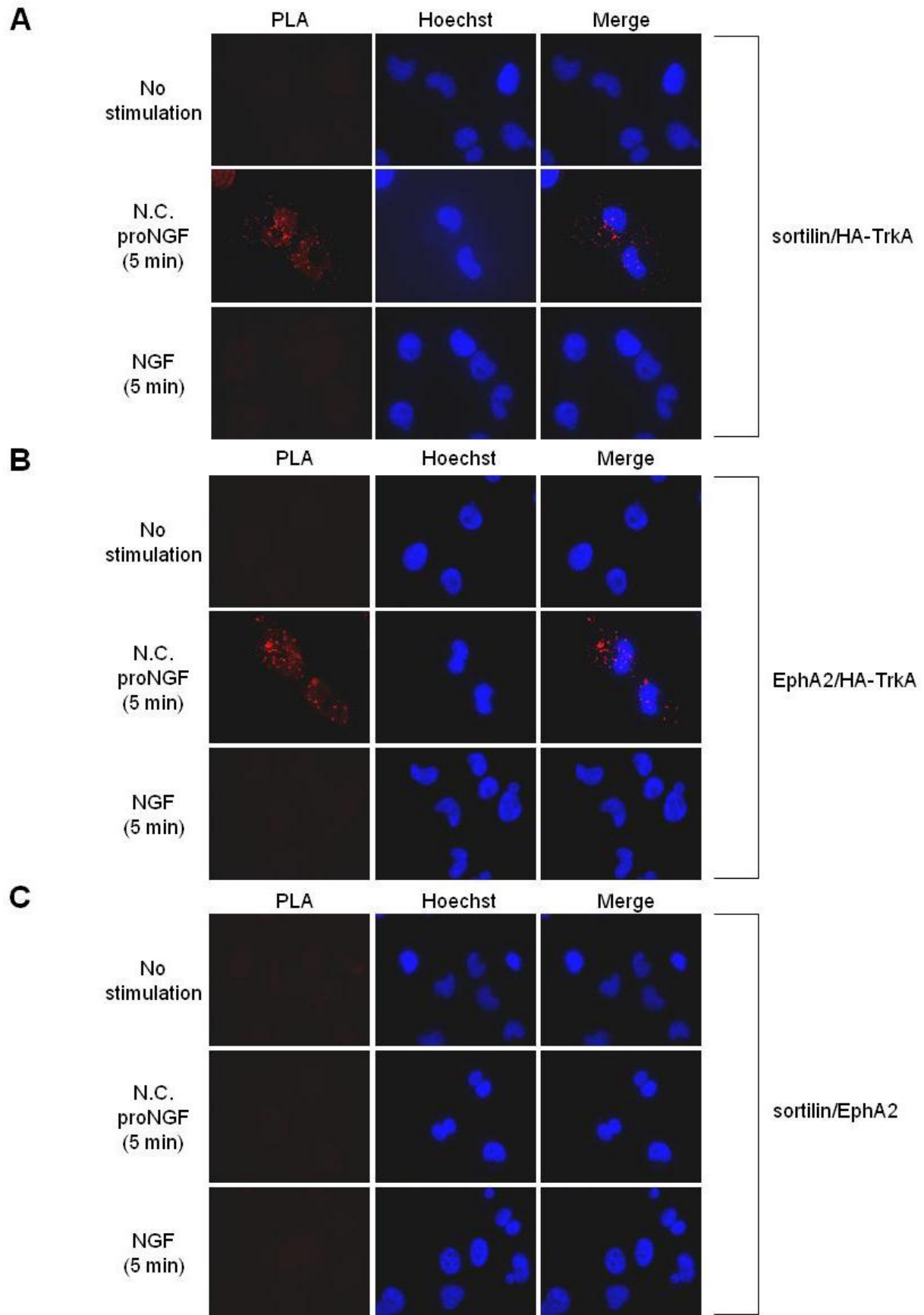


Figure 4

# RESULTATS

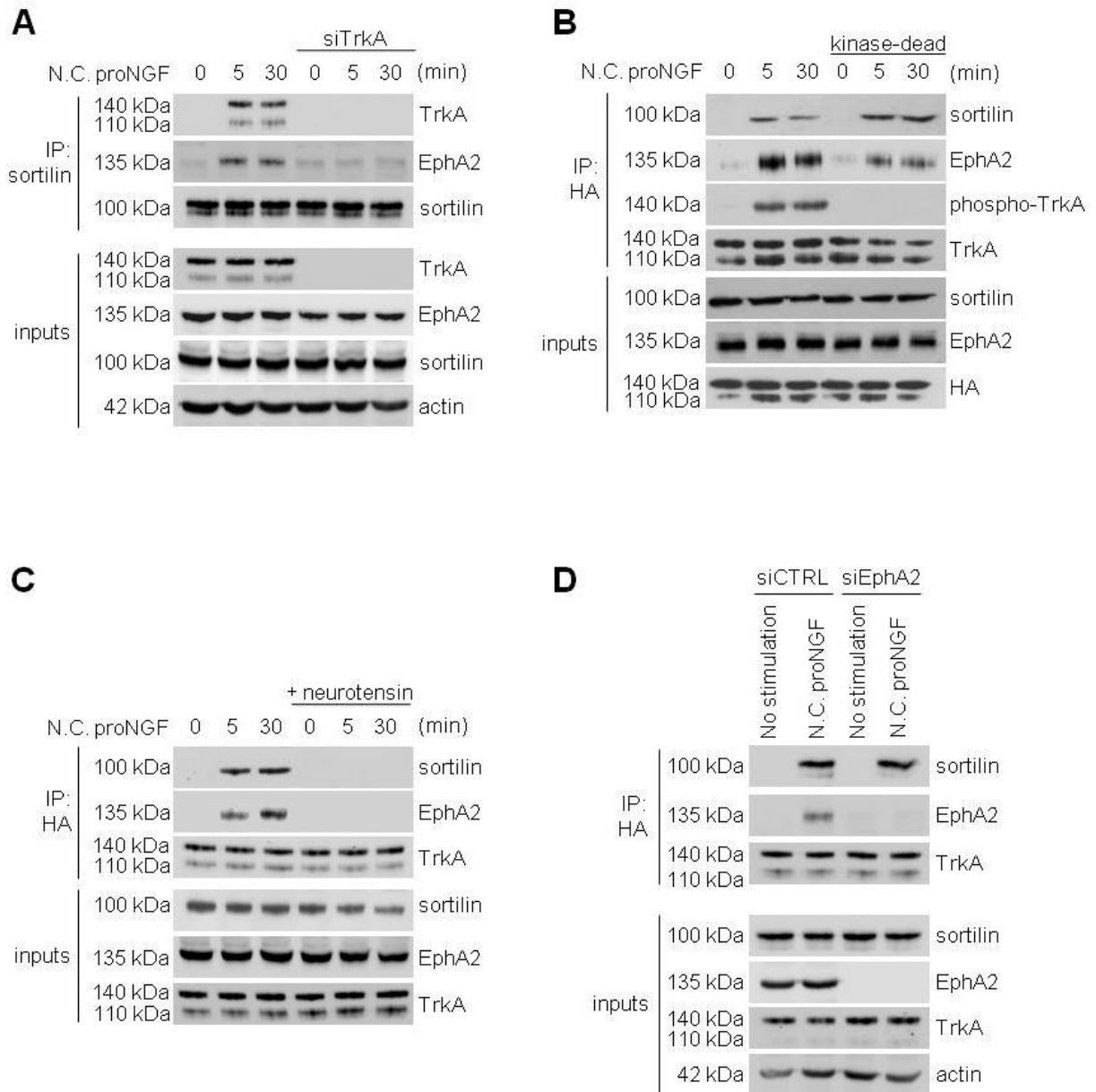


Figure 5

# RESULTATS

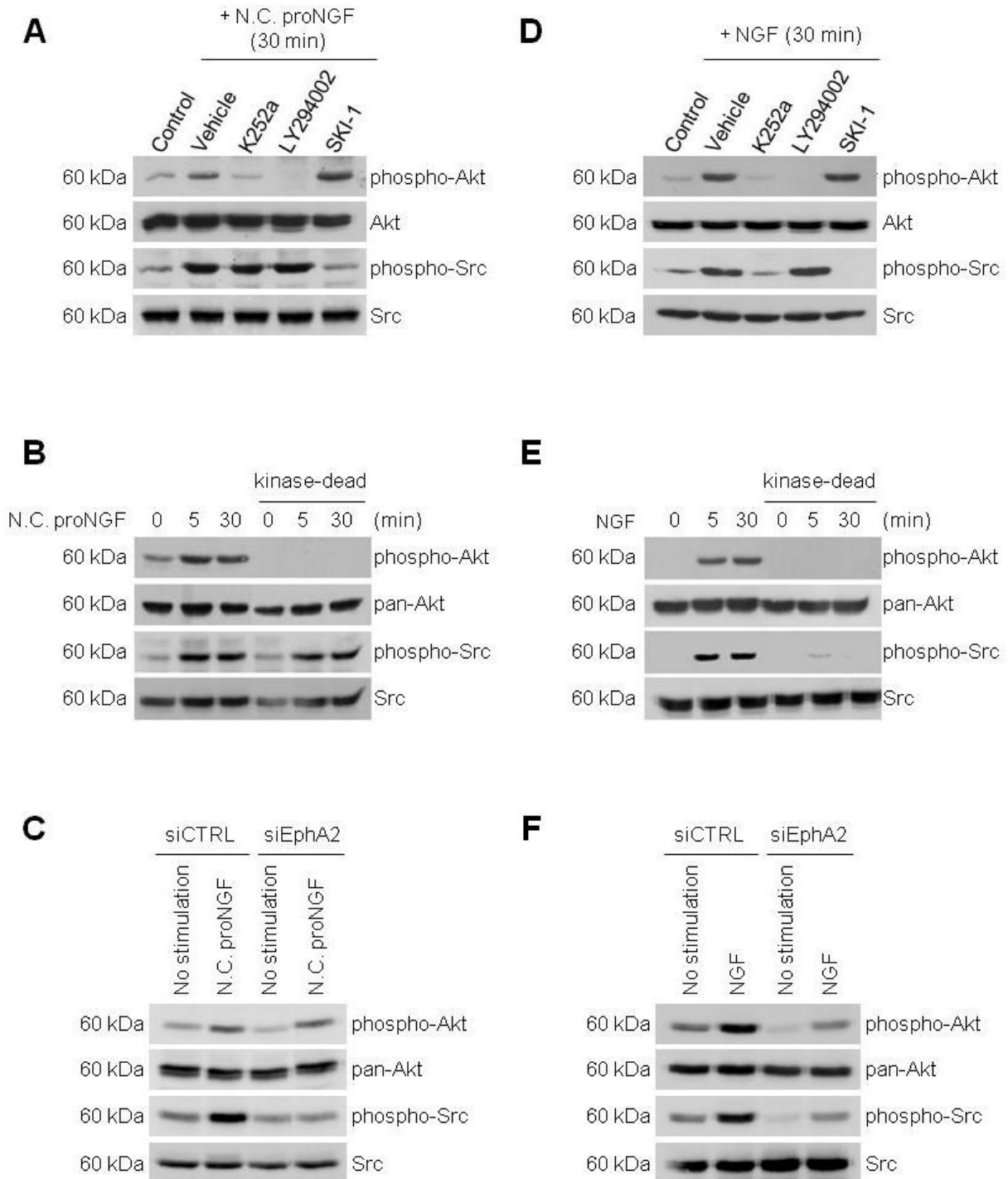


Figure 6

# RESULTATS

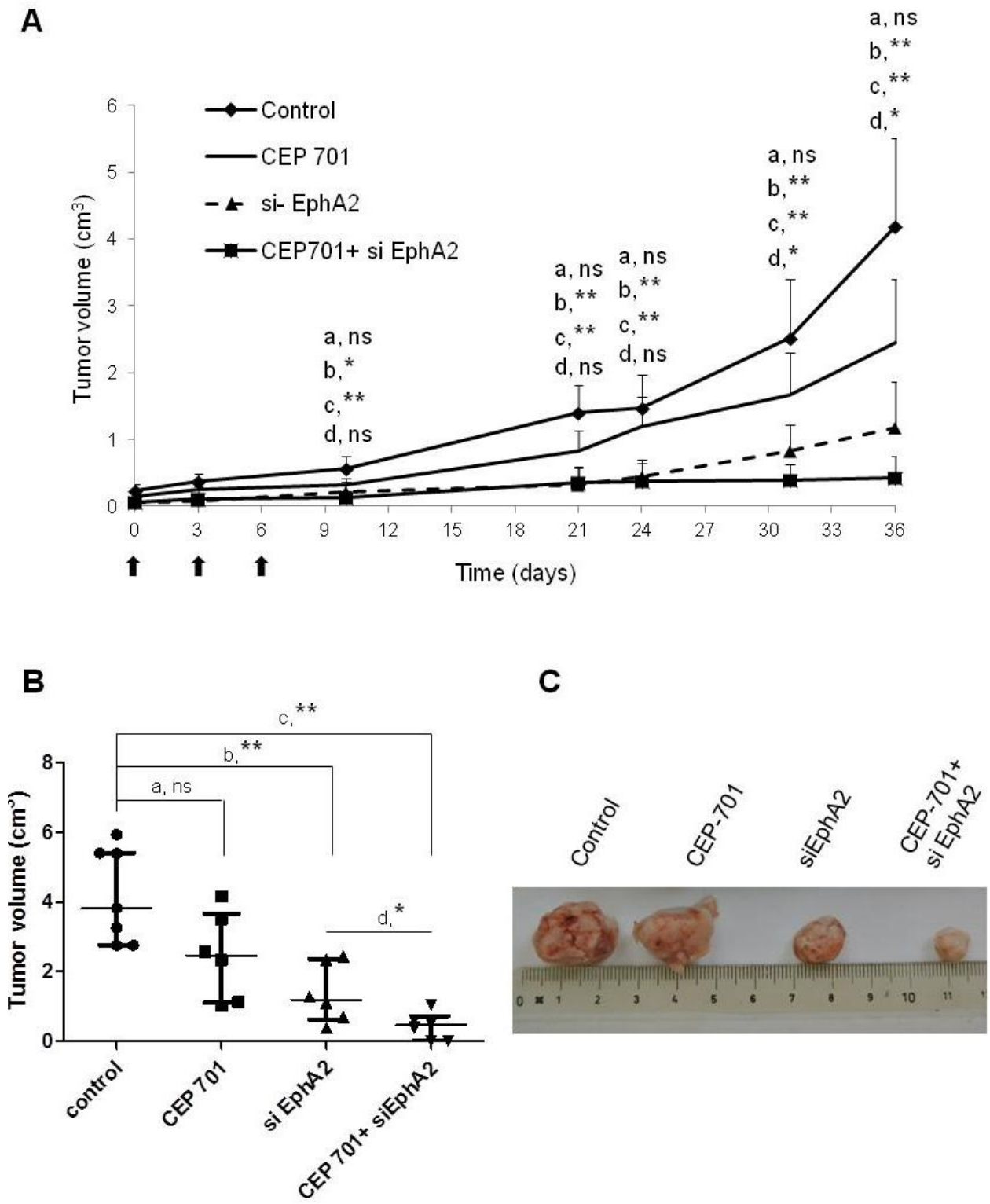
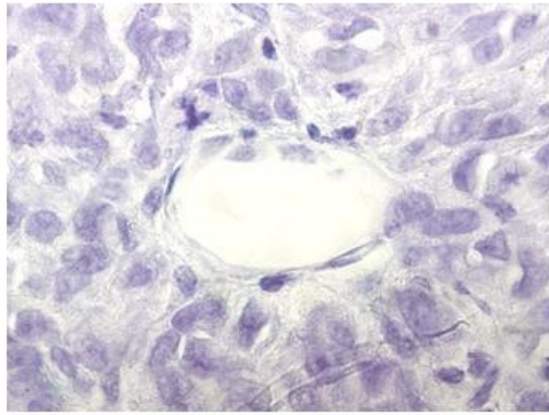


Figure 7

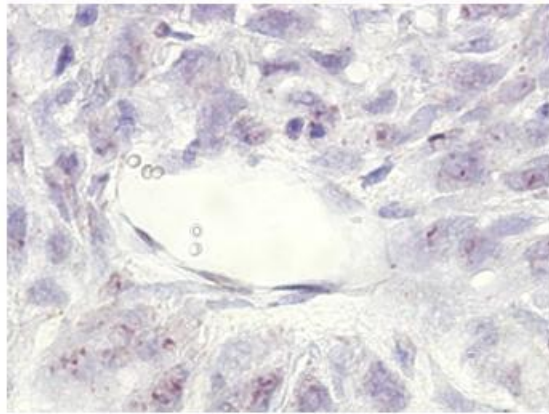
## RESULTATS

### PLA

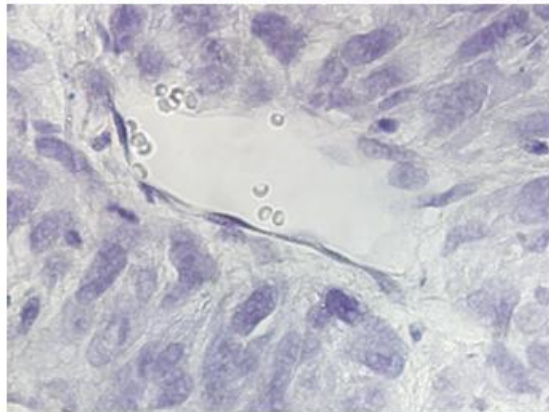
$\alpha$ Rabbit/ $\alpha$ Goat



$\alpha$ TrkA/ $\alpha$ Goat



$\alpha$ Rabbit/ $\alpha$ EphA2



$\alpha$ TrkA/ $\alpha$ EphA2

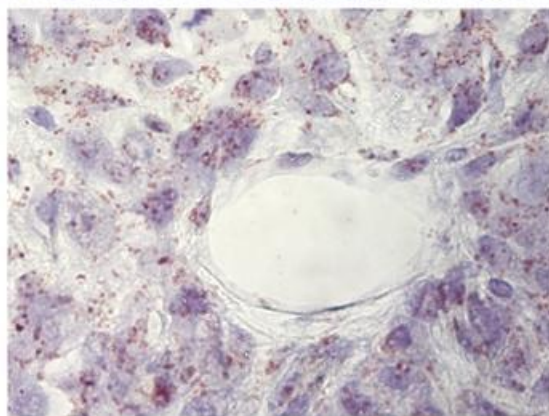


Figure 8

## RESULTATS

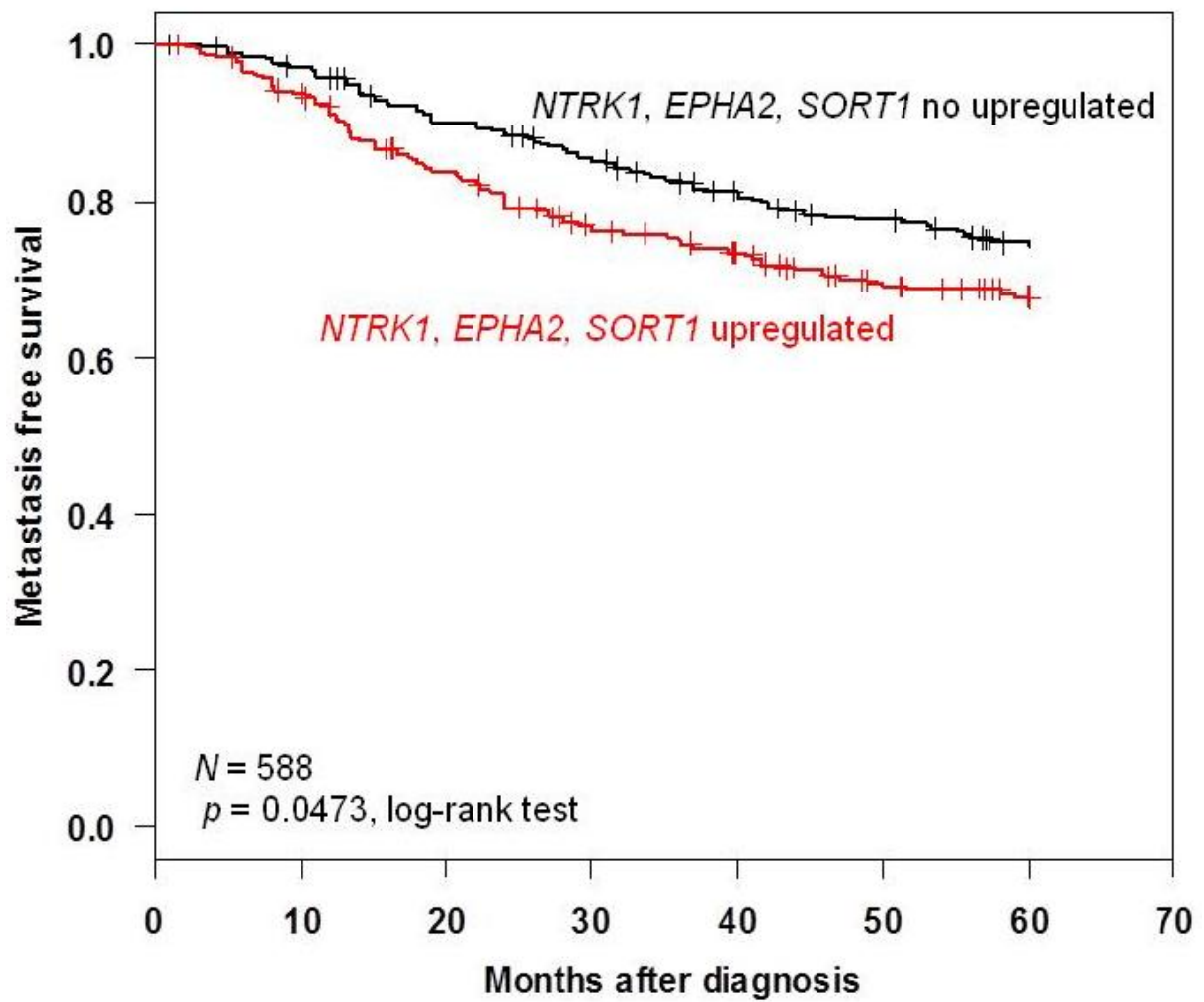
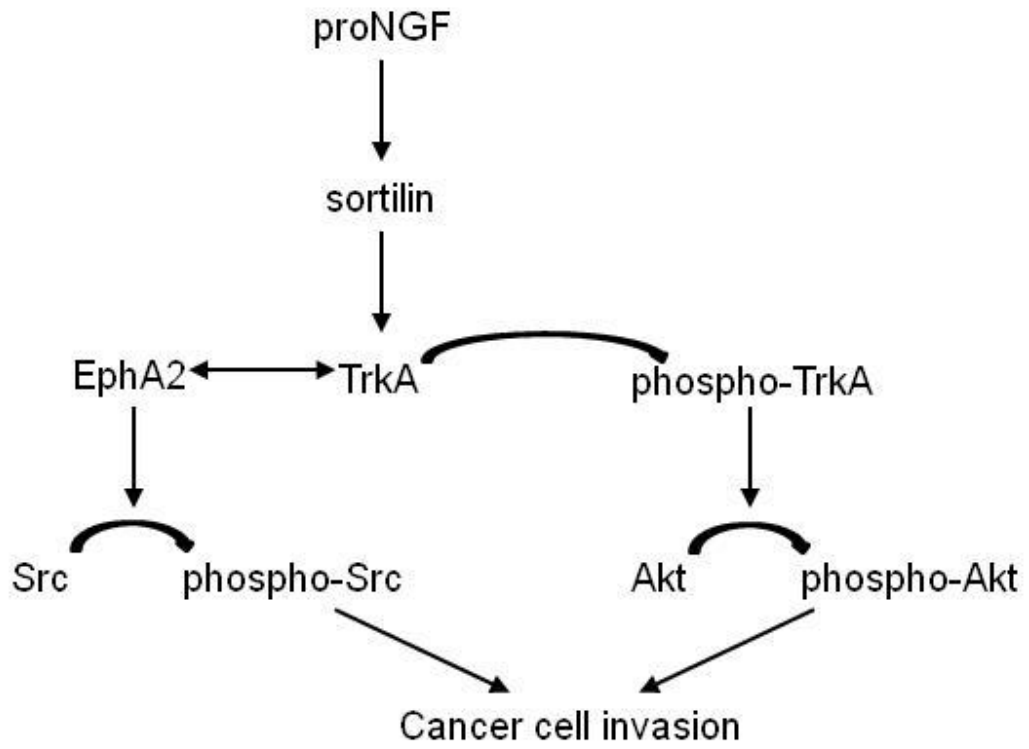


Figure 9

## RESULTATS

**A**



**B**

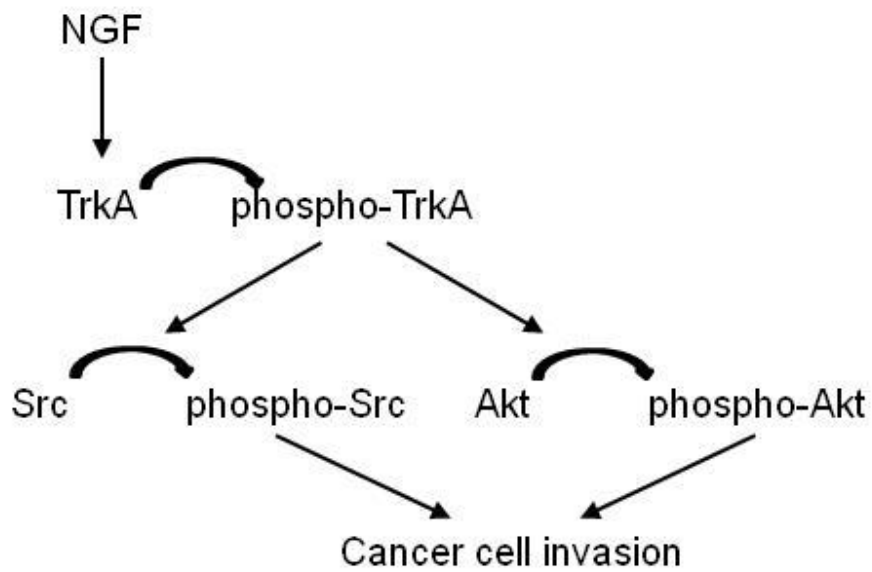


Figure 10



# RESULTS

Protein name	Time of treatment (min)	Uniprot ID	Number of peptides	Peptide sequences	m/z observed	m/z theoretical	Delta mass ppm	Expected value	Mascot score
High affinity nerve growth factor receptor	30	P04629	12	IGDFGMSR	881.4331	881.4065	30.10	0.0038	377
				WELGEGAFGK	1092.5195	1092.5240	-4.11	0.0032	
				NCLVGGQLVVK	1185.6105	1185.6540	-36.72	0.00014	
				DIYSIDVYR	1194.4873	1194.5193	-26.82	0.071	
				ACPPPEVYAIMR	1305.5678	1305.6209	-40.71	0.00065	
				WMPPEILYR	1306.5771	1306.6380	-46.62	0.38	
				FVAPDAFHFTPR	1403.7278	1403.6986	20.80	0.0067	
				WEEEGLGGVPEQK	1456.7274	1456.6834	30.20	0.00014	
				VFLAECHNLLPEQDK	1811.8261	1811.8876	-33.94	0.0038	
				EAELLTMLQHQHIVR	1816.9107	1816.9618	-28.13	0.00029	
				EAELLTMLQHQHIVR	1832.8890	1832.9567	-36.90	0.0048	
				GLEQAGWILTELEQSATVMK	2203.2601	2203.1194	63.80	1.6e-007	
				GLEQAGWILTELEQSATVMK	2219.2517	2219.1144	61.90	5.2e-005	
				TVQGLSLQLVLVLSGNPLHCSQALR	2651.4055	2651.3523	20.10	0.00086	
Sortilin	5	Q99523	1	TVSFGLGGR	968.5173	968.5080	9.62	0.039	31
Ephrin type-A receptor 2	30	P29317	2	FADIVSLDK	1119.6008	1119.6176	-14.98	0.0013	45
				TVSEWLESIK	1190.5899	1190.6183	-23.83	0.19	
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	5	P12931	1	AAANLVGENLVCK	1399.7604	1399.7493	7.92	0.00017	54
Src substrate cortactin	30	Q14247	2	VDQS AVGFPEYQGK	1426.7274	1426.6729	38.20	0.0026	104
				YGLFPANTVVELR	1440.8043	1440.7401	44.50	1.3e-007	
Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1	30	P56945	2	LVFIGDTLSR	1119.5875	1119.6288	-36.88	0.026	33
				ATAPGPEGGGTLHPNPTDK	1815.7731	1815.8752	-56.20	1.1	
Synaptosomal-associated protein 23	30	O00161	1	ILGLAIESQDAGIK	1426.8689	1426.8031	46.10	2.3e-007	76
SH2 domain-containing protein 3C	5	Q8NSH7	2	TEGTK	534.2602	534.2649	-8.78	0.061	52
				LDLLER	757.4806	757.4334	62.40	0.0029	
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12	30	Q05209	1	ILLLEFQNESR	1348.6391	1348.6987	-44.14	0.00024	55
LIM and SH3 domain protein 1	30	Q14847	1	GFSVVADIPELQR	1417.7480	1417.7202	19.60	5e-005	60
Four and a half LIM domains protein 2	30	Q14192	7	QSLSLVGR	890.4654	890.4644	1.17	6.4e-005	223
				YBFEER	942.4620	942.4447	18.40	0.0028	
				NSLVDKPF AAK	1188.6043	1188.6503	-38.65	0.25	
				QAGQTNPESGLGGTK	1491.7756	1491.6810	63.40	0.13	
				GSSWHETCFICHR	1675.6849	1675.6984	-8.05	0.00038	
				DDFAYCLNCFCDLYAK	2073.8142	2073.8271	-6.19	7.2e-005	
				EDQLLCDYSEYSSK	2110.9031	2110.8459	27.10	0.13	
PDZ and LIM domain protein 4	30	P50479	3	G YFFLDER	1045.4706	1045.4869	-15.62	0.0019	48
				DFSAFLTSR	1105.5389	1105.5768	-34.21	0.22	
				VKPPEG YD V VAVY PNAK	1844.8488	1844.9672	-64.22	1.9	
HCLS1-associated protein X-1	30	O00165	1	IFGGVLES DAR	1162.5964	1162.5982	-1.62	0.0078	38
Alpha-adducin	30	P35611	1	INLQGDIVDR	1141.5651	1141.6091	-38.55	0.00094	49
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	30	P29966	3	LSGFSFK	784.4588	784.4119	39.70	0.02	98
				GEPAAAAPEAGASPV EK	1621.8007	1621.7947	3.67	0.15	
				EAPAEGEAAEPGSP TAAEGEAA S AASS TSSPK	2914.3679	2914.2951	25.00	2.7e-007	
Gelsolin	5	P06396	1	AGALNS NDAFVLK	1318.6327	1318.6881	-42.04	0.0054	41
Integrin beta-1	30	P05556	2	IGFGSFVEK	982.5279	982.5124	15.80	1.9e-005	101
				LLVFS TDAG FHFAGDGK	1780.8293	1780.8785	-27.62	4.2e-005	
Integrin alpha-3	30	P26006	4	YLLLAGAPR	972.6132	972.5756	38.60	0.062	70
				TVEDVGSPLK	1043.5802	1043.5499	29.00	0.013	
				LELLMDNLR	1228.6267	1228.6849	-47.39	0.017	
				LELLMDNLR	1244.6217	1244.6798	-46.73	0.0056	
				EAGNPGSLFGYSVALHR	1773.8210	1773.8798	-33.14	0.17	

Table I

# RESULTATS

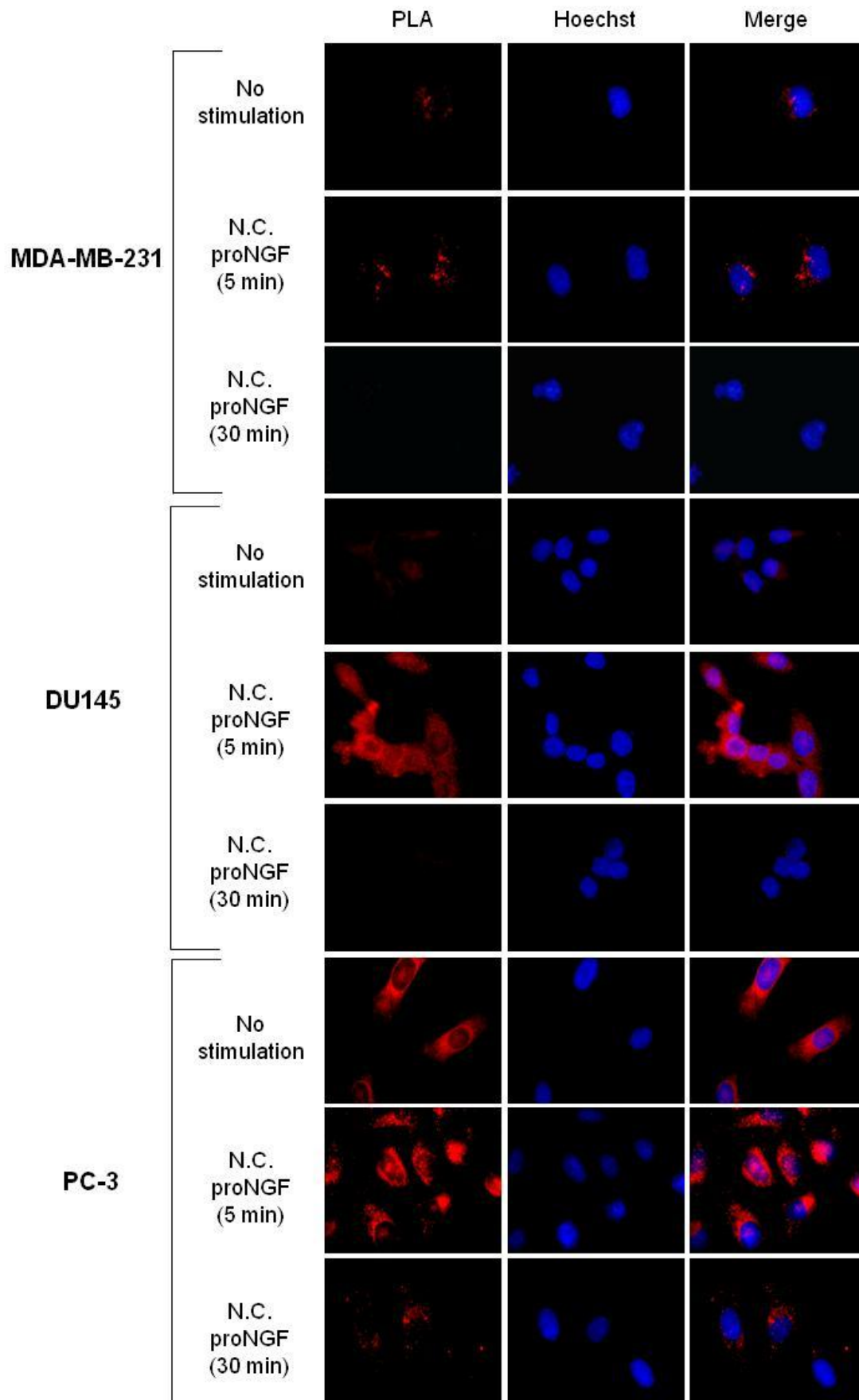


Figure S1

## RESULTATS

**Table S1: Description of the breast cancer data sets used for mRNA expression analysis**

Reference	Source of data	N° of samples	N° of breast cancer samples with <i>NTRK1/TRKA</i> mRNA available	Technological platform	N° of probe sets
van de Vijver et al., NEJM 2002	<a href="http://microarray-pubs.stanford.edu/wound_NK1/">http://microarray-pubs.stanford.edu/wound_NK1/</a>	295	254	Agilent Hu25K	25K
van't Veer et al., Nature 2002	<a href="http://www.rii.com/publications/2002/vantveer.html">http://www.rii.com/publications/2002/vantveer.html</a>	117	117	Agilent Hu25K	25K
Expression Project for Oncology (expO) 2005	<a href="https://expo.intgen.org/geo">https://expo.intgen.org/geo</a> GEO database GSE2109	348	348	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K
Ivshina et al., Cancer Res 2006	GEO database GSE4922, GSE1456	448	448	Affymetrix U133 A+B	2x22K
Bonnefoi et al., Lancet Oncol 2007	GEO database GSE6861, GSE4779	161	125	Affymetrix X3P	61K
Marty et al., Breast Cancer Res 2008	GEO database GSE13787	23	23	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K
Bos et al., Nature 2009	GEO database GSE12276	204	204	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K
Hoeflich et al., Clin Cancer Res 2009	GEO database GSE12763	30	30	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K
Barry et al., J Clin Oncol 2010	GEO database GSE23593	50	50	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K
Chen et al., Breast Cancer Res Treat 2010	GEO database GSE10780	185	42	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K
Korde et al., Breast Cancer Res Treat 2010	GEO database GSE18728	61	61	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K
Silver et al., J Clin Oncol 2010	GEO database GSE18864	84	84	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K
Desmedt et al., J Clin Oncol 2011	GEO database GSE16446	120	120	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K
Guedj et al., Oncogene 2011	Array Express database E-MTAB-365	537	521	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K
UNC Microarray Database * (2005-2009)	<a href="https://genome.unc.edu/pubsub/breastGEO/">https://genome.unc.edu/pubsub/breastGEO/</a>	459	402	Agilent	35K
Miller D et al., PNAS 2005	GEO database GSE3494	251	116	Affymetrix U133 A+B	2x22K
Farmer P et al., Oncogene 2005	GEO database GSE1561	49	49	Affymetrix U133A	22K
Minn AJ et al., Nature 2005	GEO database GSE2603	99	99	Affymetrix U133A	22K
Wang Y et al., Lancet 2005	GEO database GSE2034	286	286	Affymetrix U133A	22K
Hess KR et al., J Clin Oncol 2006	MDA133	133	133	Affymetrix U133A	22K
Sotiriou C et al., J Natl Cancer Inst 2006	GEO database GSE2990	189	80	Affymetrix U133A	22K
Desmedt C et al., Clin Cancer Res 2007	GEO database GSE7390	198	154	Affymetrix U133A	22K
Klein A et al., Int J Cancer 2007	GEO database GSE6596	26	24	Affymetrix U133A	22K
Merritt WM et al., N Engl J Med 2008	Array Express database E-MTAB-158	130	130	Affymetrix U133AofAv2	23K

## RESULTATS

<b>Schmidt M et al., Cancer Res 2008</b>	GEO database GSE11121	200	200	Affymetrix U133A	22K
<b>Yu K et al., PLoS Genet 2008</b>	GEO database GSE5364	196	183	Affymetrix U133A	22K
<b>Zhang Y et al., Breast Cancer Res Treat 2009</b>	GEO database GSE12093	136	136	Affymetrix U133A	22K
<b>Iwamoto T et al., J Natl Cancer Inst 2011</b>	GEO database GSE22093	164	164	Affymetrix U133A	22K
<b>Prat A et al., Breast Cancer Res 2010</b>	GEO database GSE18229	337	284	Agilent Hu25K	25K
<b>Tabchy A et al., Clin Cancer Res 2010</b>	GEO database GSE20271	178	178	Affymetrix U133A	22K
<b>Hatzis C et al., JAMA 2011</b>	GEO database GSE25066	508	508	Affymetrix U133A	22K
<b>Popovici V et al., Breast Cancer Res 2010</b>	GEO database GSE20194	278	278	Affymetrix U133A	22K
<b>IPC series</b>	GEO database GSE 21653	353	352	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K

*\*UNC (University of North Carolina) Microarray Database (2005-2009): gathers clinically annotated distinct breast cancer samples among 8 studies:*

*Hu et al., BMC Genomics 2006 (N=162)*

*Weigelt et al., Cancer Res 2005 (N=169)*

*Oh et al., J Clin Oncol 2006 (N=161)*

*Perreard et al., Breast Cancer Res 2006 (N=168)*

*Herschkowitz et al., Genome Biol 2007 (N=232)*

*Hoadley et al., BMC Genomics 2007 (N=248)*

*Parker et al., J Clin Oncol 2009 (N=227)*

*Hu Z et al., BMC Med 2009 (N=195)*

## RESULTATS

**Supplementary Table II: *TRKA* mRNA expression in breast cancer and histoclinical correlations**

Characteristics	N	<i>NTRK1/TRKA</i>		P-value	odds ratio [CI95]
		Down-regulated (N=3091)	Up-regulated (N=3092)		
Age				0,119	1,1
?50 years	2035	1037 (49%)	998 (46%)		[0.97-1.24]
>50 years	2257	1096 (51%)	1161 (54%)		
pN				1,29E-03	1,3
0	1814	954 (64%)	860 (58%)		[1.1-1.48]
1	1177	548 (36%)	629 (42%)		
pT				0,111	1,1
pT1	1025	527 (37%)	498 (34%)		[0.97-1.32]
pT2-3	1878	907 (63%)	971 (66%)		
Grade				0,291	1,1
1	535	277 (12%)	258 (11%)		[0.92-1.33]
2-3	4168	2053 (88%)	2115 (89%)		
ER IHC status				0,589	0,97
0	1733	863 (36%)	870 (36%)		[0.86-1.09]
1	3066	1552 (64%)	1514 (64%)		
PR IHC status				7,43E-03	0,83
0	1600	760 (47%)	840 (52%)		[0.72-0.95]
1	1622	847 (53%)	775 (48%)		
ERBB2 IHC status				0,597	0,95
0	2217	1054 (84%)	1163 (84%)		[0.76-1.17]
1	425	208 (16%)	217 (16%)		
MFS-5y	2286	70% [0.67-0.73]	70% [0.67-0.73]	0,94	

Supplementary Table II

## RESULTATS

### Article 2 :

#### **NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib**

##### **A) Introduction**

Les précédents travaux du laboratoire ont mis en évidence que l'axe NGF/TrkA contribue significativement à la mise en place des propriétés tumorigènes et métastatiques des cellules cancéreuses de sein. Cependant, la signalisation de l'axe NGF/TrkA impliquée dans le cancer du sein n'était pas encore entièrement comprise. L'objectif de ce travail a donc été de mieux définir l'interactome spécifique de l'axe NGF/TrkA dans les MDA-MB-231 HA-TrkA, dans un contexte d'invasion cellulaire. Pour y parvenir, j'ai utilisé une approche de protéomique fonctionnelle en combinant deux techniques de purification des protéines (système biotine/streptavidine et immunoprécipitation) avec une analyse en spectrométrie de masse. J'ai ainsi pu apprécier les modifications d'expression des protéines entre 0 et 30 minutes de traitement au NGF pour chacune des deux méthodes de purification.

##### **B) Résultats et conclusion**

Dans ce deuxième article, nous mettons en lumière que le NGF induit spécifiquement la formation d'un complexe TrkA/CD44. De façon intéressante, l'interaction entre les deux récepteurs est indépendante de la phosphorylation de TrkA. Nous montrons également que la coopération TrkA/CD44 engage un axe de signalisation supplémentaire, parallèle aux voies PI3K/Akt et Src, et impliquant p115RhoGEF, les RhoGTPases RhoA et RhoC, et ROCK1. En outre, nos résultats indiquent que la signalisation sous jacente de CD44, en coordination avec la signalisation canonique de TrkA, sont impliquées dans l'invasion des cellules cancéreuses du sein. De plus, en utilisant un modèle de xénogreffes de tumeur en souris SCID, nous montrons que les effets du CEP-701 sur la croissance des cellules tumorales sont renforcés par l'inhibition de CD44. L'ensemble de nos résultats démontre donc que CD44 est un acteur majeur de la signalisation NGF/TrkA dans les cancers du sein et contribue probablement à la résistance aux thérapies.

Cet article est soumis dans la revue :

« *Clinical Cancer Research* »

## RESULTATS

### NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib

Léo Aubert<sup>1,2,3†</sup>, Matthieu Guilbert<sup>1,2,3†</sup>, Cyril Corbet<sup>1,2,3</sup>, Elisabeth Génot<sup>4</sup>, Eric Adriaenssens<sup>2,5</sup>, Thierry Chassat<sup>6</sup>, François Bertucci<sup>7</sup>, Thomas Daubon<sup>4</sup>, Nicolas Magné<sup>8,9</sup>, Xuefen Le Bourhis<sup>1,2,3‡</sup>, and Robert-Alain Toillon<sup>1,2,3‡\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM U908, 59 655 Villeneuve d'Ascq, France.

<sup>2</sup> University Lille 1, 59 655 Villeneuve d'Ascq, France.

<sup>3</sup> SIRIC OncoLille, 59 000 Lille, France.

<sup>4</sup> INSERM U1045, 33 607 Pessac, France.

<sup>5</sup> CNRS UMR 8161, 59 000 Lille, France.

<sup>6</sup> PLETHA, Institut Pasteur de Lille, 59000 Lille, France.

<sup>7</sup> INSERM UMR 891, Institut Paoli-Calmettes, 13 009 Marseille, France.

<sup>8</sup> Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, EMR3738 - Equipe 4, Faculté de Médecine Lyon-Sud, 69 000 Lyon, France.

<sup>9</sup> Département de Radiothérapie, Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth, 42 270 Saint Priest en Jarez, France.

**Running title:** CD44 as a TrkA co-receptor in cancer

**Keywords:** CD44, NGF, TrkA, lestaurtinib, resistance

\* Correspondence: INSERM U908 "Cell plasticity and Cancer", Batiment SN3, University Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, FRANCE

Tel: 00 33 (0)3 20 43 65 59

Fax: 00 33 (0)3 20 43 40 38

Email: robert.toillon@univ-lille1.fr

**Disclosure of potential conflicts of interest:** The authors declare no conflict of interest.

† The two authors have equally contributed to this work.

‡ The two authors have equally contributed to this work.

## RESULTATS

### Abstract

**Purpose:** There is accumulating evidence that TrkA and its ligand Nerve Growth Factor (NGF) are involved in cancer development. Due to this evidence, staurosporine derivatives such as K252a and lestaurtinib have been developed to block TrkA kinase signaling, but no clinical trial has fully demonstrated their therapeutic efficacy. Therapeutic failures are likely due to the existence of intrinsic signaling pathways in cancer cells that impede or bypass the effects of TrkA tyrosine kinase inhibitors.

**Experimental Design:** Identification of the TrkA interactome was done by mass spectrometry proteomic approaches. Protein associations were confirmed by co-immunoprecipitation and proximity ligation assays. The functional impact of CD44 and its downstream signaling pathway on NGF-stimulated cell invasion was investigated using siRNA and pharmacological inhibitors. The antiproliferative effect of siCD44 alone or in combination with lestaurtinib was tested *in vitro* and *in vivo*.

**Results:** NGF treatment induced CD44 recruitment of TrkA to the plasma membrane and subsequent activation of the p115RhoGEF/RhoA/ROCK1 pathway to stimulate breast cancer cell invasion. The NGF-induced CD44 signaling was independent of TrkA kinase activity. More importantly, both TrkA tyrosine kinase inhibition with lestaurtinib and CD44 silencing with siRNA inhibited cell growth both *in vitro* and *in vivo*. Combined treatment significantly enhanced the antineoplastic effects of either treatment alone.

**Conclusion:** Upon NGF stimulation of cancer cells, tyrosine kinase independent TrkA signaling through CD44 was sufficient to maintain tumor aggressiveness. Our findings provide an alternative mechanism of cancer resistance to lestaurtinib and indicate that dual inhibition of CD44 and TrkA tyrosine kinase activity may represent a novel therapeutic strategy.



## RESULTATS

### Translational relevance

K252a and derivatives such as lestaurtinib (CEP-701, KT-5555) are potent inhibitors that can block the function of many kinases, including PKC, Trks, FLT3 and Jak-STAT. Indeed, the K252a mediated inhibition of nerve growth factor-induced TrkA phosphorylation is effective at a nanomolar concentration. TrkA is overexpressed in several solid tumors including pancreatic, prostate, breast and neuroblastoma cancers. In breast cancer, we described that ligands or auto-activation of TrkA enhance cancer aggressiveness both *in vitro* and *in vivo*. Nevertheless, TrkA inhibitors like lestaurtinib have failed to be effective in a clinical setting. It has recently been reported that the resistance to lestaurtinib is mediated through NF-kappa B activation in lymphoma cells. In our study, we show that tyrosine kinase independent signaling of TrkA through CD44 is sufficient to maintain tumor aggressiveness. Our findings provide an alternative mechanism of cancer resistance to lestaurtinib and indicate that dual inhibition of CD44 and TrkA tyrosine kinase activity may represent a novel therapeutic strategy.

# RESULTATS

## INTRODUCTION

Nerve growth factor (NGF), the first growth factor discovered by Stanley Cohen and Rita Levi Montalcini (1), functions in both normal tissues and cancers of different origins (2). In particular, NGF is produced and released by breast cancer and tumor-associated stromal cells. Its expression is known to drive angiogenesis (3) and to be responsible for bone metastasis pain (4). TrkA, the membrane receptor tyrosine kinase (RTK) of NGF, plays an important role in NGF-mediated biological effects. TrkA expression is associated with perineural invasion of cancer cells (5). Mounting evidence suggests that NGF not only affects tumor-associated cells but also dictates cancer cell behaviors (6). Interestingly, in breast cancer cells, TrkA activation is correlated with the high pro-invasive and metastatic potential (7-9) that is associated with poor clinical outcomes (10, 11). Tyrosine kinase inhibitors derived from staurosporine (K252a, lestaurtinib) are reported to exert antitumor effects in both *in vitro* and preclinical *in vivo* models (12). Nevertheless, TrkA kinase inhibitors failed to demonstrate therapeutic efficacy in clinical trials (13). The lack of objective responses to TrkA inhibitors in clinical trials has been linked to insufficient bioavailability of the drugs (14) and more recently, to an intrinsic resistance mechanism in cancer cells involving NF-kappa B signaling (15). Interestingly, tyrosine kinase inhibitor effects may be also due to interactions with other membrane receptors as exemplified by the interaction of numerous RTKs with CD44 (16). CD44 is a cell surface glycoprotein encoded by a single 20-exons gene that generates a standard form (CD44s) and more than twenty variant isoforms (CD44v) (17). CD44 is also known as a marker of cancer stem cells (18) and its expression may cause therapeutic failure in many cancers (19).

In this report, we demonstrate for the first time that NGF induces TrkA/CD44 interaction independent of TrkA phosphorylation in cancer cells. The subsequent CD44 downstream signaling is implicated in cancer cell invasion and growth. Altogether, our findings provide an alternative mechanism of cancer resistance to lestaurtinib and indicate that dual inhibition of CD44 and TrkA tyrosine kinase activity may represent a novel therapeutic strategy.

# RESULTATS

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

The MDA-MB-231 breast cancer cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). MDA-MB-231 overexpressing HA-TrkA or kinase-dead TrkA were established and maintained in culture as previously described (8). Cells were amplified and passaged no more than 25 times. Before treatment, cells were rinsed twice with PBS, left for 24 h in culture medium supplemented with 0.1% fetal bovine serum (FBS), then treated with recombinant human  $\beta$ -NGF (denoted as NGF and used at a 16 nM concentration in all experiments) (Scil Proteins, Germany). For some experiments, cells were pre-incubated for 1 h with the pharmacological inhibitors K252a (10 nM) or Y-27632 (10  $\mu$ M) (Calbiochem, UK) before NGF treatment.

### Cell extracts

Subconfluent MDA-MB-231 cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed (buffer consisted of 40 mM HEPES pH 7.5, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% glycerol, 10 mM sodium pyrophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1.5 mM sodium orthovanadate, and 1 mM PMSF, supplemented with a protease inhibitor cocktail) (Sigma-Aldrich, France). Cell lysates were then cleared by centrifugation (6,000 g, 10 min, 4°C) and stored at -80°C until analysis. Supernatants were collected and protein concentration was determined using the BCA assay (Sigma-Aldrich).

### Immunoprecipitation

Cell lysates were pre-cleared using matching antibody isotype and protein-G agarose beads (50% slurry in PBS, 1 h, 4°C). Cell lysates were then incubated with primary antibodies (2 h, 4°C) and complexes were precipitated with protein-G agarose beads (50% slurry in PBS, 2 h, 4°C) and eluted in Laemmli 2X buffer. Protein-G agarose beads were obtained from Millipore (France) and antibody isotypes from R&D Systems (France). The primary antibodies used in this study were: anti-HA (Roche, France) and anti-CD44 (Cell Signaling Technologies, Ozyme, France).

### Cell surface biotinylation assays

Cells were starved and chilled on ice, rinsed twice with ice-cold biotinylation buffer (PBS, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>), and then incubated (30 min, 4°C) with a membrane-

## RESULTATS

impermeable EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-biotin (1 mg/mL; Thermo Scientific, Belgium) to label membrane proteins. Free biotin was quenched (0.1 M glycine, 30 min, 4°C) and washed twice with ice-cold biotinylation buffer. Cells were then incubated in pre-warmed media at 37°C with or without NGF. Cells were then incubated with 1 mM Dithiobis Succinimidyl Propionate (Thermo Scientific) dissolved in hybridization buffer (10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>) (30 min, 4°C) and then neutralized (20 mM Tris-HCl pH 7.5 and 150 mM NaCl) (30 min, 4°C). This incubation was followed by cell lysis and biotinylated proteins were then isolated by immobilization on streptavidin agarose resins (Thermo Scientific) (3 h, 4°C). Beads were washed three times (lysis buffer, 4°C) and eluted in Laemmli buffer (7 min, 95°C).

### **Nano-LC-MS/MS Q-Star analysis**

Peptidic digests were extracted from the 1-D gel band and nanoLC-nanoESI-MS/MS analyses were performed on an hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-Star, Applied Biosystems, France) equipped with a nano-electrospray ion source coupled with a nano high pressure liquid chromatography system (LC Packings Dionex, France) as previously described (20).

### **Western blot**

Whole cell lysates or immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis and transferred to PVDF membranes (Westran® Clear Signal). The membranes were blocked with 5% milk or bovine serum albumin (BSA) in TBS-0.1% Tween20 (TBS-T) and subsequently immunoblotted overnight at 4°C. The membranes were then probed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson Immunoresearch, Beckman Coulter, France) followed by SuperSignal West Pico Substrate (Thermo Scientific). Chemiluminescence was detected with a Fuji LAS-4000 luminescent image analyzer. The antibodies used in this study were as follows: anti-actin (Sigma-Aldrich), anti-HA (Covance, Eurogentec, France), anti-pan-CD44, anti-phosphoTrkA (Tyr-674/675), anti-p115-RhoGEF, anti-ROCK1, anti-RhoA, anti-RhoC, anti-phosphoAkt (Ser-473), and anti-pan-Akt (Cell Signaling Technologies).

### **Flow cytometry analysis of plasma membrane level TrkA and CD44**

Cells were washed twice with ice-cold PBS and then incubated with isotype antibody-FITC (BD Biosciences), anti-TrkA antibody (Abcam), or anti-CD44-FITC antibody

## RESULTATS

(BD Biosciences), (1 µg in 1% SVF, 30 min, 4°C). Levels of TrkA and CD44 were analyzed using flow cytometry and Summit 4.5 software (Beckmann Coulter, France).

### ***In situ* proximity ligation assay (PLA)**

Cells ( $10^4$  cells per well) were grown on acid-washed eight-well glass slides (Thermo Scientific) in EMEM plus 10% FBS for 24 h. After treatment, paraformaldehyde-fixed cells were incubated with 4% BSA (1 h, 20°C) followed by overnight incubation with primary antibodies [rabbit anti-HA, 1:50, (Sigma); rabbit anti-TrkA, 1:50, (Alomone, Israel); mouse anti-CD44, 1:200, (Cell Signaling Technology)]. PLA was performed as recommended by manufacturer instructions.

### **siRNA**

The siRNA sequences used (100 pmol for each transfection) were against CD44 (GUAUGACACAUAUUGCUUC) and p115RhoGEF (GCAGCUCUGAGAACGGCAA) (Eurogentec, France). siRNA transfection was performed using INTERFERin<sup>TM</sup> according to the manufacturer's instructions (Polyplus transfection, Ozyme, France).

### **RhoGTPases activation assay**

Cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed in 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT, supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche). Cell lysates were prepared as described above. RhoA-GTP or RhoC-GTP levels were quantified as described previously (21).

### **Cell invasion**

Invasion assays were performed as previously described (8) in Boyden microchambers (BD Biosciences) with 8 µm pore size membranes.

### **Clonogenic cell growth**

Clonogenic assays were performed as previously described (22). After siRNA transfection, 2,000 cells were seeded in 35 mm petri dishes. Colonies were stained with crystal violet (20) and colonies of at least 50 cells were counted after one week of culture.

## RESULTATS

### **Tumor xenograft growth in immunodeficient mice**

HA-TrkA MDA-MB-231 cells ( $3 \times 10^6$ ) were subcutaneously injected into six-week old female SCID mice. Two weeks after cancer cells injection, mice were randomized into treatment groups (n=7), and were treated a total of three times at 3 day intervals. Lestaurtinib (Calbiochem) was suspended in vehicle (40% polyethylene glycol 1000, 10% povidone C30 and 2% benzyl alcohol in distilled water) and injected intraperitoneally. CD44 siRNA (7.5  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) was delivered using *in vivo* jetPEI<sup>®</sup> according to the manufacturer's instructions (Polyplus transfection) and injected subcutaneously near the tumor mass. Tumor volume was determined throughout the experiment by measuring the length (l) and width (w) and calculated as  $\pi/6 \times l \times w \times (l+w)/2$ .

### **Statistical analysis**

Statistics were performed with GraphPad Prism 5.01 software. Quantitative variables were analyzed by one-way ANOVA with Bonferroni's post-test ( $p < 0.001$ ). Data from the *in vivo* experiment were analyzed using the Mann-Whitney test.

## RESULTS

### **CD44 association with TrkA at the plasma membrane is enhanced by NGF stimulation**

MDA-MB-231 breast cancer cells overexpressing HA-TrkA were used to examine the signaling pathways involved in NGF response as described previously (8). Cells were treated with NGF for 30 min, cell lysates were then subjected to HA immunoprecipitation (IP) or streptavidin pull-down. Eluates were resolved by SDS-PAGE and visualized with colloidal Coomassie Blue staining (Fig. S1). Several differential bands were detected in NGF-treated cells corresponding to proteins that may be specifically bound to TrkA. These bands were excised for identification using mass spectrometry. Among the proteins identified, we found CD44 and several of its known signaling partners including Ezrin, Moesin, p115RhoGEF (Rho guanine nucleotide exchange factor 1), FAK1 (Focal adhesion kinase 1), ARP2C (Actin-related protein 2/3 complex subunit 2), Alpha-actinin-1, LIMA1 (LIM domain and actin-binding protein 1) (Table 1). Moreover, mass spectrometry analysis of various bands after biotin labeling and streptavidin pull-down allowed for the identification of several membrane-associated proteins such as RhoA (Transforming protein RhoA), RhoC (Rho-related GTP-binding protein C), Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13, Arp2 (Actin-related

## RESULTATS

protein 2), R-Ras2 (Ras-related protein 2), Basigin (CD147) and Actin 2 (Actin cytoplasmic 2) (Table 1). There is increasing evidence that CD44 is involved in cancer development (16-19), but it has not been reported to interact with TrkA or participate in its downstream signaling. To validate the interaction between TrkA and CD44, we performed IP and reverse IP, using HA and CD44 antibodies, respectively (Fig. 1A and B). TrkA and CD44 were co-immunoprecipitated (co-IP) in NGF-untreated control cells, and the co-IP was further increased upon NGF treatment. We then performed a proximity ligation assay (PLA) to determine any direct interaction between CD44 and TrkA at the plasma membrane (Fig. 1C). In the absence of NGF, a clear PLA signal (red dots) was observed indicating that even without stimulation TrkA binds CD44. When cells were treated with NGF for 5 min, a dramatic increase in the TrkA/CD44 complexes was observed at the plasma membrane. This increase was transient as the PLA signal returned to basal level after 30 min of NGF treatment. The observed kinetics of CD44/TrkA association might be due to TrkA shuttling. Indeed, flow cytometry analysis showed that membrane TrkA was not altered after 5 min of NGF treatment, but was drastically reduced after 30 min, indicating internalization of TrkA (Fig. 1D). Membrane CD44 was increased after 5 min of NGF treatment but returned to basal levels after 30 min (Fig. 1E). TrkA/CD44 association was also tested in cell lines from breast, prostate, colon, head and neck cancers (Fig. S2) although total expression levels of CD44 and TrkA varied between the cell lines (Fig. S2A). In PC3 prostate cancer cells, which express relatively high levels of both CD44 and TrkA, NGF stimulation resulted in the association of TrkA with CD44 at the plasma membrane, as demonstrated using the PLA signal of TrkA/CD44 (Fig. S2B). Altogether, these results indicate that NGF induces the recruitment of TrkA to CD44 at the plasma membrane in cancer cells of various origins.

### **CD44 diversifies NGF signaling through the p115RhoGEF/RhoA/ROCK1 pathway to stimulate cell invasion**

CD44 is known to stimulate breast tumor cell invasion through the p115RhoGEF/RhoA pathway (23). Interestingly, we found that p115RhoGEF co-immunoprecipitated with TrkA in NGF-treated cells (Table 1). To confirm the downstream association of p115RhoGEF to the TrkA/CD44 complex, we used co-IP to investigate whether they directly interact. Indeed, antibodies against the HA tag or CD44 were able to pull down p115RhoGEF (Fig. 2A and B). Moreover, upon NGF treatment, ROCK1 (the main target of RhoA and RhoC) was also found to co-IP with TrkA and CD44 (Fig. 2C and D). The involvement of p115RhoGEF and

## RESULTATS

ROCK1 in NGF-induced signaling was further supported by the activation of RhoA and RhoC, which are p115RhoGEF downstream targets (Fig. 2E). In order to better understand the functional consequence of CD44 activated p115RhoGEF/RhoA/RhoC/ROCK1 signaling, we analyzed the invasive capacity of breast cancer cells *in vitro* using a transwell system. We found that inhibition of CD44 and p115RhoGEF either through siRNA or the ROCK1 specific inhibitor Y-27632 totally abolished NGF-induced invasion (Fig. 2F-H). Interestingly, blocking CD44 affected neither NGF-induced TrkA phosphorylation nor the canonical TrkA pathways that signal through Akt and Src (Fig. S3). Together, these results indicate that the TrkA/CD44 complex induced by NGF is able to recruit and activate the p115RhoGEF/RhoA/RhoC/ROCK1 signaling pathway to enhance cell invasion, independently of TrkA canonical pathways.

### **TrkA/CD44 association is independent of NGF-induced TrkA phosphorylation**

Our findings that blocking CD44 abolished NGF-induced cell invasion but did not affect NGF-induced TrkA tyrosine kinase phosphorylation, prompted us to evaluate whether the activation state of TrkA could affect the TrkA/CD44 association at the plasma membrane. We performed a PLA on cells treated with TrkA tyrosine kinase inhibitor K252a or on cells expressing TrkA kinase-dead mutant to reduce or abolish TrkA phosphorylation (Fig. S4). In DMSO treated cells (control), PLA signal strongly increased at the plasma membrane after 5 min of treatment with NGF but returned to basal levels after 30 min of treatment (Fig. 3A). Similar results were observed in both K252a-treated cells and cells expressing TrkA kinase-dead mutant after 5 min of treatment with NGF (Fig. 3C). These results indicated that the interaction between TrkA and CD44 is independent of TrkA tyrosine kinase activity. However, after 30 min of NGF treatment, TrkA/CD44 interaction did not return to basal levels in K252a-treated (Fig. 3B) and kinase-dead mutant (Fig. 3C) cells compared to control (Fig. 3A). This could be due to suboptimal TrkA internalization as it has been reported that phosphorylation of TrkA offers docking sites for cellular endocytosis machinery (24). To verify this possibility, we performed flow cytometry analysis to evaluate the membrane levels of TrkA (Fig. 3D). Indeed, after 30 min of NGF treatment, TrkA levels were higher in cells treated with K252a compared with DMSO-treated control cells, indicating that inhibition of TrkA phosphorylation slowed TrkA internalization. Together, these results indicate that TrkA/CD44 association is independent of TrkA phosphorylation. However, the inhibition of



## RESULTATS

TrkA phosphorylation favors TrkA/CD44 association due to the impairment of TrkA internalization.

### **Combinational targeting of TrkA and CD44 exhibits enhanced anti-tumor activity**

As recruitment of TrkA by CD44 was independent of TrkA phosphorylation, and TrkA tyrosine inhibitor K252a allowed for sustained TrkA and CD44 association at the plasma membrane, we wanted to know if combinational targeting of TrkA and CD44 could more efficiently inhibit tumor cell growth. As shown in Fig. 4A and B, K252a treatment of MDA-MB-231 cells reduced both the size and the number of colonies. Blocking CD44 by siRNA only slightly decreased colony formation. Interestingly, combined treatment of cells with K252a and siCD44 dramatically reduced clonogenic cell growth. We next evaluated the efficiency of these treatments *in vivo* by performing tumor xenograft experiments in the SCID mouse model. As shown in Fig. 4C and D, lestaurtinib (clinical derivative of K252a) or siCD44 reduced tumor growth when compared to control. Combined treatment of lestaurtinib and siCD44 resulted in a dramatic reduction of tumor burden when compared to lestaurtinib or siCD44 treatment alone. We also confirmed the direct interaction between TrkA and CD44 in tumor xenografts using a PLA (Fig. 4E).

## DISCUSSION

In this study, we report for the first time that TrkA is associated with CD44 in cancer cells. CD44 is the principal receptor for the large glycosaminoglycan hyaluronan. CD44 lacks kinase activity but influences cell behaviors such as uncontrolled growth, apoptosis evasion, angiogenesis, cell motility and invasion through various mechanisms (25). CD44 directly interacts with key intracellular regulators of the actin cytoskeleton such as ankyrin, and members of the ezrin, radixin, and moesin (ERM) protein families. CD44 can also function as a co-receptor to modulate signaling from a diverse set of membrane receptors including integrins, multidrug resistance complex components (MDR 1, CD147) and growth factor receptors such as EGFR, PDGFR, FGFR, and c-Met (19). CD44 cooperates with RTKs through different mechanisms. For instance, CD44 transactivates the ErbB2/ErbB3 heterodimer by Src-mediated phosphorylation of ErbB2. CD44 can also initiate growth factor receptor signaling by interacting with various ligands. For instance, binding of proHBEGF to CD44v3 induces cleavage of the proform and release of HBEGF that in turn activates ErbB4. CD44v also binds to HGF/SF and FGF and presents them to their specific RTK (26). A splice

## RESULTATS

variant of CD44 expressed in the apical ectoderm ridge presents FGFs to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth (27). In our cell models, because CD44 is co-immunoprecipitated with TrkA and we observed a positive signal from the PLA, a direct association between TrkA and CD44 is suggested. Alternatively, NGF is known to bind to heparan sulfate with low affinity (28), it is possible that NGF serves as a bridge between TrkA and CD44. Moreover, the formation of TrkA/CD44 complex upon NGF stimulation leads to the activation of the canonical CD44 pathway involving p115RhoGEF, RhoA and ROCK1 (Fig. 5). TrkA and CD44 co-expression has been already reported in neuroblastoma cells (29) but the authors did not examine their interaction nor the resulting intracellular signaling. TrkA signaling has been widely described in nerve systems and similar signaling pathways have also been found in cancer cells. Indeed, NGF binding to TrkA induces phosphorylation of TrkA, phospho-TrkA then recruits various intracellular adaptors (e.g. Shc, Grb2, or PI3K) to activate MAPK or PI3K, resulting in cell growth or differentiation depending on the cell type. TrkA signaling is also modulated by several co-receptors such as p75<sup>NTR</sup>, GPCR (G protein-coupled receptor), and Ret-5. P75<sup>NTR</sup> is a low affinity receptor and is the first described co-receptor of TrkA. After its binding to p75<sup>NTR</sup>, NGF has an increased affinity for TrkA (30). In addition, p75<sup>NTR</sup> also delays TrkA ubiquitination and sustains its phosphorylation (31). However, we have previously shown that p75<sup>NTR</sup> is not involved in NGF-stimulated invasion of breast cancer cells (8). Transactivation of TrkA receptors in PC12 cells and TrkB in hippocampal neurons has been observed after treatment with adenosine or PACAP neuromodulators, both of which act through GPCRs (32). Trk receptor transactivation by adenosine or PACAP requires a longer time course. Furthermore, the increase in Trk activity can be inhibited by the use of K252a, PP1 and Src family-specific inhibitors. Trk receptors also have the capacity to activate the Ret-51 receptor tyrosine kinase in postnatal superior cervical ganglion (SCG) neurons. Ret-51 activation does not depend on the PI3K or MAPK pathways and occurs with a very slow kinetics, similar to GPCR activation of Trk receptors (33).

Receptor tyrosine kinases are widely activated in cancers, and have been the focus of targeted therapies for several decades. TrkA is a prototypical RTK and phospho-TrkA has been correlated with the tumor aggressiveness in breast cancer (7). We showed that in breast cancer cell lines, the biological effects of TrkA are mainly supported by its phosphorylation (8, 9). Moreover, it has been found that NTRK1 fusion or rearrangement that constitutively activates TrkA by phosphorylation is oncogenic in lung tissue (34). Altogether, these data indicate the importance of phospho-TrkA and its canonical signaling pathways in tumor development and

## RESULTATS

suggest that tyrosine kinase inhibitors would be good candidates for cancer therapy. Nevertheless, despite the powerful anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo* (35-37), therapeutic benefits of such compounds have not been documented. In this report, we show that the NGF/TrkA axis engages CD44 as a co-receptor to strengthen cancer cell invasion and growth. This interaction is independent of the kinase activity of TrkA. Our findings provide a rational for the development of new therapeutics by simultaneously blocking both the kinase dependent and independent effects of TrkA.

## RESULTATS

### AUTHORS CONTRIBUTION

**Conception and design:** L. Aubert, M. Guilbert, C. Corbet, R.-A. Toillon

**Development of methodology:** L. Aubert, M. Guilbert, C. Corbet, R.-A. Toillon

**Acquisition of data:** L. Aubert, M. Guilbert, C. Corbet, E. Adriaenssens, T. Chassat, T. Daubon, R.-A. Toillon

**Analysis and interpretation of data:** L. Aubert, M. Guilbert, E. Génot, F. Bertucci, N. Magné, R.-A. Toillon

**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** L. Aubert, M. Guilbert, C. Corbet, E. Génot, F. Bertucci; X. Le Bourhis, R.-A. Toillon

**Administrative, technical, or material support:** E. Adriaenssens, T. Chassat, E. Génot, T. Daubon, F. Bertucci, N. Magné, R.-A. Toillon

**Study supervision:** R.-A., Toillon, X. Le Bourhis

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Isabelle Lefebvre for her excellent technical assistance. Anne-Sophie Lacoste performed the mass spectrometry analysis (Mass Spectrometry facility, IFR-147, University Lille 1, France). We also thank the animal facility at the Pasteur Institute of Lille (PLETHA) for animal housing (Dr J.P. de Cavel). In memory of Monique.

### GRANT SUPPORT

This work was supported by grants from “la Ligue contre le cancer”, “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer”, GEFLUC and the SIRIC Oncolille.

## RESULTATS

### REFERENCES

1. Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1954;40:1014-8.
2. Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, Mougel A, Page A, Romon R, et al. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:346-51.
3. Romon R, Adriaenssens E, Lagadec C, Germain E, Hondermarck H, Le Bourhis X. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. *Mol Cancer* 2010;9:157.
4. Bloom AP, Jimenez-Andrade JM, Taylor RN, Castaneda-Corral G, Kaczmarek MJ, Freeman KT, et al. Breast cancer-induced bone remodeling, skeletal pain, and sprouting of sensory nerve fibers. *J Pain* 2011;12:698-711.
5. Marchesi F, Piemonti L, Mantovani A, Allavena P. Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:77-82.
6. Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V, Hondermarck H. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22:5592-601.
7. Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Ann Florenes V, Nielsen S, Nesland JM. Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004;83:119-28.
8. Demont Y, Corbet C, Page A, Ataman-Onal Y, Choquet-Kastylevsky G, Fliniaux I, et al. Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein. *J Biol Chem* 2012;287:1923-31.
9. Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, Foveau B, Vanhecke E, Romon R, et al. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* 2009;28:1960-70.
10. Mansell J, Monypenny IJ, Skene AI, Abram P, Carpenter R, Gattuso JM, et al. Patterns and predictors of early recurrence in postmenopausal women with estrogen receptor-positive early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009;117:91-8.
11. Alexander S, Friedl P. Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure. *Trends Mol Med* 2012;18:13-26.
12. Weeraratna AT, Dalrymple SL, Lamb JC, Denmeade SR, Miknyoczki S, Dionne CA, et al. Pan-trk inhibition decreases metastasis and enhances host survival in experimental models as a result of its selective induction of apoptosis of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001;7:2237-45.
13. Marshall JL, Kindler H, Deeken J, Bhargava P, Vogelzang NJ, Rizvi N, et al. Phase I trial of orally administered CEP-701, a novel neurotrophin receptor-linked tyrosine kinase inhibitor. *Invest New Drugs* 2005;23:31-7.
14. Collins C, Carducci MA, Eisenberger MA, Isaacs JT, Partin AW, Pili R, et al. Preclinical and clinical studies with the multi-kinase inhibitor CEP-701 as treatment for

## RESULTATS

prostate cancer demonstrate the inadequacy of PSA response as a primary endpoint. *Cancer Biol Ther* 2007;6:1360-7.

15. Holz MS, Janning A, Renne C, Gattenlohner S, Spieker T, Brauninger A. Induction of endoplasmic reticulum stress by sorafenib and activation of NF-kappaB by lestaurtinib as a novel resistance mechanism in Hodgkin lymphoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2013;12:173-83.

16. Orian-Rousseau V, Ponta H. Adhesion proteins meet receptors: a common theme? *Adv Cancer Res* 2008;101:63-92.

17. Ponta H, Wainwright D, Herrlich P. The CD44 protein family. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:299-305.

18. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:675-99.

19. Zoller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* 2011;11:254-67.

20. Toillon RA, Lagadec C, Page A, Chopin V, Sautiere PE, Ricort JM, et al. Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1239-47.

21. Varon C, Basoni C, Reuzeau E, Moreau V, Kramer IJ, Genot E. TGFbeta1-induced aortic endothelial morphogenesis requires signaling by small GTPases Rac1 and RhoA. *Exp Cell Res* 2006;312:3604-19.

22. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2006;1:2315-9.

23. Bourguignon LY, Singleton PA, Zhu H, Diedrich F. Hyaluronan-mediated CD44 interaction with RhoGEF and Rho kinase promotes Grb2-associated binder-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase signaling leading to cytokine (macrophage-colony stimulating factor) production and breast tumor progression. *J Biol Chem* 2003;278:29420-34.

24. Lin DC, Quevedo C, Brewer NE, Bell A, Testa JR, Grimes ML, et al. APPL1 associates with TrkA and GIPC1 and is required for nerve growth factor-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol* 2006;26:8928-41.

25. Louderbough JM, Schroeder JA. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Mol Cancer Res* 2011;9:1573-86.

26. Matzke A, Herrlich P, Ponta H, Orian-Rousseau V. A five-amino-acid peptide blocks Met- and Ron-dependent cell migration. *Cancer Res* 2005;65:6105-10.

27. Sherman L, Wainwright D, Ponta H, Herrlich P. A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth. *Genes Dev* 1998;12:1058-71.

28. Wood MD, Hunter D, Mackinnon SE, Sakiyama-Elbert SE. Heparin-binding-affinity-based delivery systems releasing nerve growth factor enhance sciatic nerve regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed* 2010;21:771-87.

29. Kramer K, Cheung NK, Gerald WL, LaQuaglia M, Kushner BH, LeClerc JM, et al. Correlation of MYCN amplification, Trk-A and CD44 expression with clinical stage in 250 patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997;33:2098-100.

## RESULTATS

30. Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 1991;350:678-83.
31. Makkerh JP, Ceni C, Auld DS, Vaillancourt F, Dorval G, Barker PA. p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep* 2005;6:936-41.
32. Lee FS, Rajagopal R, Chao MV. Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:11-7.
33. Tsui-Pierchala BA, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. NGF utilizes c-Ret via a novel GFL-independent, inter-RTK signaling mechanism to maintain the trophic status of mature sympathetic neurons. *Neuron* 2002;33:261-73.
34. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med* 2013;19:1469-72.
35. Wang T, Yu D, Lamb ML. Trk kinase inhibitors as new treatments for cancer and pain. *Expert Opin Ther Pat* 2009;19:305-19.
36. Festuccia C, Muzi P, Gravina GL, Millimaggi D, Specca S, Dolo V, et al. Tyrosine kinase inhibitor CEP-701 blocks the NTRK1/NGF receptor and limits the invasive capability of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 2007;30:193-200.
37. Thress K, Macintyre T, Wang H, Whitston D, Liu ZY, Hoffmann E, et al. Identification and preclinical characterization of AZ-23, a novel, selective, and orally bioavailable inhibitor of the Trk kinase pathway. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1818-27.
38. Martin TA, Harrison G, Mansel RE, Jiang WG. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;46:165-86.
39. Arpin M, Chirivino D, Naba A, Zwaenepoel I. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell Adh Migr* 2011;5:199-206.
40. Guilluy C, Garcia-Mata R, BurrIDGE K. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol* 2011;21:718-26.
41. Arpaia E, Blaser H, Quintela-Fandino M, Duncan G, Leong HS, Ablack A, et al. The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of alpha5-integrin and the activation of Src, Ras and Erk. *Oncogene* 2012;31:884-96.
42. Yokotsuka M, Iwaya K, Saito T, Pandiella A, Tsuboi R, Kohno N, et al. Overexpression of HER2 signaling to WAVE2-Arp2/3 complex activates MMP-independent migration in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126:311-8.
43. Korobova F, Svitkina T. Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuriteogenesis in neuronal cells. *Mol Biol Cell* 2008;19:1561-74.
44. Cao XX, Xu JD, Xu JW, Liu XL, Cheng YY, Li QQ, et al. RACK1 promotes breast carcinoma migration/metastasis via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126:555-63.
45. Stevenson RP, Veltman D, Machesky LM. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance. *J Cell Sci* 2012;125:1073-9.
46. Bourguignon LY. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2008;18:251-9.

## RESULTATS

47. Bourguignon LY, Wong G, Earle C, Krueger K, Spevak CC. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Src-mediated twist signaling, microRNA-10b expression, and RhoA/RhoC up-regulation, leading to Rho-kinase-associated cytoskeleton activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 2010;285:36721-35.
48. Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, et al. p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for G $\alpha$ 12 and G $\alpha$ 13. *Science* 1998;280:2109-11.
49. Li QQ, Wang WJ, Xu JD, Cao XX, Chen Q, Yang JM, et al. Up-regulation of CD147 and matrix metalloproteinase-2, -9 induced by P-glycoprotein substrates in multidrug resistant breast cancer cells. *Cancer Sci* 2007;98:1767-74.
50. Keely PJ, Rusyn EV, Cox AD, Parise LV. R-Ras signals through specific integrin alpha cytoplasmic domains to promote migration and invasion of breast epithelial cells. *J Cell Biol* 1999;145:1077-88.



## RESULTATS

**TABLE**

**Table I. Identification of NGF-induced CD44 signaling.** Mass spectrometry identification of CD44 interaction with TrkA (HA-TrkA IP) and plasma membrane-associated proteins (streptavidin pull-down) under NGF stimulation was performed as described in materials and methods.

	<b>Protein name</b>	<b>Uniprot ID</b>	<b>Mass (kDa)</b>	<b>Number of peptides</b>	<b>Mascot score</b>	<b>Refs</b>
<b>TrkA-interacting proteins (HA-TrkA immunoprecipitation)</b>	<b>CD44 antigen</b>	P16070	81	3	125	(19)
	<b>Ezrin</b>	P15311	80	22	318	(38)
	<b>Moesin</b>	P26038	75	9	165	(39)
	<b>Rho guanine nucleotide exchange factor 1</b>	Q92888	115	11	104	(23, 40)
	<b>Focal adhesion kinase 1</b>	Q05397	125	2	40	(41)
	<b>Actin-related protein 2/3 complex subunit 2</b>	O15144	34	8	122	(42, 43)
	<b>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1</b>	P63244	35	20	578	(44)
	<b>Alpha-actinin-1</b>	P12814	103	20	245	(45)
	<b>LIM domain and actin-binding protein 1</b>	Q9UHB6	85	3	64	(45)
<b>Plasma membrane-associated proteins (streptavidin pull-down)</b>	<b>Transforming protein RhoA</b>	P61586	21	6	204	(46, 47)
	<b>Rho-related GTP-binding protein RhoC</b>	P08134	22	6	219	(46, 47)
	<b>Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13</b>	Q14344	44	10	133	(48)
	<b>Actin-related protein 2</b>	P61160	44	16	326	(43)
	<b>Basigin</b>	P35613	42	8	182	(49)
	<b>Ras-related protein R-Ras2</b>	P62070	23	3	62	(50)
	<b>Actin, cytoplasmic 2</b>	P63261	42	21	569	(45)

## RESULTATS

### FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** NGF induces recruitment of CD44 to TrkA. HA-TrkA MDA-MB-231 cells were treated with NGF (5 and 30 min). (A) CD44 and TrkA complexes were detected by IP with anti-HA antibody followed by immunoblotting with anti-CD44 antibody. (B) Reverse IP with anti-CD44 antibody followed by immunoblotting with anti-HA antibody. (C) TrkA/CD44 association was visualized by a PLA; interactions between TrkA and CD44 are shown as red spots. (D and E) Flow cytometry analyses of membrane levels of TrkA (D) and CD44 (E).

**Figure 2.** CD44 and the downstream p115RhoGEF/RhoGTPases/ROCK1 signaling pathway is involved in NGF-stimulated cell invasion. (A-D) NGF induces TrkA association with CD44/p115RhoGEF/RhoGTPases/ROCK1. HA-TrkA MDA-MB-231 cells were treated with NGF (5 and 30 min). IPs were done with anti-HA or anti-CD44 antibodies, and immunoblotting was used to detect the presence of p115RhoGEF (A and B) and ROCK1 (C and D) in the eluate. (E) NGF increases RhoGTPase activity. HA-TrkA MDA-MB-231 cells were stimulated with NGF (5 or 30 min) and GTP-bound RhoA and RhoC were determined in cell lysates by an affinity pull-down assay with the GST-Rho binding domain followed by immunoblotting for RhoA and RhoC. Whole cell lysate samples were immunoblotted for total RhoA/C as a control. Figures are representative of three independent pull-down assays. (F-H) CD44, p115RhoGEF and ROCK1 are involved in NGF-stimulated cell invasion. The role of CD44 (F) and p115RhoGEF (G) was examined in the breast cancer cells by transfecting them with siCD44 or sip115RhoGEF. ROCK1 involvement in cell function was assessed using the Y-27632 compound (H). HA-TrkA MDA-MB-231 cells were treated with NGF and invading cells were evaluated using Transwells. Data are mean  $\pm$  S.D. of three experiments done in triplicate and are presented as a percentage of controls. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. Error bars represent S.D. \*  $p < 0.001$  for NGF stimulation *versus* no stimulation; §  $p < 0.001$  for experimental *versus* control under NGF stimulation. siRNA efficiency was assessed by immunoblot with specific antibodies against CD44 or p115RhoGEF.  $\beta$ -actin was used as a loading control.

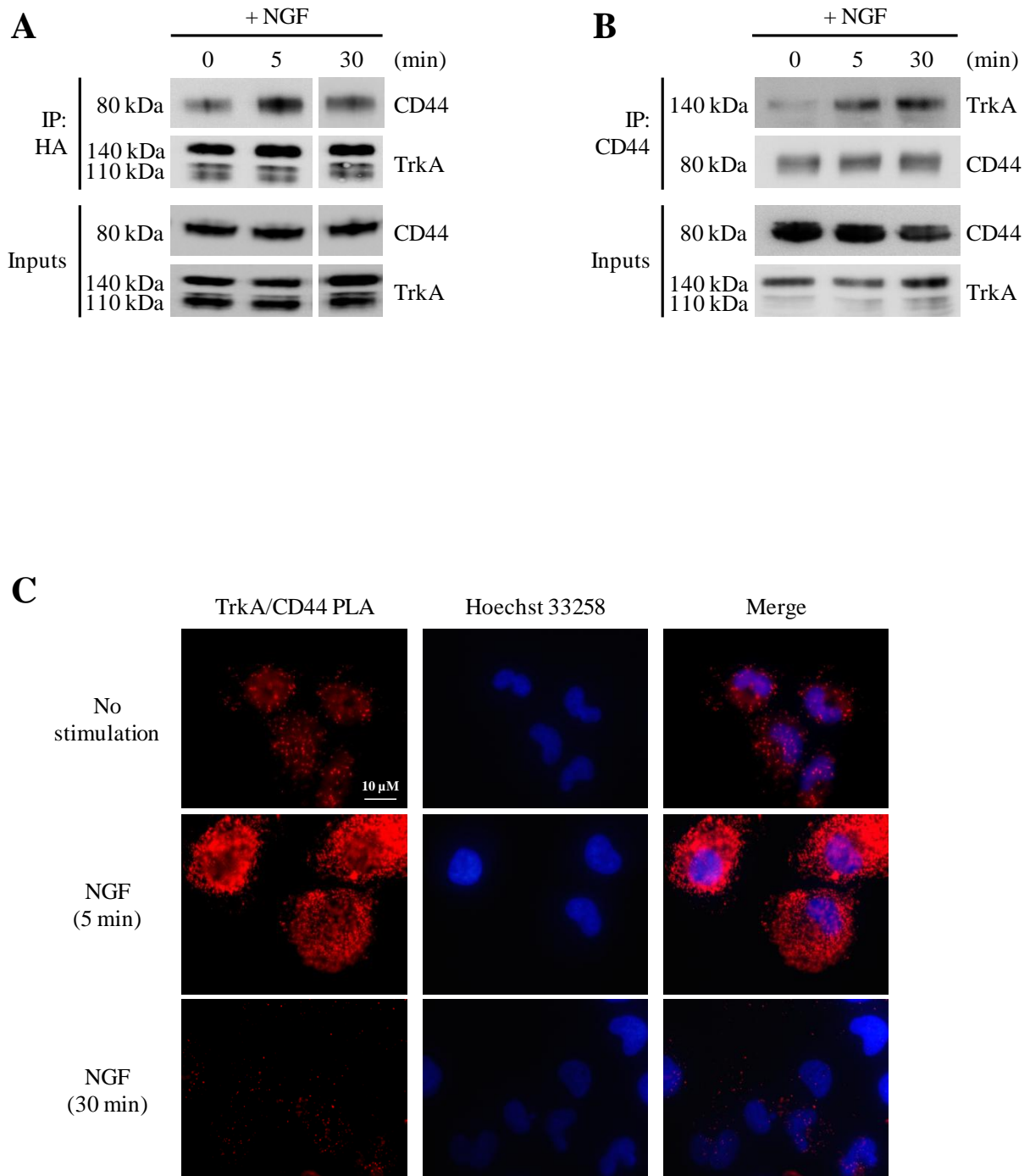
## RESULTATS

**Figure 3.** TrkA recruits CD44 independently of its kinase domain activity. (A-C) HA-TrkA MDA-MB-231 cells were incubated with DMSO (A) or with K252a (B). HA-TrkA kinase-dead MDA-MB-231 cells (C) were treated with NGF (5 or 30 min). The interactions between TrkA and CD44 were visualized by the detection of red spots by PLA. (D) K252a impedes TrkA internalization as monitored by flow cytometry. Results are representative of three independent experiments.

**Figure 4.** Effects of combined targeting of TrkA and CD44 on tumor cell growth. (A and B) The effects of siCD44 and TrkA kinase inhibition by K252a on colony formation. Cells were plated at single cell density and cultured for one week. (A) Representative pictures of forming colonies. (B) Quantification of colony forming units (CFU). (C and E) Impact of TrkA or/and CD44 inhibitions on tumor growth *in vivo*. Xenograft experiments were conducted using HA-TrkA MDA-MB-231 cells. The tumors were allowed to develop for 14 days and the mice were then submitted to 3 injections (every 3 days; black arrows) of either vehicle (Control), lestaurtinib (10 mg/kg), siCD44 (7.5 µg/mouse) or lestaurtinib and siCD44. (C) Tumor volumes measured at different intervals. A Mann-Whitney test was performed between the control group and lestaurtinib (a), the control group and siCD44 (b), the control group and lestaurtinib + siCD44 (c), and between the siCD44 group and lestaurtinib + siCD44 (d). \* P<0.05; \*\* P<0.01; ns: not significant. (D) Dot plot representation of tumor volume at the end of the experiment. (E) Brightfield PLA assays of TrkA/CD44 interaction on MDA-MB-231 tumor xenografts. PLA assays were performed on tumor xenografts from control group. Pictures are representative of three independent PLA assays.

**Figure 5.** Proposed model of lestaurtinib resistance through a phospho-TrkA-independent pathway involving downstream CD44 signaling. Lestaurtinib inhibits the kinase activity of TrkA and phospho-TrkA-dependent downstream signaling including Akt. However, a phospho-TrkA-independent pathway that uses CD44 signaling may serve as an alternative pathway to strengthen tumor aggressiveness and to escape lestaurtinib inhibition.

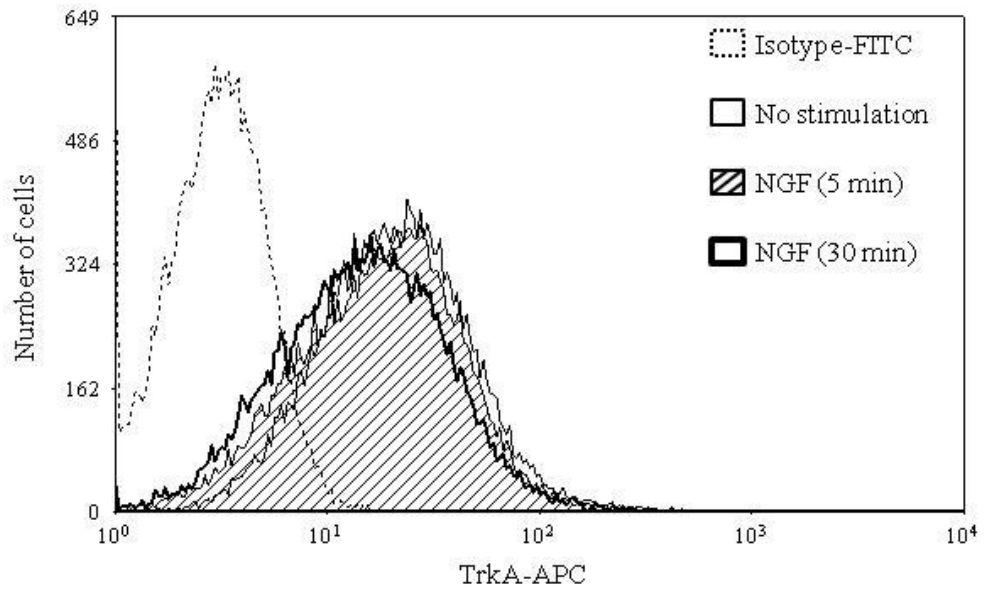
# RESULTATS



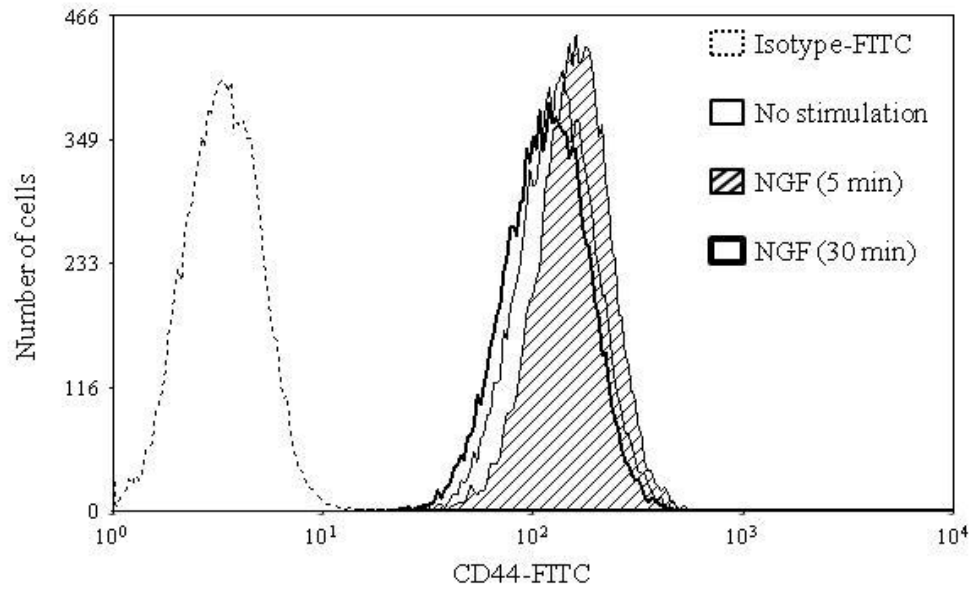
Aubert *et al.*, Figure 1

# RESULTATS

**D**

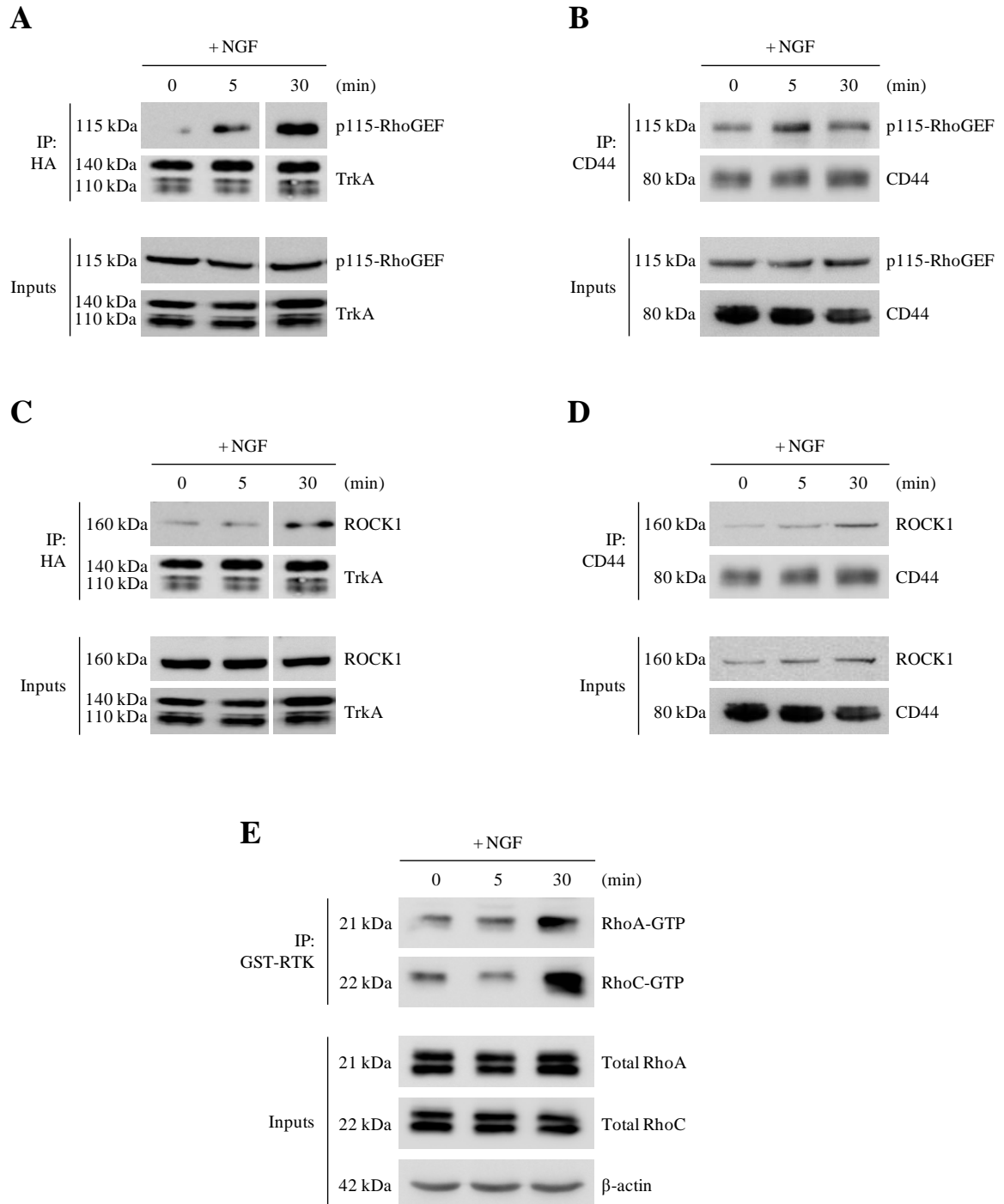


**E**



Aubert *et al.*, Figure 1

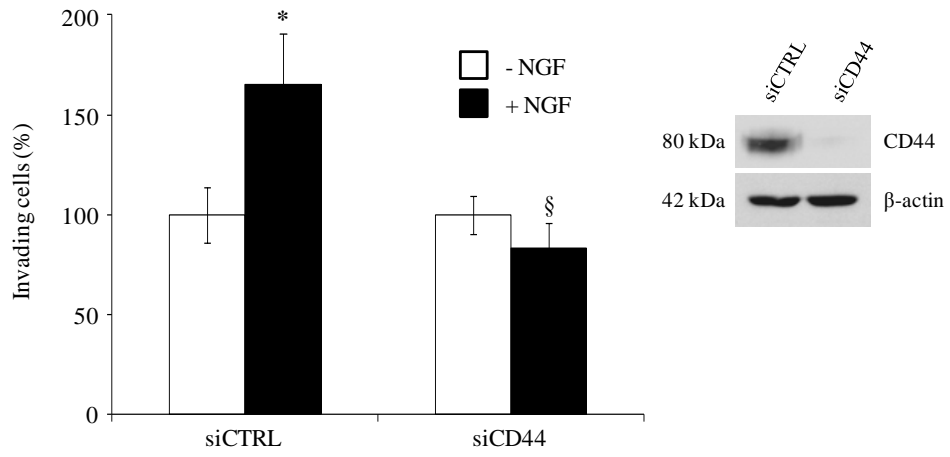
# RESULTATS



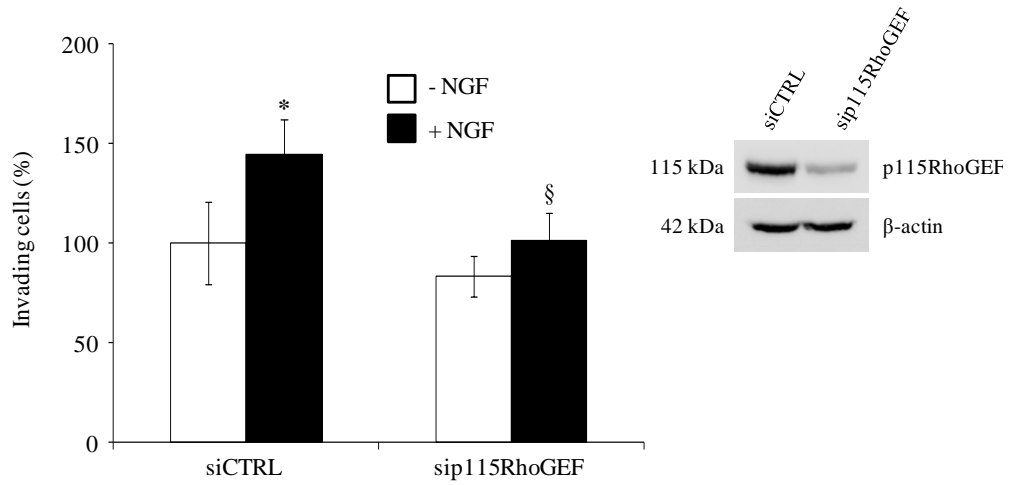
Aubert *et al.*, Figure 2

# RESULTATS

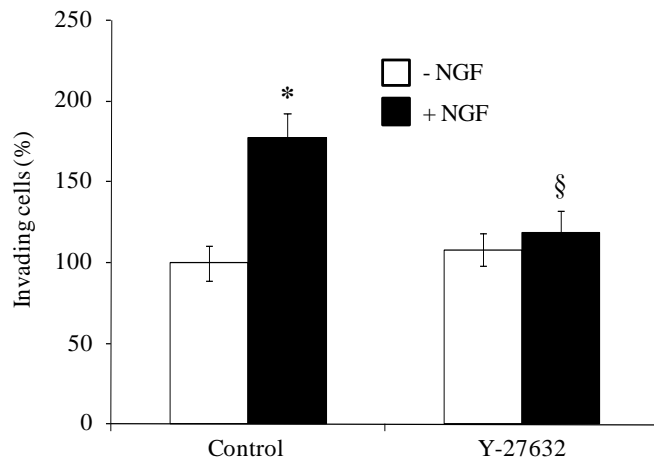
**F**



**G**

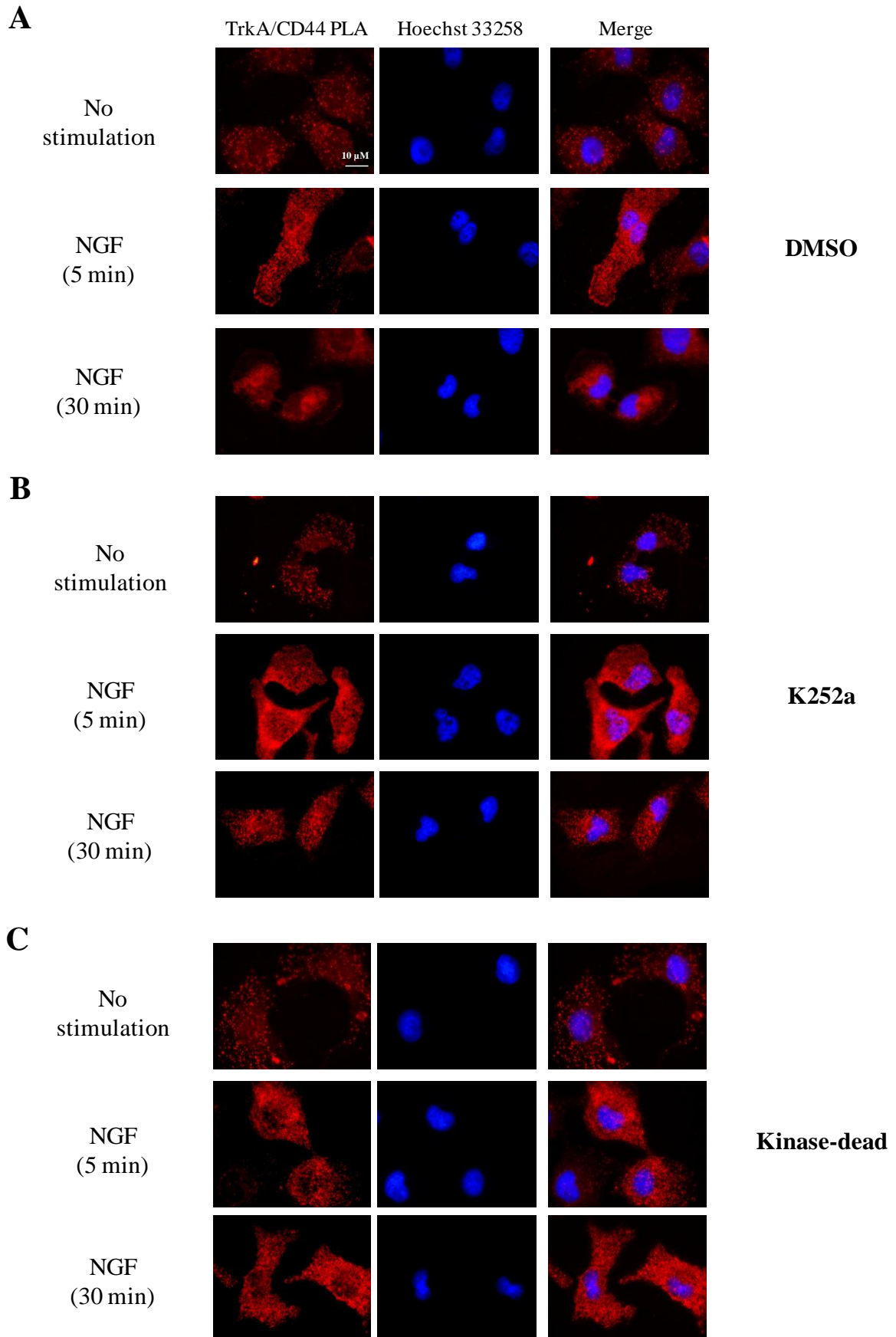


**H**



Aubert *et al.*, Figure 2

# RESULTATS

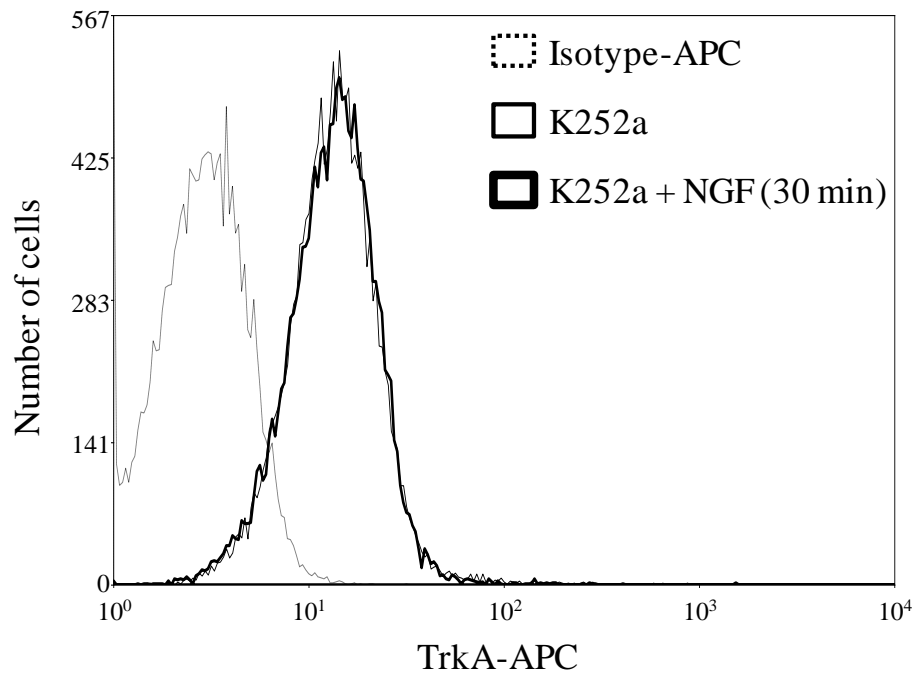
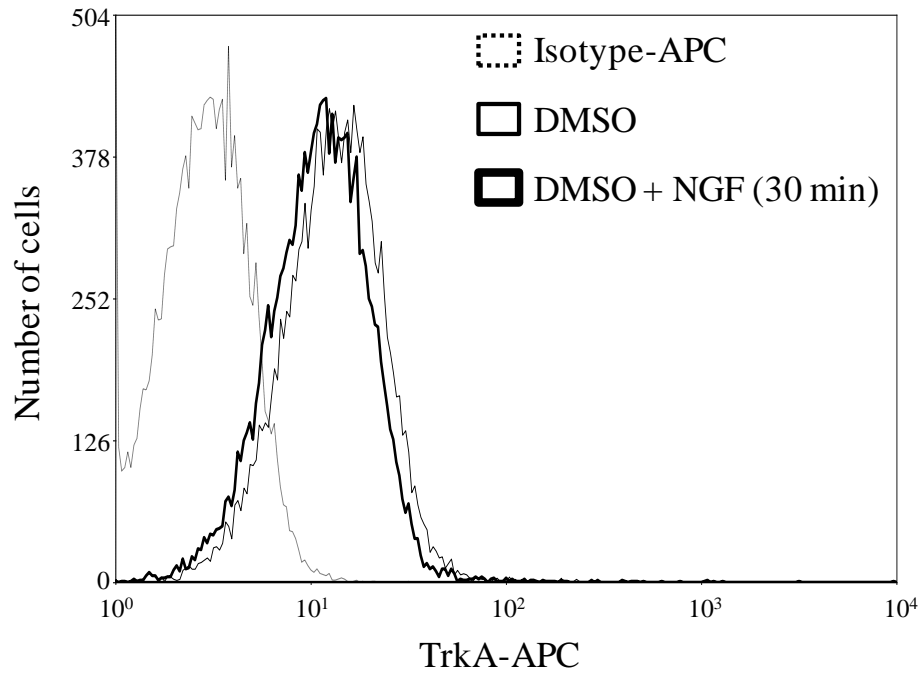


Aubert *et al.*, Figure 3



# RESULTS

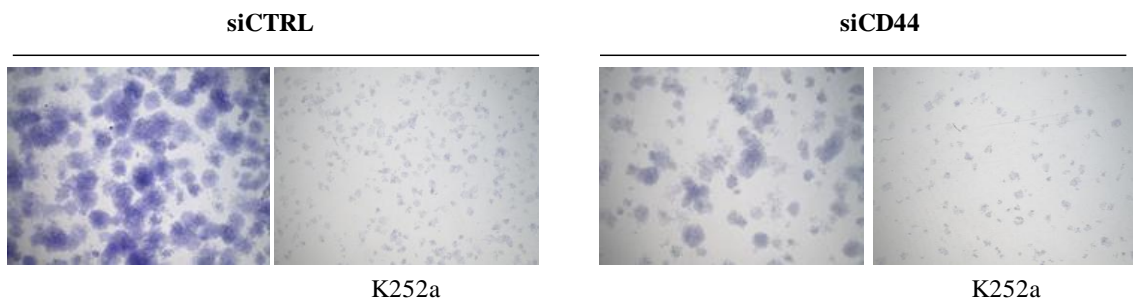
## D



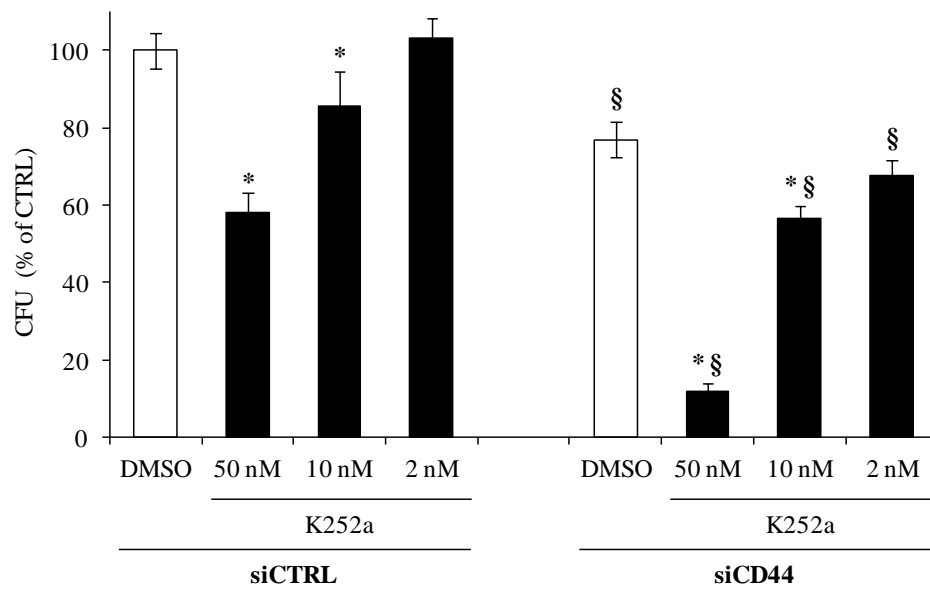
Aubert *et al.*, Figure 3

# RESULTATS

**A**



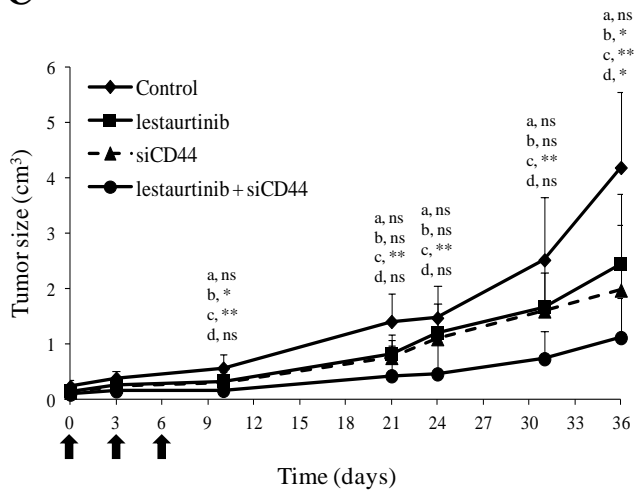
**B**



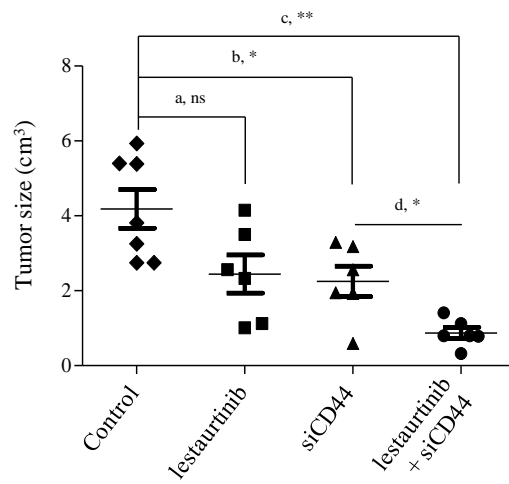
Aubert *et al.*, Figure 4

# RESULTATS

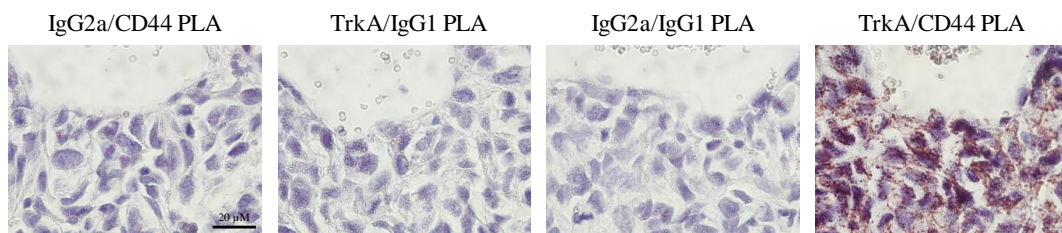
**C**



**D**

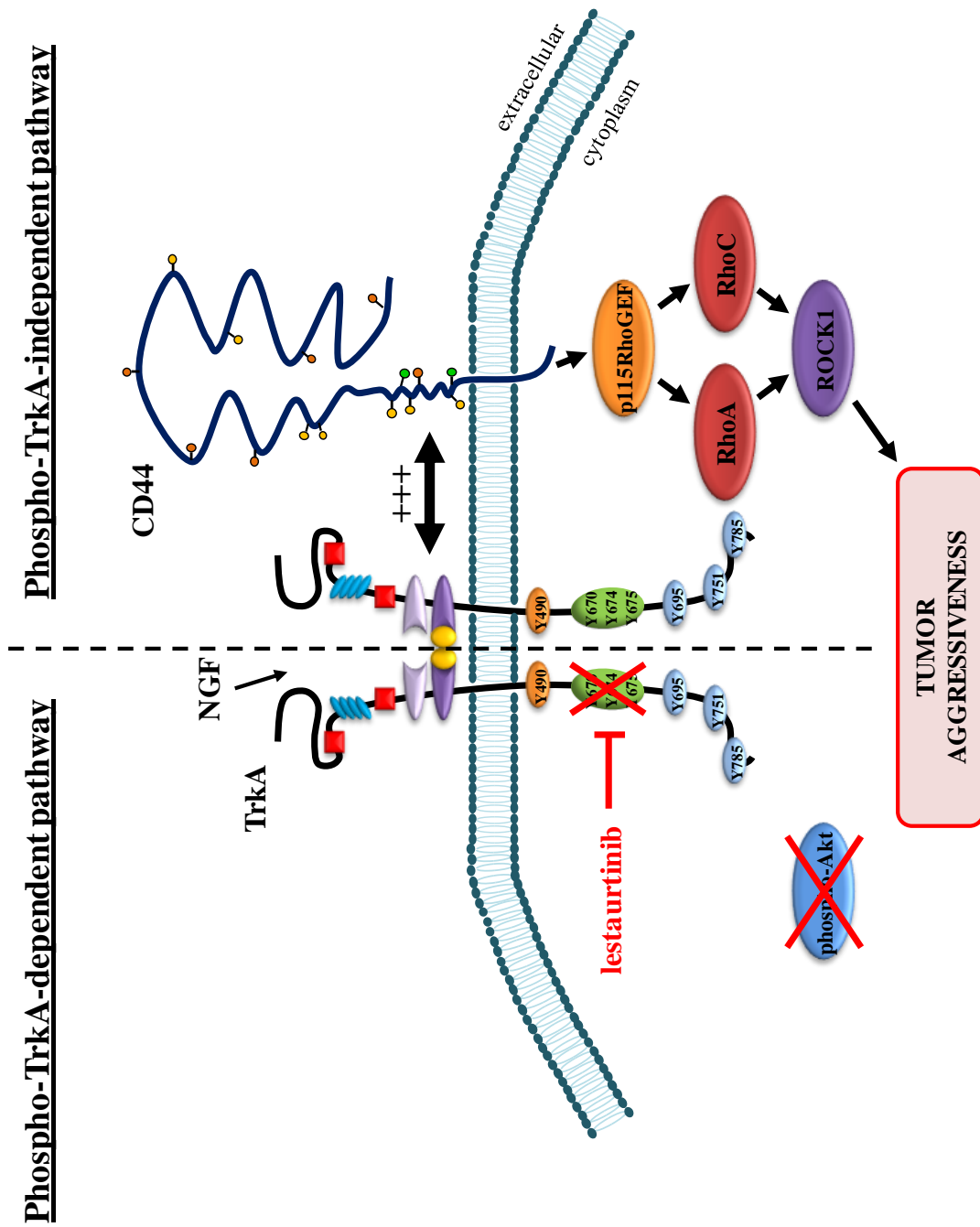


**E**



Aubert *et al.*, Figure 4

# RESULTATS



Aubert *et al.*, Figure 5

Aubert *et al.*, Figure 5

## RESULTATS

### Supplementary Methods for

#### NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib

Léo Aubert<sup>1,2,3†</sup>, Matthieu Guilbert<sup>1,2,3†</sup>, Cyril Corbet<sup>1,2,3</sup>, Elisabeth Génot<sup>4</sup>, Eric Adriaenssens<sup>2,5</sup>, Thierry Chassat<sup>6</sup>, François Bertucci<sup>7</sup>, Thomas Daubon<sup>4</sup>, Nicolas Magné<sup>8,9</sup>, Xuefen Le Bourhis<sup>1,2,3‡</sup>, and Robert-Alain Toillon<sup>1,2,3‡\*</sup>

#### Origin of other cancer cell lines

CAL 27, CAL 33, SQ20B and FaDu human head and neck cancer cells were obtained from Dr S Meignan (Centre Oscar Lambret, Lille). DU 145 and PC-3 prostate cancer cells, MCF-7 and SkBr3 breast cancer cells and HT-29 colon cancer cells were acquired from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and were maintained in Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM; MCF-7), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; CAL 27, CAL 33, SQ20B and HT-29 cells), RPMI 1640 medium (DU 145, PC-3 and FaDu cells) or Mc Coy's 5A (SkBr3 cells) (Invitrogen Corporation, France) supplemented with 10% inactivated FBS (Fetal Bovine Serum) (Hyclone, France), 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 40 UI/ml penicillin, 40 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycin and ZellShield™ (1X, Biovalley, France) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>-humidified atmosphere. All experiments were carried out with cells of passage number less than 20.

#### Table identifiers and GO (Gene Ontology) annotation

The different categories of biological processes were manually associated to each protein. The terms “metabolism”, “transport”, “cell cycle”, “apoptosis”, “migration/invasion”, “RNA processing”, “protein processing” and “Others” were queried for the biological processes associated to each protein. Only proteins with Mascot score  $\geq 40$  and number of peptides  $> 1$  were presented in the pie charts (Figure S1). All common proteins shared by both conditions (with or without NGF for a 30 min incubation period) in each purification technique were withdrawn of Table 1 and Figure S1.

## RESULTATS

### Supplementary Figure Legends for

#### NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib

Léo Aubert<sup>1,2,3†</sup>, Matthieu Guilbert<sup>1,2,3†</sup>, Cyril Corbet<sup>1,2,3</sup>, Elisabeth Génot<sup>4</sup>, Eric Adriaenssens<sup>2,5</sup>, Thierry Chassat<sup>6</sup>, François Bertucci<sup>7</sup>, Thomas Daubon<sup>4</sup>, Nicolas Magne<sup>8,9</sup>, Xuefen Le Bourhis<sup>1,2,3‡</sup>, and Robert-Alain Toillon<sup>1,2,3‡\*</sup>

**Figure S1.** Proteomic analysis of NGF/TrkA signaling. (A) Location of excised bands on SDS-PAGE gel. HA-TrkA MDA-MB-231 cells were biotinylated and treated or not with NGF for 30 min. HA-TrkA immunoprecipitation or streptavidin pull-down was then performed on cell lysates (15 mg per condition) and the eluted proteins were separated by SDS-PAGE. Differential band cutting (indicated by black boxes) was performed after Colloidal Coomassie Blue staining and the excised bands were trypsin-digested and analyzed by mass spectrometry as described in Materials and Methods. (B) Distributions of Gene Ontology annotations. Proteins identified by mass spectrometry were classified according to biological process wherein they are involved.

**Figure S2.** Involvement of TrkA/CD44 association in other cancers. (A) Expression of TrkA and CD44 receptors in several cancer cell lines. Whole cell lysates from cancer cells were immunoblotted using CD44 and TrkA antibodies. Equal loading was checked with  $\beta$ -actin antibody. (B) NGF induced direct interaction between TrkA and CD44 in PC-3 prostate cancer cells. Cells were treated with NGF (5 and 30 min) and prepared for PLA experiment as described in Materials and Methods. Interactions between TrkA and CD44 were detected as red spots.

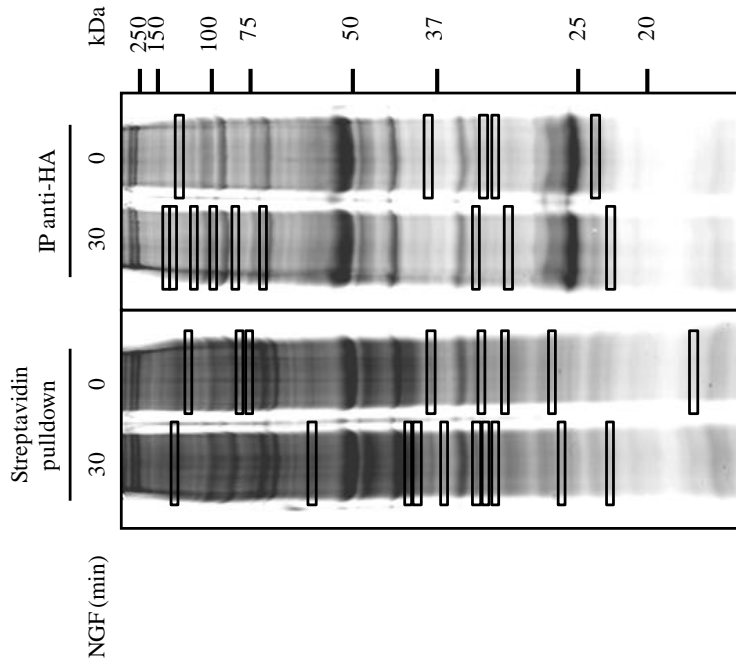
**Figure S3.** Inhibition of CD44 expression does not affect NGF-induced TrkA activity and canonical TrkA pathways. MDA-MB-231 cells overexpressing HA-TrkA were transfected with siRNA directed against CD44 (siCD44), or control siRNA (siCTRL). Cells were then stimulated with NGF (5 or 30 min). Phosphorylations of TrkA, Akt and Src were assessed by using phospho-specific antibodies. Equal loading was verified with HA, Akt and Src antibodies.

## RESULTATS

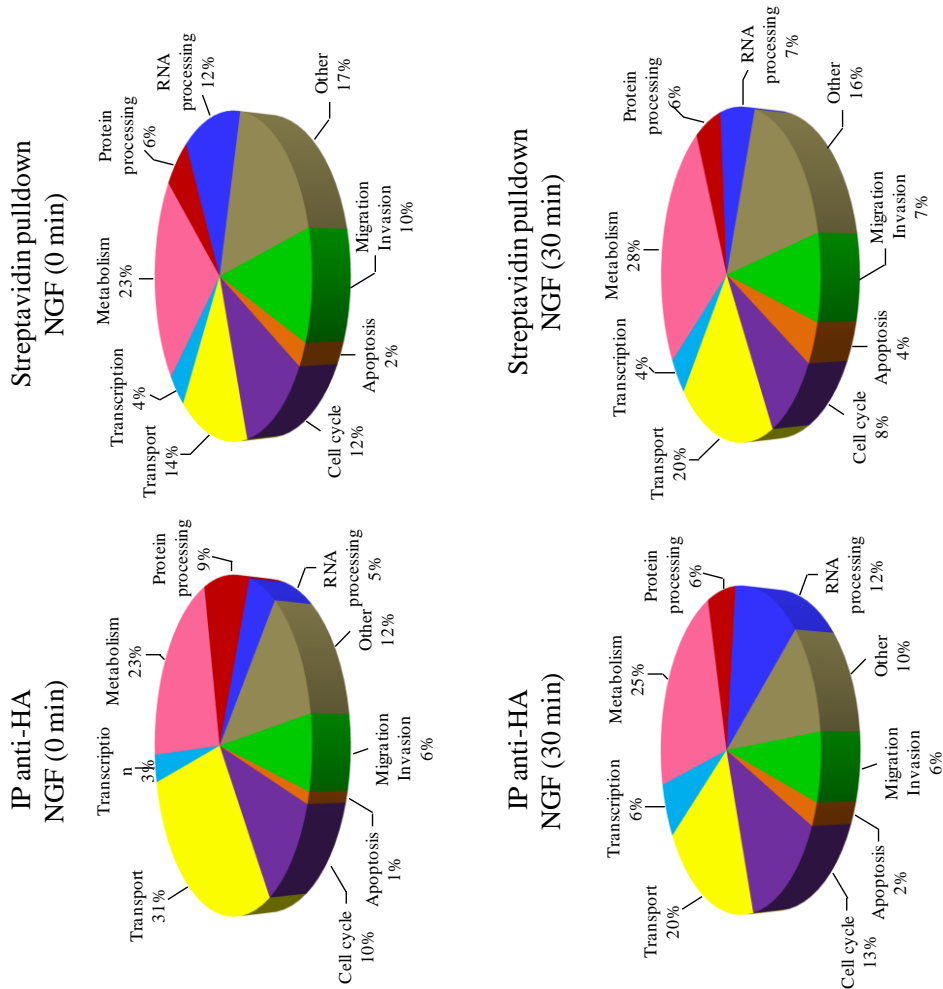
**Figure S4.** Inhibition of TrkA phosphorylation. HA-TrkA MDA-MB-231 cells incubated with DMSO or with K252a, and HA-TrkA kinase-dead MDA-MB-231 cells were treated with NGF (5 or 30 min). TrkA phosphorylation was assessed by immunoblotting with phospho-specific antibody. Equal loading was verified with HA antibody.

# RESULTATS

**A**



**B**



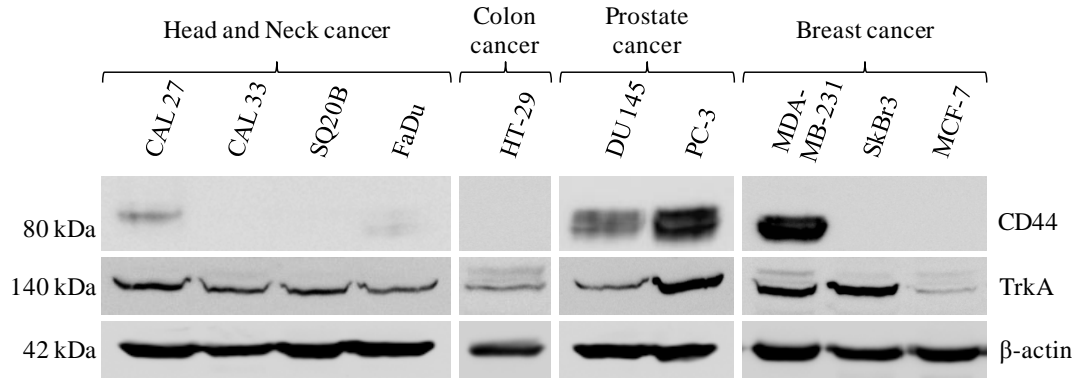
Aubert *et al.*, Figure S1

Aubert *et al.*, Supplementary Figure 1

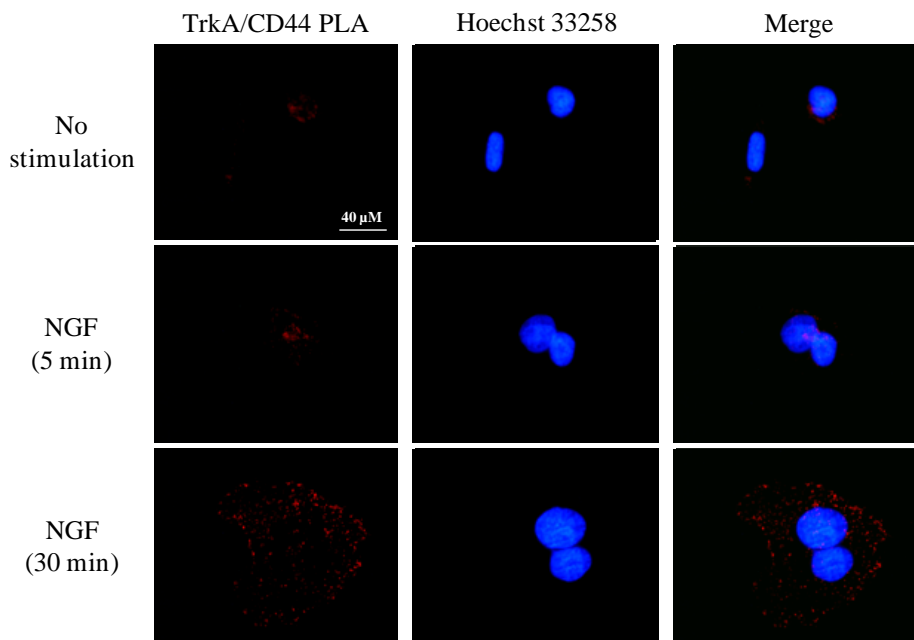


# RESULTATS

**A**

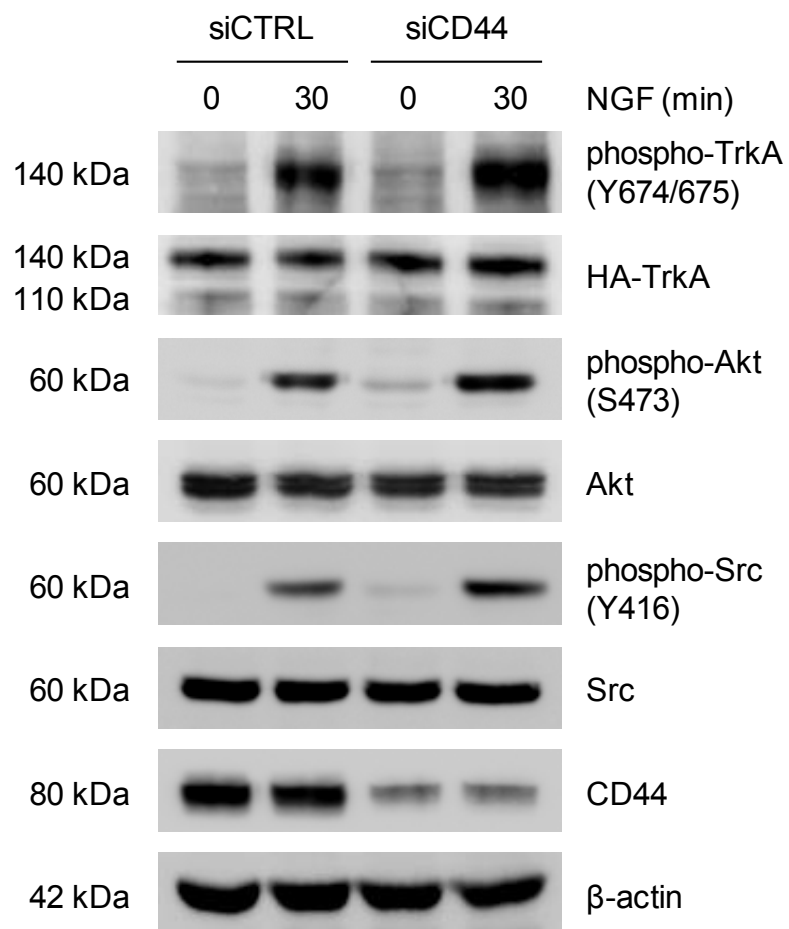


**B**



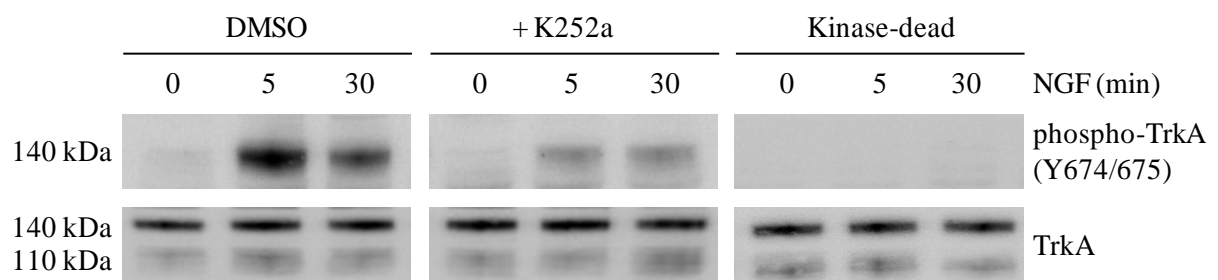
Aubert *et al.*, Figure S2

## RESULTATS



Aubert *et al.*, Figure S3

# RESULTATS



Aubert *et al.*, Figure S4

---

# **DISCUSSION & PERSPECTIVES**

---

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence l'implication des récepteurs CD44 et EphA2 dans la signalisation du NGF et de son précurseur dans les cellules cancéreuses de sein. Nous avons ainsi montré que les complexes de récepteurs TrkA/EphA2 et TrkA/CD44 contribuent non seulement à l'augmentation des capacités invasives des cellules cancéreuses de sein mais favorisent également la croissance tumorale *in vivo*. Nous avons également décrit que les signalisations sous-jacentes à ces complexes sont tout à fait originales, et diversifient les réponses induites par le (pro)NGF dans les cellules cancéreuses. De plus, ces complexes de récepteurs et les signalisations qu'ils engendrent pourraient être à l'origine de l'échappement des tumeurs à l'effet d'inhibiteurs de tyrosine kinase comme le CEP-701.

Ainsi, nous discuterons, dans un premier temps, de la signalisation originale induite par le proNGF dans les cellules cancéreuses mammaires. Dans un deuxième temps, nous nous attacherons à la coopération NGF/TrkA/CD44. Enfin, nous traiterons de l'impact des résultats obtenus sur les stratégies thérapeutiques ciblant le récepteur TrkA dans les cancers.

### I. SIGNALISATION DU PRONGF DANS LES CELLULES CANCEREUSES DE SEIN

#### A) Formation du complexe sortiline/TrkA/EphA2

Notre laboratoire a récemment décrit que le proNGF augmente les capacités invasives des cellules cancéreuses de sein (Demont *et al.*, 2012). Cet effet biologique nécessite la fixation du proNGF sur la sortiline, entraînant l'activation de TrkA et des voies de signalisation : PI3K/Akt et Src. De façon intéressante, notre étude indique que la voie de Src est indépendante de la phosphorylation de TrkA induite par le proNGF, ce qui suggère l'intervention d'un ou plusieurs corécepteurs, en plus de la sortiline. Ainsi, nos analyses protéomiques de l'interactome de TrkA ont non seulement permis de valider l'association TrkA/sortiline, mais aussi d'identifier un autre récepteur à activité tyrosine kinase, EphA2. Le récepteur EphA2 est impliqué dans la carcinogenèse et la progression tumorale de nombreux cancers, y compris les carcinomes mammaires (Brantley-Sieders, 2012 ; Kaenel *et al.*, 2012). En effet, EphA2 est connu pour être surexprimé dans les cancers du sein invasifs et une surexpression ectopique d'EphA2 conduit à la transformation des cellules épithéliales de sein MCF-10A et leur confère un potentiel métastatique (Zantek *et al.*, 1999 ; Zelinski *et al.*, 2001 ; Brantley-Sieders *et al.*, 2011). Des travaux plus récents ont aussi démontré que la

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

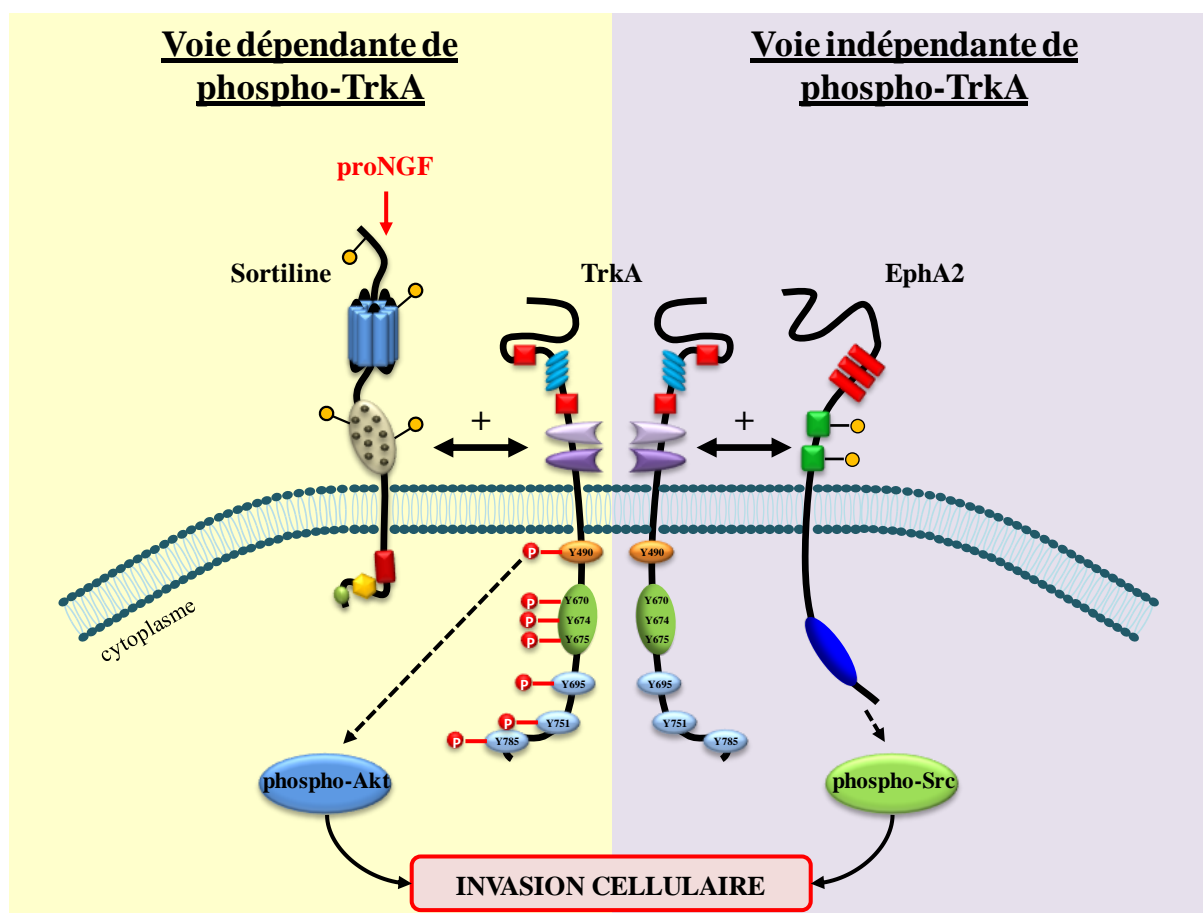
surexpression d'EphA2 joue un rôle majeur dans l'invasion des cellules cancéreuses de sein (Sugiyama *et al.*, 2013a). Nos résultats obtenus sur la lignée MDA-MB-231 qui est connue pour exprimer fortement EphA2 et présenter un caractère invasif (Macrae *et al.*, 2005), montrent que le récepteur EphA2 intervient également dans l'effet pro-invasif du proNGF (Article 1).

Dans les cellules cancéreuses mammaires, la surexpression d'EphA2 est inversement corrélée à l'expression de son ligand, l'éphrine-A1 (Macrae *et al.*, 2005). Ainsi, l'activation d'EphA2 et de sa signalisation est majoritairement indépendante du ligand et requiert généralement la coopération du récepteur avec d'autres RTK tels que EGFR ou HER2 (Brantley-Sieders *et al.*, 2008 ; Hiramoto-Yamaki *et al.*, 2010). Par des expériences de co-immunoprécipitation et de Duolink<sup>®</sup>, nous avons mis en évidence la formation d'un complexe membranaire sortiline/TrkA/EphA2, induit spécifiquement par le proNGF. De façon intéressante, nos données indiquent que TrkA est nécessaire à la formation de ce complexe de récepteurs, indépendamment de son état de phosphorylation. Par une analyse d'inactivation séquentielle, nous avons également démontré que le recrutement d'EphA2 à TrkA nécessite, comme pré-requis, la fixation du proNGF sur la sortiline puis la formation du complexe sortiline/TrkA. Enfin, nos résultats suggèrent que le récepteur TrkA se place au centre de ce complexe ternaire puisqu'un signal de duolink<sup>®</sup> est observé pour les interactions TrkA/sortiline et TrkA/EphA2 mais pas pour l'association sortiline/EphA2. L'utilisation de la technique de FRET pourrait confirmer les interactions directes entre récepteurs. Néanmoins, nous n'avons pas opté pour cette technique car celle-ci ne permet pas de préserver la stoechiométrie des complexes de récepteurs. Or, l'association entre les récepteurs est très dépendante de leur expression relative (Clewes *et al.*, 2008 ; Masoudi *et al.*, 2009). De plus, la technique de FRET ne peut pas être utilisée dans les études cliniques pour mesurer l'interaction des récepteurs dans des tumeurs de patients (Article 1).

Par conséquent, l'ensemble de nos résultats montre que le proNGF induit l'invasion des cellules cancéreuses mammaires en formant un complexe sortiline/TrkA/EphA2. En outre, nos données suggèrent l'existence d'une voie de signalisation dépendante de la phosphorylation de TrkA, mais également d'une voie indépendante de phospho-TrkA, passant par le recrutement du récepteur EphA2 au complexe sortiline/TrkA.

**B) Voie de signalisation dépendante de la phosphorylation de TrkA**

Notre laboratoire a montré que le proNGF conduit à l'activation de deux voies de signalisation PI3K/Akt et Src qui interviennent distinctement l'une de l'autre dans l'invasion des cellules cancéreuses de sein. Ici, nous précisons que les récepteurs TrkA et EphA2 sont impliqués différemment dans l'activation des protéines Akt et Src, induite par le proNGF. En effet, l'activation de la voie PI3K/Akt est dépendante de la phosphorylation de TrkA, alors que la phosphorylation de Src est sous-jacente à EphA2 (Article 1) (Figure 22).



**Figure 22 : Signalisation pro-invasive du proNGF**

*Le proNGF induit la formation d'un complexe ternaire sortiline/TrkA/EphA2 entraînant l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt et Src, nécessaires, de façon concomitante, à l'invasion cellulaire. L'expression de TrkA est requise pour les deux voies mais seule la voie PI3K/Akt dépend de l'état de phosphorylation du récepteur. La voie Src est dépendante de l'expression du récepteur EphA2.*

Ces résultats sont différents de ceux obtenus dans des cellules de cancer de la prostate et de gliomes, où la protéine Akt induit la transactivation du récepteur EphA2 sur le résidu S<sup>897</sup> de son domaine intracellulaire (Miao *et al.*, 2009 ; Miao *et al.*, 2014). En effet, dans notre

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

modèle cellulaire, l'inhibition de la phosphorylation d'Akt par l'utilisation de LY294002 n'affecte pas l'activation de Src, sous-jacente à EphA2, et induite par le proNGF. Il est donc peu probable que la voie PI3K/Akt transactive EphA2 pour phosphoryler Src (Article 1).

La voie PI3K/Akt est largement décrite pour jouer un rôle dans la progression tumorale mammaire, en particulier dans les processus de migration/invasion et métastatiques (Dillon & Muller, 2010 ; Cheung & Testa, 2013). L'activation de cette voie de signalisation par TrkA a principalement été élucidée dans les cellules neuronales stimulées par le NGF (Figure 19). Ainsi, il a été reporté que l'activation de la PI3K requiert le recrutement des protéines Shc, Grb2 et Gab1 sur le résidu Y<sup>490</sup> phosphorylé du récepteur TrkA (Holgado-Madruga *et al.*, 1997 ; Korhonen *et al.*, 1999). Dans notre modèle cellulaire, nous pouvons supposer que l'activation de la voie PI3K/Akt par le proNGF est dépendante de la phosphorylation de Y<sup>490</sup> de TrkA puisque cette dernière est impliquée dans l'effet pro-invasif du proNGF dans les MDA-MB-231 (Demont *et al.*, 2012). Par ailleurs, la PI3K est également capable d'induire les processus de migration/invasion cellulaire sans faire intervenir Akt. Par exemple, elle peut moduler l'activité des RhoGTPases Rac et Cdc42 qui sont impliquées dans la formation des protusions membranaires (Cain & Ridley, 2009). Dans notre étude, l'implication de la protéine Akt dans la signalisation de l'axe proNGF/TrkA est démontrée par un traitement avec un inhibiteur de la PI3K, le LY294002. Dans ce sens, notre laboratoire a rapporté que l'inhibition spécifique d'Akt bloque l'effet pro-invasif associé à la surexpression de TrkA (Lagadec *et al.*, 2009). De plus, la phosphorylation d'Akt2 par la PI3K semble intervenir dans l'induction de l'invasion et des métastases dans les cellules cancéreuses de sein, alors que celle d'Akt1 préviendrait ces mêmes effets biologiques (Arboleda *et al.*, 2003 ; Dillon & Muller, 2010). Or, Akt2 est exprimé de manière prédominante dans notre modèle cellulaire, amenant ainsi à penser que la voie PI3K/Akt est effectivement impliquée dans l'effet du proNGF.

### **C) Voie de signalisation indépendante de la phosphorylation de TrkA**

Outre l'activation de la voie PI3K/Akt, la formation du complexe sortiline/TrkA/EphA2 dans les cellules cancéreuses mammaires conduit à l'activation de la voie Src. Cette voie de signalisation est indépendante de la phosphorylation de TrkA mais requiert l'expression d'EphA2 (Article 1) (Figure 22).



## DISCUSSION & PERSPECTIVES

L'implication d'EphA2 et de Src dans l'invasion des cellules cancéreuses est décrite dans la littérature. Toutefois, les mécanismes d'action par lesquels ces protéines interagissent pour induire ces effets semblent très dépendants du type cellulaire. En effet, alors que certains travaux présentent le récepteur EphA2 comme une cible de l'activité kinase de Src, d'autres montrent une stimulation de la phosphorylation de Src par EphA2. Par exemple, Sugiyama et ses collaborateurs (Sugiyama *et al.*, 2013b) ont récemment démontré que l'axe EphA2/Src est engagé dans l'invasion des cellules cancéreuses de sein en favorisant l'expression de la MT1-MMP (*Membrane type-1 matrix metalloproteinase*) à la surface cellulaire. Cette métalloprotéase entraîne alors le clivage d'EphA2 et son internalisation *via* la signalisation de Src pour activer RhoA et induire l'invasion cellulaire. L'analyse protéomique de l'interactome de TrkA n'a pas permis d'identifier les protéines MT1-MMP et RhoA, suggérant que ces partenaires de la signalisation d'EphA2 n'interviennent pas dans la signalisation du proNGF. En revanche, nous avons pu identifier, en spectrométrie de masse, différentes protéines impliquées directement ou indirectement avec la signalisation d'EphA2 et/ou de Src. Par exemple, SHEP-1 (*SH2 domain-containing Eph receptor-binding protein 1*) est recruté et phosphorylé par EphA2 (Dail *et al.*, 2004) et peut favoriser la phosphorylation de p130 Cas/BCAR1 (*p130 Crk-associated substrate / Breast cancer anti-estrogen resistance 1*) par Src (Roselli *et al.*, 2010). La phosphorylation de p130 Cas par Src joue un rôle essentiel dans la migration/invasion des cellules cancéreuses de sein, ainsi que dans leur survie (Brabek *et al.*, 2005 ; Cunningham-Edmondson & Hanks, 2009 ; Sanchez-Bailon *et al.*, 2012). De plus, la phosphatase PTP-PEST (ou PTPN12, *Tyrosine protein phosphatase non-receptor type 12*), autre protéine identifiée en spectrométrie de masse, peut aussi interagir et réguler l'activité de p130 Cas (Garton *et al.*, 1996). Dans les ostéoclastes, cette phosphatase peut aussi activer Src (sur le résidu Y<sup>416</sup>) *via* la déphosphorylation du résidu Y<sup>527</sup>, conduisant alors à une stimulation de la phosphorylation de la cortactine (Chellaiah & Schaller, 2009). De façon intéressante, l'activation constitutive d'EphA2 observée dans les cancers du poumon non à petites cellules est corrélée à une augmentation de la phosphorylation de Src, p130 Cas et cortactine et à une induction de l'invasion cellulaire (Faoro *et al.*, 2010). En outre, l'activation de la cortactine est impliquée dans la formation de structures membranaires particulières, les invadopodes, qui assurent la dégradation de la matrice extracellulaire et qui sont corrélées à l'invasion des cellules cancéreuses et aux métastases (Weaver, 2006 ; Kirkbride *et al.*, 2011 ; Yamaguchi, 2012). Or, une augmentation de la phosphorylation de la cortactine est observée sous l'effet du proNGF, suggérant la mise en place d'une invasion dépendante des invadopodes (Données non montrées). Dans ce sens, d'autres protéines de

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

l'interactome de TrkA spécifique au proNGF et potentiellement associées à la signalisation de Src, telles que p130 Cas, le complexe d'intégrines  $\alpha 3 \beta 1$ , un substrat de la PKC (MARCKS, *Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) et SNAP-23 (*Synaptosomal-associated protein 23*) sont décrites pour intervenir dans l'initiation et/ou l'assemblage des invadopodes (Mueller *et al.*, 1999 ; Murphy & Courtneidge, 2011 ; Beaty *et al.*, 2013 ; Williams & Copolino, 2014) (Article 1).

## II. SIGNALISATION DU NGF DANS LES CELLULES CANCEREUSES DE SEIN

Compte tenu des données rassemblées sur la signalisation de l'axe proNGF/TrkA, nous avons également recherché l'existence de corécepteurs de TrkA dans la signalisation du NGF. En comparaison à son précurseur, le NGF ne permet pas l'association physique TrkA/EphA2. En revanche, le NGF induit la formation du complexe sortiline/TrkA, mais ce dernier n'est pas impliqué dans l'effet pro-invasif du NGF et est plus tardif dans la cinétique de traitement, laissant ainsi penser qu'il interviendrait plutôt dans le trafic intracellulaire de TrkA. De façon intéressante, le NGF permet également les phosphorylations d'Akt et de Src. Néanmoins, contrairement à la signalisation induite par le proNGF, l'activation de Src est dépendante de la phosphorylation de TrkA. En outre, sous l'effet du NGF, les protéines Src, p130 Cas, cortactine ou encore SHEP-1 ne sont pas retrouvées dans l'interactome de TrkA. De même, la phosphorylation de la cortactine n'est pas observée avec un traitement au NGF (Données non montrées). Par conséquent, il est possible que la protéine Src ne reconnaisse pas les mêmes substrats en fonction de son activation par TrkA ou par EphA2. Dans le cas du NGF, Src pourrait activer la protéine STAT3, connue pour être un effecteur de TrkA et qui peut conduire également à l'invasion cellulaire (Ng *et al.*, 2006 ; Mukhopadhyay *et al.*, 2010) (Article 1).

L'ensemble de ces données suggère donc une signalisation différente de celle induite par le proNGF. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai affiné l'étude de la signalisation de l'axe NGF/TrkA en analysant non seulement l'interactome du récepteur par immunoprécipitation mais aussi le protéome membranaire induit par le ligand *via* le système de purification par biotine/streptavidine. De façon intéressante, la glycoprotéine CD44 a été identifiée par les deux méthodes de purification (Article 2).

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

### A) Recrutement spécifique de CD44 sous l'effet du NGF

L'implication de CD44 dans la progression du cancer a fait l'objet de nombreuses investigations. Toutefois, son rôle reste mal défini, notamment dans les tumeurs de sein. La nature controversée de CD44 provient de son intervention dans la promotion et l'inhibition de des cancers en modulant la croissance, l'apoptose, l'angiogenèse, la motilité et l'invasion cellulaire (Herrlich *et al.*, 2000 ; Louderbough & Schroeder, 2011). CD44 favorise ou empêche ces fonctions biologiques en utilisant un large panel de mécanismes d'action. En particulier, CD44 peut se lier à des récepteurs de surface cellulaire, indépendamment de son ligand principal (acide hyaluronique), afin d'initier le recrutement et l'activation de cascades de signalisation aberrantes (Zoller, 2011).

Dans cette étude, par des expériences d'immunoprécipitation et de duolink<sup>®</sup>, nous avons démontré le recrutement de CD44 à TrkA au niveau de la membrane des cellules MDA-MB-231, sous l'effet du NGF. Contrairement au complexe sortiline/TrkA/EphA2 induit par le proNGF, l'interaction physique TrkA/CD44 pré-existe en l'absence de ligand exogène, ce qui suggère que l'association basale TrkA/CD44 résulterait d'une boucle autocrine de NGF ou d'acide hyaluronique. De façon intéressante, le complexe membranaire TrkA/CD44 disparaît suite à un traitement au proNGF (Données non montrées). Ainsi, le proNGF affecterait le complexe TrkA/CD44 soit en induisant son internalisation, soit en favorisant l'interaction de TrkA avec d'autres corécepteurs, tels que EphA2, au détriment de CD44. Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, il serait intéressant de vérifier que l'interaction basale TrkA/CD44 est conservée en présence d'un petit ARN interférent (siRNA) ciblant le NGF. De même, nous pourrions rechercher la présence d'interaction basale TrkA/EphA2 en présence d'un siCD44 pour déterminer si l'interaction basale TrkA/CD44 empêche l'association de TrkA avec EphA2.

Les analyses de Duolink<sup>®</sup> et de cytométrie en flux ont également révélé que l'interaction membranaire TrkA/CD44 observée à 5 minutes de traitement au NGF est très probablement suivie d'une internalisation du complexe à 30 minutes. De façon surprenante, l'utilisation de K252a ou d'une population stable de MDA-MB-231 surexprimant le récepteur TrkA muté sur les trois résidus tyrosines nécessaires à l'activité kinase du récepteur (« kinase-dead » YYY670/674/675FFF) n'affecte pas la formation du complexe membranaire TrkA/CD44 induite par le NGF. De plus, dans ces conditions où la phosphorylation de TrkA est abolie, l'interaction TrkA/CD44 ne revient pas à son niveau basal et perdure au-delà de 30 minutes de traitement au NGF (Article 2). En outre, nous avons observé que la phosphorylation de la

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

tyrosine Y<sup>490</sup> du récepteur TrkA n'est pas impliquée dans l'association TrkA/CD44 (Données non montrées). Afin d'approfondir l'étude, il serait donc intéressant de rechercher les motifs d'interaction entre les récepteurs.

L'implication de CD44 dans les processus de migration/invasion des cellules cancéreuses de sein a déjà été démontrée suite à une stimulation par l'acide hyaluronique (Bourguignon *et al.*, 2003). Nos résultats soutiennent que CD44 contribue également à augmenter les capacités invasives des MDA-MB-231 induites par le NGF.

Par conséquent, l'ensemble de ces résultats indique que le NGF permet la formation d'un complexe TrkA/CD44 indépendamment de la phosphorylation de TrkA. Le recrutement de CD44 à TrkA est essentiel à l'induction de l'effet pro-invasif du NGF (Article 2).

### **B) Voie de signalisation sous-jacente à CD44**

Après avoir validé l'implication de CD44 dans la signalisation pro-invasive du NGF, nous avons mis en évidence, par l'utilisation d'un siRNA, que son inhibition n'interfère pas avec les phosphorylations d'Akt et de Src, induites par l'axe NGF/TrkA. Ces résultats diffèrent des données recueillies dans la littérature pour la signalisation de CD44 induite par l'acide hyaluronique dans les MDA-MB-231 (Bourguignon, 2008 ; Bourguignon *et al.*, 2010). En revanche, dans le cadre de la signalisation induite par l'axe NGF/TrkA, ils soutiennent l'existence d'une voie de signalisation sous-jacente à CD44, indépendante de la phosphorylation de TrkA et parallèle aux voies PI3K/Akt et Src. Dans ce sens, l'analyse protéomique de l'interactome de TrkA et du protéome membranaire induits spécifiquement par le NGF a permis d'identifier plusieurs protéines jouant un rôle clé dans la signalisation pro-invasive de CD44. En particulier, les expériences d'immunoprécipitation, les tests d'activité des RhoGTPases et les tests d'invasion en chambre de Boyden ont permis de dégager un axe de signalisation pro-invasif, induit par le NGF, et faisant intervenir les protéines p115RhoGEF, RhoA, RhoC et ROCK1 (Figure 23). En accord avec ces résultats, p115RhoGEF est décrite comme étant une protéine RhoGEF activatrice de RhoA et de RhoC et ROCK1 comme l'un des principaux effecteurs à ces deux RhoGTPases (Karnoub *et al.*, 2004 ; Guilluy *et al.*, 2011). L'activation aberrante des RhoGTPases RhoA et RhoC est reportée dans de nombreux cancers, y compris le cancer du sein, et celle-ci est notamment corrélée aux processus de migration/invasion et aux métastases (Tang *et al.*, 2008 ; Karlsson *et al.*, 2009 ; Bravo-Cordero *et al.*, 2014). De plus, Bourguignon et ses collaborateurs ont mis

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

en évidence un axe de signalisation similaire qui est engagé suite à l'activation de CD44 par l'acide hyaluronique pour induire l'invasion des MDA-MB-231 (Bourguignon *et al.*, 2003).

Ainsi, au vu de nos résultats, l'axe NGF/TrkA emprunterait la voie de signalisation p115RhoGEF/RhoA et RhoC/ROCK1, qui serait sous-jacente à CD44, afin d'augmenter les capacités invasives des cellules cancéreuses mammaires. Pour autant, nos résultats ne permettent pas de confirmer la dépendance de cette voie de signalisation vis-à-vis de CD44. Des expériences supplémentaires auraient ainsi pu être ajoutées pour étudier notamment l'activité des RhoGTPases sous l'effet du NGF, en présence d'un siRNA ciblant CD44. Par ailleurs, plusieurs hypothèses peuvent être avancées concernant le recrutement de p115RhoGEF au complexe NGF/TrkA/CD44. En premier lieu, il a été reporté que les RhoGEF peuvent s'associer directement avec les RTK selon plusieurs mécanismes d'action (Schiller, 2006). Dans le cadre du récepteur TrkA, les RhoGEF interagiraient *via* leur domaine PH (*Pleckstrin homology domain*) (Robinson *et al.*, 2005). De façon surprenante, ce domaine PH, qui est également présent dans p115RhoGEF (Wells *et al.*, 2001), pourrait non seulement permettre la liaison de la protéine à la membrane plasmique mais également au niveau de la région juxtamembranaire de TrkA. Ainsi, la mutation du résidu juxtamembranaire Y490F altère la liaison de p115RhoGEF à TrkA. En effet, des expériences d'immunoprécipitation anti-TrkA ont montré que l'association entre TrkA et p115RhoGEF est préservée dans des MDA-MB-231 surexprimant TrkA « kinase-dead », mais pas dans des cellules surexprimant la forme mutée de TrkA sur la tyrosine Y<sup>490</sup> (Données non montrées). Ces données semblent donc indiquer que p115RhoGEF se fixe sur TrkA *via* la reconnaissance d'un motif et non pas la phosphorylation du résidu Y<sup>490</sup>. Dans ce sens, une autre hypothèse pour le recrutement de p115RhoGEF au complexe TrkA/CD44 pourrait être liée à la transactivation de TrkA par un RCPG (Lee *et al.*, 2002a ; Chao, 2003). En effet, les RCPG peuvent contribuer à l'activation de TrkA et celle-ci pourrait tout à fait survenir sans la phosphorylation du résidu Y<sup>490</sup>. Or, parmi les protéines identifiées en spectrométrie de masse *via* la méthode de purification par biotine/streptavidine, nous retrouvons également une petite sous-unité de la protéine G<sub>α13</sub> (*Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13*), qui est connue non seulement pour participer à la signalisation des RCPG mais également pour activer p115RhoGEF (Hart *et al.*, 1998 ; Kozasa *et al.*, 1998 ; Kozasa *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2012). L'ensemble de ces données peut donc également suggérer qu'un RCPG interagirait fonctionnellement avec le complexe TrkA/CD44 induit par le NGF. Enfin, il est possible que le recrutement de l'axe de signalisation p115RhoGEF/RhoA et RhoC/ROCK1 soit dépendant des protéines ERM (*Ezrin*,

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

*Radixin, Moesin*) (McClatchey, 2014). En effet, ces protéines qui sont connues pour interagir avec le cytosquelette, interviennent également dans la signalisation de CD44 et des RhoGTPases (Tsukita & Yonemura, 1997). En outre, elles participent à la progression du cancer en induisant de nombreuses réponses cellulaires pro-tumorales, dont les processus de migration/invasion (Donatello *et al.*, 2012 ; Clucas & Valderrama, 2014). En particulier, le complexe CD44/Ezrin et la surexpression des ERM et des protéines Rho sont corrélés avec la présence de métastases, notamment dans le cancer du sein (Martin *et al.*, 2003 ; Halon *et al.*, 2013). Les protéines ERM sont également impliquées dans les dialogues croisés nécessaires à la mise en place des signalisations sous-jacentes aux coopérations RTK/CD44. Par exemple, pour la collaboration entre c-MET et CD44v6, les ERM permettent l'activation de Ras et l'internalisation du RTK, sous l'effet de HGF (Orian-Rousseau *et al.*, 2007 ; Hasenauer *et al.*, 2013). De façon intéressante, l'analyse protéomique de l'interactome de TrkA induit par le NGF a permis d'identifier les protéines Moesin et Ezrin, ce qui nous amène à penser qu'elles peuvent également jouer un rôle essentiel dans la signalisation sous-jacente au complexe TrkA/CD44.

Par ailleurs, au vu des différentes situations proposées pour expliquer le mécanisme par lequel l'axe p115RhoGEF/RhoA et RhoC/ROCK1 est engagé, il est aussi tout à fait possible que p115RhoGEF opère la jonction entre TrkA et CD44 en interagissant (in)directement avec les deux récepteurs.

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

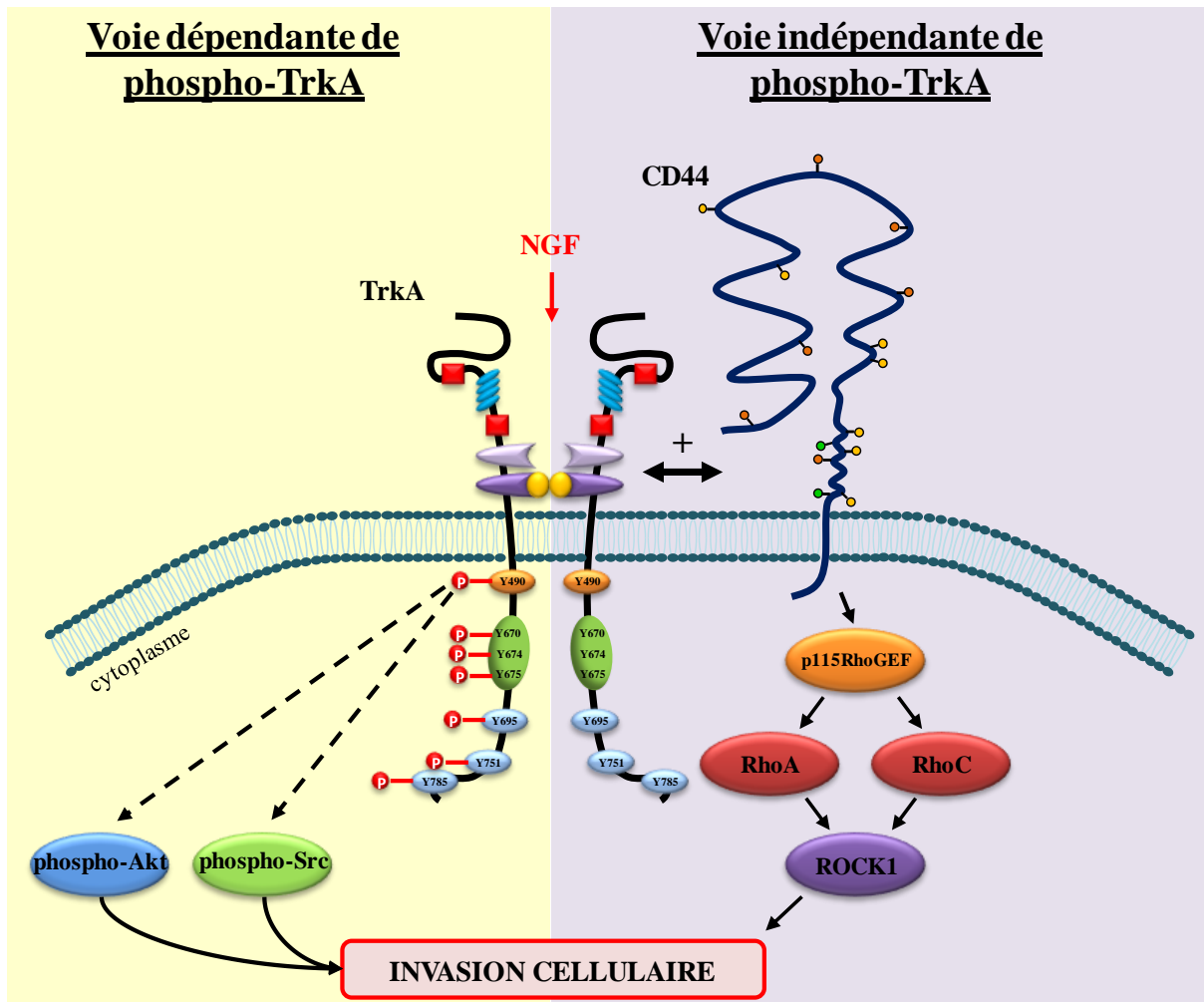


Figure 23 : Signalisation pro-invasive du NGF

Le NGF induit la formation d'un complexe binaire TrkA/CD44 qui conduit à l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt et Src, ainsi qu'à un axe de signalisation p115RhoGEF/RhoA & RhoC/ROCK1. L'activation des protéines Akt et Src est dépendante de la phosphorylation de TrkA, alors que l'axe p115RhoGEF/RhoA & RhoC/ROCK1 est sous-jacent à CD44, recruté à TrkA indépendamment de sa phosphorylation. Une fois activées, ces trois voies de signalisation aboutissent parallèlement à l'invasion des cellules cancéreuses de sein.

### III. Axes (pro)NGF/TrkA, cibles thérapeutiques dans les cancers ?

#### A) Implication des complexes TrkA/EphA2 et TrkA/CD44 dans la progression tumorale *in vivo*

Les travaux précédents du laboratoire ont montré, à partir d'un modèle murin de xénogreffes de cellules de cancer du sein, que l'utilisation d'anticorps ou d'un siRNA ciblant le NGF ou de K252a, conduit à la formation de tumeurs plus petites et moins vascularisées, ainsi qu'à

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

une diminution des métastases (Adriaenssens *et al.*, 2008). Toutefois, l'utilisation de ces différents inhibiteurs ne permet pas de discriminer les effets associés au NGF et au proNGF. Il serait possible d'utiliser des anticorps neutralisants spécifiques du proNGF afin d'évaluer leurs effets sur le développement de xénogreffes de cellules cancéreuses mammaires dans un modèle murin. Cependant, cette analyse ne suffirait pas à déterminer si le NGF contribue également à la progression tumorale *in vivo*.

Nos expériences *in vitro* et *in vivo* soutiennent que le NGF et le proNGF interviennent tous les deux dans le développement du cancer du sein. En effet, nos données *in vitro* mettent en évidence que la formation des complexes TrkA/EphA2 et TrkA/CD44 est respectivement spécifique du proNGF et du NGF. Or, les interactions TrkA/EphA2 et TrkA/CD44 ont été observées dans les coupes de xénogreffes, ce qui confirme que les deux collaborations se mettent en place lors du développement tumoral *in vivo*, et donc que le NGF et son précurseur jouent un rôle majeur dans la tumorigenèse mammaire. De plus, nous avons montré que la co-administration de CEP-701 et d'un siRNA ciblant soit EphA2, soit CD44, réduit significativement le taux de croissance des tumeurs xénogreffées en comparaison à une monothérapie avec le CEP-701 ou l'un des deux siRNA. De façon intéressante, l'analyse des corrélations entre la co-expression des ARNm *NTRK1*, *EPHA2* et *SORT1* et les données histocliniques d'échantillons de cancer du sein a également permis de révéler que la régulation positive des trois gènes combinés est associée à une survie sans métastase plus courte que la régulation positive de *NTRK1* seul (Articles 1 et 2).

En plus d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques, sur lesquelles nous reviendrons dans les paragraphes suivants, l'ensemble de ces résultats indique donc que le NGF et le proNGF jouent un rôle majeur dans la progression tumorale mammaire *in vivo*. En outre, ces données démontrent la nécessité de prendre en compte les coopérations de récepteurs lors des études cliniques plutôt que de se baser uniquement sur l'expression d'un seul marqueur. Ainsi, la formation des complexes de récepteurs TrkA/EphA2 et TrkA/CD44 pourrait être utilisée en tant que marqueur de l'action pro-tumorale du NGF et de son précurseur dans les cancers. Dans ce sens, l'application de la technique du duolink<sup>®</sup> s'avère être une méthode de choix pour mettre en évidence la présence des complexes de récepteurs dans les cellules cancéreuses mais également dans les tumeurs de patients. Ainsi, nos résultats montrent que les coopérations TrkA/CD44 et TrkA/EphA2 interviennent également dans deux lignées de cellules cancéreuses prostatiques (PC-3 et DU 145), suggérant ainsi que le NGF et le proNGF jouent aussi un rôle dans ce cancer. De plus, l'utilisation d'un siRNA dirigé contre EphA2 ou contre CD44 abolit les effets pro-invasifs induits par le proNGF ou le NGF dans les cellules



## DISCUSSION & PERSPECTIVES

cancéreuses prostatiques, ce qui nous amène à penser qu'un même mécanisme d'action que celui observé dans les MDA-MB-231 entre en jeu (Articles 1 et 2). Par ailleurs, en collaboration avec l'équipe du Pr. Dominique Chevalier (CHRU de Lille), nous avons mis en évidence les complexes TrkA/CD44 et TrkA/EphA2 dans des tumeurs provenant d'une cohorte de patients atteints d'un cancer des voies aéro-digestives supérieures (VADS). Les résultats préliminaires obtenus montrent une corrélation de l'interaction TrkA/EphA2 avec la différenciation des cellules cancéreuses de la cavité buccale (Données non montrées). Cette découverte est d'un intérêt majeur pour les cliniciens, en particulier pour le cancer des VADS où il est encore difficile, à ce jour, d'identifier des marqueurs suffisamment pertinents pour établir le grade et le stade de ces types de tumeur.

Au vu des résultats encourageants obtenus dans les cancers du sein, de la prostate et des VADS, il serait très intéressant de rechercher la présence des complexes TrkA/CD44 et TrkA/EphA2 dans un large panel d'échantillons tumoraux (en TMA, *Tissue MicroArray*) provenant de ces différents cancers, afin d'établir une éventuelle corrélation entre la formation de ces complexes et les paramètres clinicopathologiques des tumeurs (type histologique, diagnostic, stade, grade, etc).

### **B) Voies d'échappement aux thérapies ciblant l'activité kinase de TrkA**

Dans la présente étude, le NGF et son précurseur induisent l'invasion et la croissance tumorale *in vivo* des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, en activant notamment la phosphorylation de TrkA. Ces données sont essentielles d'un point de vue clinique dans la mesure où des stratégies thérapeutiques ciblant cette phosphorylation ont été développées. Par exemple, le lestaurtinib (CEP-701) est utilisé en clinique dans le cancer de la prostate afin d'inhiber l'activité pro-tumorale de TrkA. De tels inhibiteurs pourraient donc être envisagés dans le cadre d'un traitement contre les cancers du sein « triple négatifs ».

Néanmoins, la formation des complexes TrkA/EphA2 et TrkA/CD44, induite respectivement par le proNGF et le NGF, indépendamment de l'état de phosphorylation du récepteur TrkA, suggère l'existence de voies d'échappement aux thérapies ciblant l'activité kinase de TrkA, qui impliqueraient l'activation de Src et de l'axe p115RhoGEF/RhoA et RhoC/ROCK1. Ainsi, bien qu'à court terme l'effet pro-invasif observé dans les cellules cancéreuses soit aboli en présence de K252a, les cellules cancéreuses pourraient, à long terme, amplifier les voies de

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

résistance EphA2/Src et CD44/p115RhoGEF/RhoGTPases/ROCK1 indépendantes de la phosphorylation du récepteur, pour rétablir le phénotype tumoral.

Dans ce sens, l'équipe d'Ullrich a récemment démontré que la résistance aux petites molécules inhibitrices ciblant l'activité kinase du récepteur EGFR implique un réseau de signalisation, induit par l'axe HGF/Met, et qui fait notamment intervenir les protéines membranaires intégrine  $\beta 4$ , Ax1 et EphA2 (Gusenbauer *et al.*, 2013). De tels mécanismes de résistance sont similaires à ceux proposés dans notre étude et font référence aux voies de signalisation compensatoires que nous avons en partie décrites en introduction pour les résistances aux thérapies anti-HER2. En outre, les récepteurs EphA2 et CD44 sont connus pour intervenir dans les mécanismes de résistance. Ainsi, le récepteur EphA2 joue un rôle déterminant dans la résistance des cellules cancéreuses mammaires au trastuzumab ou au tamoxifène (Zhuang *et al.*, 2010 ; Gokmen-Polar *et al.*, 2011). De plus, la voie Src est activée à la fois dans les résistances *de novo* et acquises au trastuzumab (Zhang *et al.*, 2011). L'axe EphA2/Src est donc une voie de résistance déjà bien décrite dans le cancer du sein et il est tout à fait possible que celle-ci soit recrutée lors de traitements des cellules cancéreuses avec le K252a ou l'un de ses dérivés cliniques. La glycoprotéine CD44 participe également aux résistances thérapeutiques en formant notamment une véritable plateforme de signalisation avec une autre protéine particulière, CD147 (ou Basigin ou EMMPRIN, *extracellular matrix metalloproteinase inducer*) (Toole & Slomiany, 2008). En effet, cette plateforme de signalisation permet, *via* CD147, le recrutement des transporteurs de la famille ABC (*ATP-binding cassette*) et des transporteurs du lactate MCT (*Monocarboxylate transporters*) qui sont impliqués dans la résistance multi-drogue (Dai *et al.*, 2013). En outre, CD44 peut coopérer avec les récepteurs des facteurs de croissance *via* différents mécanismes pour mettre en place des voies de compensation et ainsi activer les voies anti-apoptotiques menant à la résistance thérapeutique (Zoller, 2011). Par ailleurs, la protéine EMMPRIN constitue aussi une plateforme d'activation pour les métalloprotéases et joue donc un rôle majeur dans l'invasion et les métastases (Weidle *et al.*, 2010). Récemment, l'équipe de Bryan P. Toole a ainsi mis en évidence la formation d'un complexe de signalisation CD147/EGFR/CD44 qui gouverne l'invasion des cellules cancéreuses de sein (Grass *et al.*, 2013). De façon intéressante, la protéine CD147 a été identifiée dans le protéome membranaire induit spécifiquement par le NGF (Article 2). De plus, des résultats complémentaires démontrent une association basale entre TrkA et la forme glycosylée de CD147 qui augmente avec le temps de traitement au NGF (Données non montrées). L'ensemble de ces données soutient donc que le NGF induit la formation d'un complexe ternaire TrkA/CD44/CD147 intervenant

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

dans l'invasion des cellules cancéreuses mammaires. Etant donné que les voies de signalisation responsables de l'invasion et de la résistance sont interconnectées, le complexe TrkA/CD44/CD147 jouerait également un rôle déterminant dans les échecs thérapeutiques (Alexander & Friedl, 2012).

Dans notre étude, les tests de clonogénicité ont permis de mettre en évidence, après une semaine de culture, qu'un co-traitement K252 et siRNA dirigé soit contre EphA2, soit contre CD44, est plus efficace que l'utilisation de K252a seul, pour inhiber la croissance tumorale des cellules cancéreuses de sein. De plus, les expériences *in vivo* réalisées dans un modèle murin (xénogreffes de cellules cancéreuses de sein en souris SCID), appuient les observations effectuées lors des tests de clonogénicité. L'ensemble de nos résultats confirme donc l'hypothèse de voies de d'échappement aux thérapies ciblant l'activité kinase de TrkA et pourrait déboucher sur de nouvelles perspectives thérapeutiques. Ainsi, nous proposons notamment l'utilisation conjointe d'inhibiteurs de TrkA et de EphA2 pour le traitement des cancers (Brevet).

Afin d'accroître la pertinence de notre étude, il serait particulièrement intéressant d'établir des populations de cellules cancéreuses de sein résistantes au CEP-701, en présence ou non de proNGF non clivable ou de NGF. Nous pourrions ainsi évaluer l'état de phosphorylation de Src ou l'activité des RhoGTPases RhoA et RhoC dans les populations résistantes au lestaurtinib et étudier les capacités tumorigènes de ces populations.

### **C) Caractérisation des déterminants moléculaires de l'interaction TrkA/CD44, vers le développement de nouvelles thérapies ?**

La mise en évidence de l'efficacité d'une thérapie combinée ciblant à la fois TrkA et CD44 nous a incité à rechercher les déterminants moléculaires responsables de l'interaction TrkA/CD44, dans le but de concevoir sur le long terme une molécule capable de bloquer la coopération entre les deux récepteurs. En effet, l'utilisation d'un siRNA en clinique, en combinaison avec le CEP-701, n'est pas pertinente et le développement d'un inhibiteur bivalent empêchant la collaboration TrkA/CD44 peut s'avérer tout à fait probant.

Toutefois, la difficulté de l'identification des déterminants moléculaires responsables de l'interaction TrkA/CD44 provient essentiellement de la structure protéique particulière de CD44. En effet, CD44 est une famille de glycoprotéines transmembranaires qui diffèrent dans

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

le domaine extracellulaire et juxtamembranaire à travers l'insertion d'exons variables par épissage alternatif. Les différents membres de la famille CD44 sont tous codés par un gène unique, présent sur le chromosome 11 chez l'Homme. De même, toutes les isoformes contiennent une région constante comprenant un large ectodomaine, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. Ces régions sont codées par les 5 premiers et les 5 derniers exons du gène et constituent la plus petite isoforme de la famille, CD44s (*CD44 standard isoform*), qui est exprimée de manière ubiquitaire. A proximité de la région transmembranaire, une partie variable est codée par les exons 6 à 15 qui peuvent être inclus dans diverses combinaisons, donnant lieu à une très grande hétérogénéité d'isoformes de CD44 (Ponta *et al.*, 1998). Bien que les études soient parfois contradictoires, la majorité des travaux reportés dans la littérature soutient que les isoformes CD44v (*CD44 variant isoform*) jouent un rôle essentiel dans la progression tumorale et le développement de métastases notamment *via* leur interaction avec les RTK. En particulier, CD44v3 et CD44v6 sont les isoformes les plus fréquemment corrélées à un mauvais pronostic dans les cancers (Orian-Rousseau & Ponta, 2008 ; Hertweck *et al.*, 2011). Récemment, l'équipe de Véronique Orian-Rousseau a d'ailleurs développé de petits peptides provenant de l'exon de CD44v6 afin d'inhiber les coopérations VEGFR2/CD44v6 et c-Met/CD44v6 impliquées dans les métastases et l'angiogenèse (Orian-Rousseau, 2010).

Dans ce contexte, nous avons réalisé le séquençage de toutes les isoformes de CD44 dans trois lignées cancéreuses de différents types et qui présentent une forte réponse pro-invasive au NGF : les MDA-MB-231 (sein), les PC-3 (prostate) et les SQ20B (larynx). La relocalisation membranaire des isoformes de CD44 contenant les exons v3 ou v6, ainsi que la formation des complexes TrkA/CD44v3 et TrkA/CD44v6 par duolink<sup>®</sup> ont mis en évidence que l'exon v3 contient probablement le déterminant moléculaire de l'interaction TrkA/CD44. En outre, cette hypothèse a été confirmée dans un modèle cellulaire n'exprimant ni TrkA, ni CD44, dans lequel a notamment été transfecté les couples de récepteurs TrkA/CD44v3 et TrkA/CD44v6, et où la technique de Duolink<sup>®</sup> a été appliquée pour vérifier les interactions potentielles entre récepteurs (Données non montrées).

Au vu de ces résultats très encourageants, il serait intéressant de poursuivre cette partie des travaux de thèse en évaluant la présence des complexes TrkA/CD44v3 dans un large panel de tumeurs (en TMA) afin d'établir une éventuelle corrélation à des paramètres clinicopathologiques. En effet, les études cliniques peinent à confirmer les analyses *in vitro* démontrant l'impact de CD44 dans la progression tumorale. Par exemple, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une éventuelle corrélation entre la co-expression TrkA/CD44 et un

## DISCUSSION & PERSPECTIVES

des critères clinicopathologiques dans le cancer du sein (Article 2). Cette observation peut très certainement être due au fait que dans ces analyses, nous n'avons pas ciblé un exon particulier de CD44. En effet, il serait intéressant de refaire l'étude en se focalisant sur l'analyse de la co-expression de TrkA avec les isoformes de CD44 contenant l'exon v3.

Par ailleurs, nous pourrions à plus long terme aboutir au développement d'un inhibiteur bivalent bloquant l'interaction TrkA/CD44. Dans cet optique, il est prévu d'effectuer de la mutagenèse dirigée afin d'identifier précisément les acides aminés impliqués dans la formation du complexe TrkA/CD44v3. Un tel inhibiteur aura un intérêt clinique non négligeable dans la mesure où il pourrait présenter une toxicité moindre pour les patients.

En conclusion, l'ensemble de mes travaux a permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'intervention de réseaux de signalisation induits par le NGF et le proNGF dans le cancer du sein mais aussi dans d'autres cancers. La découverte des complexes membranaires sortiline/TrkA/EphA2 et TrkA/CD44 doit amener à définir de nouvelles stratégies thérapeutiques telles que l'utilisation conjointe d'inhibiteurs dirigés contre les récepteurs TrkA et EphA2, proposée dans le brevet d'invention. En outre, ces coopérations entre récepteurs pourraient également être utilisées en tant que biomarqueurs de la progression tumorale.

---

# **BIBLIOGRAPHIE**

---

## BIBLIOGRAPHIE

(2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**: 61-70.

Acconcia F, Sigismund S, Polo S (2009). Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Experimental cell research* **315**: 1610-1618.

Adams GP, Weiner LM (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature biotechnology* **23**: 1147-1157.

Adams JM, Strasser A (2008). Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer research* **68**: 4018-4021.

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

Aggarwal BB (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews Immunology* **3**: 745-756.

Akinleye A, Furqan M, Mukhi N, Ravella P, Liu D (2013). MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *Journal of hematology & oncology* **6**: 27.

Al-Ansari MM, Hendrayani SF, Shehata AI, Aboussekhra A (2013). p16(INK4A) represses the paracrine tumor-promoting effects of breast stromal fibroblasts. *Oncogene* **32**: 2356-2364.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 3983-3988.

Albaugh P, Fan Y, Mi Y, Sun F, Adrian F, Li N *et al* (2012). Discovery of GNF-5837, a Selective TRK Inhibitor with Efficacy in Rodent Cancer Tumor Models. *ACS medicinal chemistry letters* **3**: 140-145.

Aleskandarany MA, Rakha EA, Ahmed MA, Powe DG, Paish EC, Macmillan RD *et al* (2010). PIK3CA expression in invasive breast cancer: a biomarker of poor prognosis. *Breast cancer research and treatment* **122**: 45-53.

Alexander S, Friedl P (2012). Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure. *Trends in molecular medicine* **18**: 13-26.

Allemand H, Seradour B, Weill A, Ricordeau P (2008). [Decline in breast cancer incidence in 2005 and 2006 in France: a paradoxical trend]. *Bulletin du cancer* **95**: 11-15.

Aloe L (2011). Rita Levi-Montalcini and the discovery of NGF, the first nerve cell growth factor. *Archives italiennes de biologie* **149**: 175-181.

Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN (2010). Emerging targeted therapies for breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**: 3366-3379.

Anandappa G, Turner NC (2013). Targeting receptor tyrosine kinases in HER2-negative breast cancer. *Current opinion in oncology* **25**: 594-601.

## BIBLIOGRAPHIE

Andrechek ER, Mori S, Rempel RE, Chang JT, Nevins JR (2008). Patterns of cell signaling pathway activation that characterize mammary development. *Development* **135**: 2403-2413.

Angeletti RH, Bradshaw RA (1971). Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**: 2417-2420.

Anido J, Scaltriti M, Bech Serra JJ, Santiago Josef B, Todo FR, Baselga J *et al* (2006). Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *The EMBO journal* **25**: 3234-3244.

Apostolou P, Fostira F (2013). Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *BioMed research international* **2013**: 747318.

Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinavar FF, Bray MR, Snow BE, Ayala R *et al* (2003). Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer research* **63**: 196-206.

Ardini E, Bosotti R, Borgia AL, De Ponti C, Somaschini A, Cammarota R *et al* (2014). The TPM3-NTRK1 rearrangement is a recurring event in colorectal carcinoma and is associated with tumor sensitivity to TRKA kinase inhibition. *Molecular oncology*.

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

Arevalo JC, Conde B, Hempstead BI, Chao MV, Martin-Zanca D, Perez P (2001). A novel mutation within the extracellular domain of TrkA causes constitutive receptor activation. *Oncogene* **20**: 1229-1234.

Arevalo JC, Yano H, Teng KK, Chao MV (2004). A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *The EMBO journal* **23**: 2358-2368.

Arevalo JC, Pereira DB, Yano H, Teng KK, Chao MV (2006a). Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **281**: 1001-1007.

Arevalo JC, Waite J, Rajagopal R, Beyna M, Chen ZY, Lee FS *et al* (2006b). Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron* **50**: 549-559.

Arisi I, D'Onofrio M, Brandi R, Malerba F, Paoletti F, Storti AE *et al* (2014). proNGF/NGF mixtures induce gene expression changes in PC12 cells that neither singly produces. *BMC neuroscience* **15**: 48.



## BIBLIOGRAPHIE

- Armugam A, Koh DC, Ching CS, Chandrasekaran K, Kaur P, Jeyaseelan K (2012). Pro-domain in precursor nerve growth factor mediates cell death. *Neurochemistry international* **60**: 852-863.
- Arnold A, Papanikolaou A (2005). Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**: 4215-4224.
- Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, Benoit L, Bonnetain F, Migeon C *et al* (2006). Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *British journal of cancer* **94**: 259-267.
- Arpino G, Laucirica R, Elledge RM (2005). Premalignant and in situ breast disease: biology and clinical implications. *Annals of internal medicine* **143**: 446-457.
- Arribas J, Baselga J, Pedersen K, Parra-Palau JL (2011). p95HER2 and breast cancer. *Cancer research* **71**: 1515-1519.
- Arrighi N, Bodei S, Zani D, Simeone C, Cunico SC, Missale C *et al* (2010). Nerve growth factor signaling in prostate health and disease. *Growth Factors* **28**: 191-201.
- Artacho-Cordon A, Artacho-Cordon F, Rios-Arrabal S, Calvente I, Nunez MI (2012). Tumor microenvironment and breast cancer progression: a complex scenario. *Cancer biology & therapy* **13**: 14-24.
- Ascano M, Bodmer D, Kuruvilla R (2012). Endocytic trafficking of neurotrophins in neural development. *Trends in cell biology* **22**: 266-273.
- Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S *et al* (2004). The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer biology & therapy* **3**: 772-775.
- Bao W, Fu HJ, Xie QS, Wang L, Zhang R, Guo ZY *et al* (2011). HER2 interacts with CD44 to up-regulate CXCR4 via epigenetic silencing of microRNA-139 in gastric cancer cells. *Gastroenterology* **141**: 2076-2087 e2076.
- Barbacid M, Lamballe F, Pulido D, Klein R (1991). The trk family of tyrosine protein kinase receptors. *Biochimica et biophysica acta* **1072**: 115-127.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal* **1**: 549-553.
- Barker PA, Lomen-Hoerth C, Gensch EM, Meakin SO, Glass DJ, Shooter EM (1993). Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *The Journal of biological chemistry* **268**: 15150-15157.
- Barker PA, Barbee G, Misko TP, Shooter EM (1994). The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *The Journal of biological chemistry* **269**: 30645-30650.

## BIBLIOGRAPHIE

- Barker PA, Shooter EM (1994). Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* **13**: 203-215.
- Barker PA (2004). p75<sup>NTR</sup> is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* **42**: 529-533.
- Barker PA (2007). High affinity not in the vicinity? *Neuron* **53**: 1-4.
- Barker PA (2009). A p75<sup>(NTR)</sup> pivoting paradigm propels perspicacity. *Neuron* **62**: 3-5.
- Barrios CH, Liu MC, Lee SC, Vanlemmens L, Ferrero JM, Tabei T *et al* (2010). Phase III randomized trial of sunitinib versus capecitabine in patients with previously treated HER2-negative advanced breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **121**: 121-131.
- Bartholomeusz C, Gonzalez-Angulo AM, Liu P, Hayashi N, Lluch A, Ferrer-Lozano J *et al* (2012). High ERK protein expression levels correlate with shorter survival in triple-negative breast cancer patients. *The oncologist* **17**: 766-774.
- Baselga J (2011). Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *The oncologist* **16 Suppl 1**: 12-19.
- Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, de Azambuja E, Aura C *et al* (2012a). Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet* **379**: 633-640.
- Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, 3rd, Rugo HS, Sahmoud T *et al* (2012b). Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine* **366**: 520-529.
- Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH *et al* (2012c). Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* **366**: 109-119.
- Baselga J, Segalla JG, Roche H, Del Giglio A, Pinczowski H, Ciruelos EM *et al* (2012d). Sorafenib in combination with capecitabine: an oral regimen for patients with HER2-negative locally advanced or metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**: 1484-1491.
- Baselga J, Costa F, Gomez H, Hudis CA, Rapoport B, Roche H *et al* (2013a). A phase 3 trial comparing capecitabine in combination with Sorafenib or placebo for treatment of locally advanced or metastatic HER2-Negative breast Cancer (the RESILIENCE study): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **14**: 228.
- Baselga J, Gomez P, Greil R, Braga S, Climent MA, Wardley AM *et al* (2013b). Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**: 2586-2592.

## BIBLIOGRAPHIE

- Bayraktar S, Gluck S (2013). Molecularly targeted therapies for metastatic triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **138**: 21-35.
- Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM *et al* (2002). ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* **36**: 375-386.
- Beaty BT, Sharma VP, Bravo-Cordero JJ, Simpson MA, Eddy RJ, Koleske AJ *et al* (2013).  $\beta$ 1 integrin regulates Arg to promote invadopodial maturation and matrix degradation. *Molecular biology of the cell* **24**: 1661-1675, S1661-1611.
- Belrose JC, Masoudi R, Michalski B, Fahnestock M (2014). Increased pro-nerve growth factor and decreased brain-derived neurotrophic factor in non-Alzheimer's disease tauopathies. *Neurobiology of aging* **35**: 926-933.
- Benson JR, Jatoi I (2012). The global breast cancer burden. *Future Oncol* **8**: 697-702.
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* **7**: 857-866.
- Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K *et al* (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer cell* **12**: 395-402.
- Bertos NR, Park M (2011). Breast cancer - one term, many entities? *The Journal of clinical investigation* **121**: 3789-3796.
- Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P *et al* (2008). How basal are triple-negative breast cancers? *International journal of cancer Journal international du cancer* **123**: 236-240.
- Bhargava R, Dabbs DJ (2008). Luminal B breast tumors are not HER2 positive. *Breast cancer research : BCR* **10**: 404; author reply 405.
- Bhattacharyya A, Watson FL, Pomeroy SL, Zhang YZ, Stiles CD, Segal RA (2002). High-resolution imaging demonstrates dynein-based vesicular transport of activated Trk receptors. *Journal of neurobiology* **51**: 302-312.
- Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **432**: 332-337.
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *The EMBO journal* **18**: 616-622.
- Bierl MA, Jones EE, Crutcher KA, Isaacson LG (2005). 'Mature' nerve growth factor is a minor species in most peripheral tissues. *Neuroscience letters* **380**: 133-137.
- Bilderback TR, Grigsby RJ, Dobrowsky RT (1997). Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae. *The Journal of biological chemistry* **272**: 10922-10927.

## BIBLIOGRAPHIE

Bilderback TR, Gazula VR, Lisanti MP, Dobrowsky RT (1999). Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* **274**: 257-263.

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

Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, Rugo H, Sledge G, Koehler M *et al* (2010). Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**: 1124-1130.

Blochl A, Blumenstein L, Ahmadian MR (2004). Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75. *The European journal of neuroscience* **20**: 2321-2335.

Blochl A, Blochl R (2007). A cell-biological model of p75NTR signaling. *Journal of neurochemistry* **102**: 289-305.

Bloom AP, Jimenez-Andrade JM, Taylor RN, Castaneda-Corral G, Kaczmarek MJ, Freeman KT *et al* (2011). Breast cancer-induced bone remodeling, skeletal pain, and sprouting of sensory nerve fibers. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* **12**: 698-711.

Bloom HJ, Richardson WW (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British journal of cancer* **11**: 359-377.

Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J *et al* (2010). Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS medicine* **7**: e1000279.

Blumenthal GM, Scher NS, Cortazar P, Chattopadhyay S, Tang S, Song P *et al* (2013). First FDA approval of dual anti-HER2 regimen: pertuzumab in combination with trastuzumab and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**: 4911-4916.

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

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

Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, Shen W, Shen D, Koboldt DC *et al* (2013). Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer discovery* **3**: 224-237.

## BIBLIOGRAPHIE

Bourguignon LY, Zhu H, Zhou B, Diedrich F, Singleton PA, Hung MC (2001). Hyaluronan promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185(HER2) and induces Rac1 and Ras signaling during ovarian tumor cell migration and growth. *The Journal of biological chemistry* **276**: 48679-48692.

Bourguignon LY, Singleton PA, Zhu H, Diedrich F (2003). Hyaluronan-mediated CD44 interaction with RhoGEF and Rho kinase promotes Grb2-associated binder-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase signaling leading to cytokine (macrophage-colony stimulating factor) production and breast tumor progression. *The Journal of biological chemistry* **278**: 29420-29434.

Bourguignon LY (2008). Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Seminars in cancer biology* **18**: 251-259.

Bourguignon LY, Wong G, Earle C, Krueger K, Spevak CC (2010). Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Src-mediated twist signaling, microRNA-10b expression, and RhoA/RhoC up-regulation, leading to Rho-kinase-associated cytoskeleton activation and breast tumor cell invasion. *The Journal of biological chemistry* **285**: 36721-36735.

Bourhis XL, Toillon RA, Boilly B, Hondermarck H (2000). Autocrine and paracrine growth inhibitors of breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **60**: 251-258.

Boutillier J, Ceni C, Pagdala PC, Forgie A, Neet KE, Barker PA (2008). Proneurotrophins require endocytosis and intracellular proteolysis to induce TrkA activation. *The Journal of biological chemistry* **283**: 12709-12716.

Brabek J, Constancio SS, Siesser PF, Shin NY, Pozzi A, Hanks SK (2005). Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of SRC-transformed cells. *Molecular cancer research : MCR* **3**: 307-315.

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

Bradshaw RA, Chalkley RJ, Biarc J, Burlingame AL (2013). Receptor tyrosine kinase signaling mechanisms: Devolving TrkA responses with phosphoproteomics. *Advances in biological regulation* **53**: 87-96.

Bramati A, Girelli S, Torri V, Farina G, Galfrascoli E, Piva S *et al* (2014). Efficacy of biological agents in metastatic triple-negative breast cancer. *Cancer treatment reviews* **40**: 605-613.

Brantley-Sieders DM, Zhuang G, Hicks D, Fang WB, Hwang Y, Cates JM *et al* (2008). The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *The Journal of clinical investigation* **118**: 64-78.

Brantley-Sieders DM, Jiang A, Sarma K, Badu-Nkansah A, Walter DL, Shyr Y *et al* (2011). Eph/ephrin profiling in human breast cancer reveals significant associations between expression level and clinical outcome. *PloS one* **6**: e24426.

## BIBLIOGRAPHIE

- Brantley-Sieders DM (2012). Clinical relevance of Ephs and ephrins in cancer: lessons from breast, colorectal, and lung cancer profiling. *Seminars in cell & developmental biology* **23**: 102-108.
- Bravo-Cordero JJ, Hodgson L, Condeelis JS (2014). Spatial regulation of tumor cell protrusions by RhoC. *Cell adhesion & migration* **8**.
- Brennan C, Rivas-Plata K, Landis SC (1999). The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons in vivo. *Nature neuroscience* **2**: 699-705.
- Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**: 7350-7360.
- Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, Thorner J, Gibson HL, Brake AJ *et al* (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *The Journal of cell biology* **111**: 2851-2859.
- Breuza L, Garcia M, Delgrossi MH, Le Bivic A (2002). Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Experimental cell research* **273**: 178-186.
- Brevet M, Shimizu S, Bott MJ, Shukla N, Zhou Q, Olshen AB *et al* (2011). Coactivation of receptor tyrosine kinases in malignant mesothelioma as a rationale for combination targeted therapy. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **6**: 864-874.
- Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR *et al* (2009). Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**: 3244-3250.
- Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**: 391-398.
- Brummer T, Schmitz-Peiffer C, Daly RJ (2010). Docking proteins. *The FEBS journal* **277**: 4356-4369.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS *et al* (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868.
- Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV *et al* (2002). 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *The Journal of cell biology* **156**: 817-828.
- Bruno MA, Cuello AC (2006). Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 6735-6740.

## BIBLIOGRAPHIE

- Burriss HA, 3rd, Tibbitts J, Holden SN, Sliwkowski MX, Lewis Phillips GD (2011). Trastuzumab emtansine (T-DM1): a novel agent for targeting HER2+ breast cancer. *Clinical breast cancer* **11**: 275-282.
- Burriss HA, 3rd (2013). Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **71**: 829-842.
- Burstein HJ, Sun Y, Dirix LY, Jiang Z, Paridaens R, Tan AR *et al* (2010). Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**: 1301-1307.
- Butowt R, von Bartheld CS (2009). Fates of neurotrophins after retrograde axonal transport: phosphorylation of p75NTR is a sorting signal for delayed degradation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**: 10715-10729.
- Cain RJ, Ridley AJ (2009). Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **101**: 13-29.
- Cameron D, Casey M, Press M, Lindquist D, Pienkowski T, Romieu CG *et al* (2008). A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. *Breast cancer research and treatment* **112**: 533-543.
- Campagnolo L, Costanza G, Francesconi A, Arcuri G, Moscatelli I, Orlandi A (2014). Sortilin expression is essential for pro-nerve growth factor-induced apoptosis of rat vascular smooth muscle cells. *PloS one* **9**: e84969.
- Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS *et al* (2004). Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer research* **64**: 7678-7681.
- Campbell LL, Polyak K (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* **6**: 2332-2338.
- Campane M, Bondarenko I, Brinca S, Hotko Y, Munster PN, Chmielowska E *et al* (2012). Phase II study of single-agent bosutinib, a Src/Abl tyrosine kinase inhibitor, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer pretreated with chemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23**: 610-617.
- Campos X, Munoz Y, Selman A, Yazigi R, Moyano L, Weinstein-Oppenheimer C *et al* (2007). Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology* **104**: 168-175.
- Canuel M, Bhattacharyya N, Balbis A, Yuan L, Morales CR (2009). Sortilin and prosaposin localize to detergent-resistant membrane microdomains. *Experimental cell research* **315**: 240-247.

## BIBLIOGRAPHIE

- Capsoni S, Tiveron C, Vignone D, Amato G, Cattaneo A (2010). Dissecting the involvement of tropomyosin-related kinase A and p75 neurotrophin receptor signaling in NGF deficit-induced neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 12299-12304.
- Cardoso F, Van't Veer L, Rutgers E, Loi S, Mook S, Piccart-Gebhart MJ (2008). Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**: 729-735.
- Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L (2010). Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nature reviews Clinical oncology* **7**: 683-692.
- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F *et al* (2007). The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**: 2329-2334.
- Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, Mayer EL, Esteva FJ, Ma CX *et al* (2012). TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**: 2615-2623.
- Carmeliet P (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine* **9**: 653-660.
- Carmeliet P (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **69 Suppl 3**: 4-10.
- Casaccia-Bonofil P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* **383**: 716-719.
- Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM (2010). The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer metastasis reviews* **29**: 751-759.
- Ceni C, Kommaddi RP, Thomas R, Vereker E, Liu X, McPherson PS *et al* (2010). The p75NTR intracellular domain generated by neurotrophin-induced receptor cleavage potentiates Trk signaling. *Journal of cell science* **123**: 2299-2307.
- Chang MS, Arevalo JC, Chao MV (2004). Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *Journal of neuroscience research* **78**: 186-192.
- Chao MV, Bothwell MA, Ross AH, Koprowski H, Lanahan AA, Buck CR *et al* (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* **232**: 518-521.
- Chao MV, Hempstead BL (1995). p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends in neurosciences* **18**: 321-326.
- Chao MV (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews Neuroscience* **4**: 299-309.



## BIBLIOGRAPHIE

- Chari RV (2008). Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *Accounts of chemical research* **41**: 98-107.
- Chellaiah MA, Schaller MD (2009). Activation of Src kinase by protein-tyrosine phosphatase-PEST in osteoclasts: comparative analysis of the effects of bisphosphonate and protein-tyrosine phosphatase inhibitor on Src activation in vitro. *Journal of cellular physiology* **220**: 382-393.
- Chen J, Tian CX, Yu M, Lv Q, Cheng NS, Wang Z *et al* (2014). Efficacy and Safety Profile of Combining Sorafenib with Chemotherapy in Patients with HER2-Negative Advanced Breast Cancer: A Meta-analysis. *Journal of breast cancer* **17**: 61-68.
- Chen LW, Yung KK, Chan YS, Shum DK, Bolam JP (2008). The proNGF-p75NTR-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* **7**: 512-523.
- Chen X, Bargonetti J, Prives C (1995). p53, through p21 (WAF1/CIP1), induces cyclin D1 synthesis. *Cancer research* **55**: 4257-4263.
- Chen Y, Olopade OI (2008). MYC in breast tumor progression. *Expert review of anticancer therapy* **8**: 1689-1698.
- Chen Z, Guo L, Hadas J, Gutowski S, Sprang SR, Sternweis PC (2012). Activation of p115-RhoGEF requires direct association of Galpha13 and the Dbl homology domain. *The Journal of biological chemistry* **287**: 25490-25500.
- Cheung M, Testa JR (2013). Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy. *Current cancer drug targets* **13**: 234-244.
- Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, Cantarella G, Bianchi A, Bernardini R (2001). Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer research* **61**: 3002-3008.
- Cirri P, Chiarugi P (2012). Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer metastasis reviews* **31**: 195-208.
- Clark O, Botrel TE, Paladini L, Ferreira MB (2014). Targeted therapy in triple-negative metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Core evidence* **9**: 1-11.
- Clary DO, Reichardt LF (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 11133-11137.
- Cleton-Jansen AM, Moerland EW, Kuipers-Dijkshoorn NJ, Callen DF, Sutherland GR, Hansen B *et al* (1994). At least two different regions are involved in allelic imbalance on chromosome arm 16q in breast cancer. *Genes, chromosomes & cancer* **9**: 101-107.
- Cleton-Jansen AM (2002). E-cadherin and loss of heterozygosity at chromosome 16 in breast carcinogenesis: different genetic pathways in ductal and lobular breast cancer? *Breast cancer research : BCR* **4**: 5-8.

## BIBLIOGRAPHIE

Clevers H (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine* **17**: 313-319.

Clewes O, Fahey MS, Tyler SJ, Watson JJ, Seok H, Catania C *et al* (2008). Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin. *Journal of neurochemistry* **107**: 1124-1135.

Clucas J, Valderrama F (2014). ERM proteins in cancer progression. *Journal of cell science* **127**: 267-275.

Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V (1954). A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **40**: 1014-1018.

Colombo PE, Milanezi F, Weigelt B, Reis-Filho JS (2011). Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction. *Breast cancer research : BCR* **13**: 212.

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

Corbit KC, Foster DA, Rosner MR (1999). Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Molecular and cellular biology* **19**: 4209-4218.

Corkery B, Crown J, Clynes M, O'Donovan N (2009). Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **20**: 862-867.

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

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

Crown J, O'Shaughnessy J, Gullo G (2012). Emerging targeted therapies in triple-negative breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23 Suppl 6**: vi56-65.

Crown JP, Dieras V, Staroslawska E, Yardley DA, Bachelot T, Davidson N *et al* (2013). Phase III trial of sunitinib in combination with capecitabine versus capecitabine monotherapy for the treatment of patients with pretreated metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**: 2870-2878.

Cufi S, Corominas-Faja B, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Dorca J, Bosch-Barrera J *et al* (2012). Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44+CD24-

## BIBLIOGRAPHIE

/low cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human breast cancer xenografts. *Oncotarget* **3**: 395-398.

Cunningham-Edmondson AC, Hanks SK (2009). p130Cas substrate domain signaling promotes migration, invasion, and survival of estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Breast cancer : targets and therapy* **2009**: 39-52.

Cunningham ME, Stephens RM, Kaplan DR, Greene LA (1997). Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* **272**: 10957-10967.

Curigliano G, Locatelli M, Fumagalli L, Brollo J, Munzone E, Nole F *et al* (2012). Targeting the subtypes of breast cancer: rethinking investigational drugs. *Expert opinion on investigational drugs* **21**: 191-204.

Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ *et al* (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**: 346-352.

Curtis J, Finkbeiner S (1999). Sending signals from the synapse to the nucleus: possible roles for CaMK, Ras/ERK, and SAPK pathways in the regulation of synaptic plasticity and neuronal growth. *Journal of neuroscience research* **58**: 88-95.

D'Onofrio M, Paoletti F, Arisi I, Brandi R, Malerba F, Fasulo L *et al* (2011). NGF and proNGF regulate functionally distinct mRNAs in PC12 cells: an early gene expression profiling. *PloS one* **6**: e20839.

Dai L, Guinea MC, Slomiany MG, Bratoeva M, Grass GD, Tolliver LB *et al* (2013). CD147-dependent heterogeneity in malignant and chemoresistant properties of cancer cells. *The American journal of pathology* **182**: 577-585.

Dail M, Kalo MS, Seddon JA, Cote JF, Vuori K, Pasquale EB (2004). SHEP1 function in cell migration is impaired by a single amino acid mutation that disrupts association with the scaffolding protein cas but not with Ras GTPases. *The Journal of biological chemistry* **279**: 41892-41902.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y *et al* (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**: 231-241.

Daubisse-Marliac L, Delafosse P, Boitard JB, Poncet F, Grosclaude P, Colonna M (2011). Breast cancer incidence and time trend in France from 1990 to 2007: a population-based study from two French cancer registries. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **22**: 329-334.

Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Ann Florenes V, Nielsen S, Nesland JM (2004). Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment* **83**: 119-128.

## BIBLIOGRAPHIE

Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C (2013). A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *The EMBO journal* **32**: 617-628.

de Deus Moura R, Wludarski SC, Carvalho FM, Bacchi CE (2013). Immunohistochemistry applied to the differential diagnosis between ductal and lobular carcinoma of the breast. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* **21**: 1-12.

De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N (2012). The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert opinion on therapeutic targets* **16 Suppl 2**: S17-27.

de Pablo Y, Perez-Garcia MJ, Georgieva MV, Sanchis D, Lindqvist N, Soler RM *et al* (2008). Tyr-701 is a new regulatory site for neurotrophin receptor TrkA trafficking and function. *Journal of neurochemistry* **104**: 124-139.

Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *The EMBO journal* **17**: 4426-4441.

Dean-Colomb W, Esteva FJ (2008). Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. *Eur J Cancer* **44**: 2806-2812.

Dechant G, Barde YA (1997). Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Current opinion in neurobiology* **7**: 413-418.

Delcroix JD, Valletta JS, Wu C, Hunt SJ, Kowal AS, Mobley WC (2003). NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* **39**: 69-84.

Delsite R, Djakiew D (1996). Anti-proliferative effect of the kinase inhibitor K252a on human prostatic carcinoma cell lines. *Journal of andrology* **17**: 481-490.

Delsite R, Djakiew D (1999). Characterization of nerve growth factor precursor protein expression by human prostate stromal cells: a role in selective neurotrophin stimulation of prostate epithelial cell growth. *The Prostate* **41**: 39-48.

Demont Y, Corbet C, Page A, Ataman-Onal Y, Choquet-Kastylevsky G, Fliniaux I *et al* (2012). Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein. *The Journal of biological chemistry* **287**: 1923-1931.

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. *The Journal of biological chemistry* **273**: 16659-16662.

Descamps S, Pawlowski V, Revillion F, Hornez L, Hebbar M, Boilly B *et al* (2001a). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer research* **61**: 4337-4340.

## BIBLIOGRAPHIE

- Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V *et al* (2001b). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* **276**: 17864-17870.
- Di Fiore R, D'Anneo A, Tesoriere G, Vento R (2013). RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *Journal of cellular physiology* **228**: 1676-1687.
- Diao DM, Song YC, Hou N, Xu HF, Wang JG, Dang CX (2012). [Responses of pancreatic cancer cells to stimulations by nerve growth factor and the role of Trk-A expression]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* **32**: 296-300.
- Dikic I, Batzer AG, Blaikie P, Obermeier A, Ullrich A, Schlessinger J *et al* (1995). Shc binding to nerve growth factor receptor is mediated by the phosphotyrosine interaction domain. *The Journal of biological chemistry* **270**: 15125-15129.
- Dillon RL, White DE, Muller WJ (2007). The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* **26**: 1338-1345.
- Dillon RL, Muller WJ (2010). Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer research* **70**: 4260-4264.
- Diolaiti D, Bernardoni R, Trazzi S, Papa A, Porro A, Bono F *et al* (2007). Functional cooperation between TrkA and p75(NTR) accelerates neuronal differentiation by increased transcription of GAP-43 and p21(CIP/WAF) genes via ERK1/2 and AP-1 activities. *Experimental cell research* **313**: 2980-2992.
- Dionne CA, Camoratto AM, Jani JP, Emerson E, Neff N, Vaught JL *et al* (1998). Cell cycle-independent death of prostate adenocarcinoma is induced by the trk tyrosine kinase inhibitor CEP-751 (KT6587). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **4**: 1887-1898.
- Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B *et al* (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer research* **71**: 2455-2465.
- Dolle JP, Rezvan A, Allen FD, Lazarovici P, Lelkes PI (2005a). Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **315**: 1220-1227.
- Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V, Hondermarck H (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* **22**: 5592-5601.
- Dolle L, Adriaenssens E, El Yazidi-Belkoura I, Le Bourhis X, Nurcombe V, Hondermarck H (2004). Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Current cancer drug targets* **4**: 463-470.

## BIBLIOGRAPHIE

Dolle L, Oliveira MJ, Bruyneel E, Hondermarck H, Bracke M (2005b). Nerve growth factor mediates its pro-invasive effect in parallel with the release of a soluble E-cadherin fragment from breast cancer MCF-7/AZ cells. *The Journal of dairy research* **72 Spec No:** 20-26.

Domeniconi M, Hempstead BL, Chao MV (2007). Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death. *Molecular and cellular neurosciences* **34:** 271-279.

Donatello S, Babina IS, Hazelwood LD, Hill AD, Nabi IR, Hopkins AM (2012). Lipid raft association restricts CD44-ezrin interaction and promotion of breast cancer cell migration. *The American journal of pathology* **181:** 2172-2187.

Drabsch Y, ten Dijke P (2011). TGF-beta signaling in breast cancer cell invasion and bone metastasis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **16:** 97-108.

Droufakou S, Deshmane V, Roylance R, Hanby A, Tomlinson I, Hart IR (2001). Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. *International journal of cancer Journal international du cancer* **92:** 404-408.

Dubus P, Parrens M, El-Mokhtari Y, Ferrer J, Groppi A, Merlio JP (2000). Identification of novel trkA variants with deletions in leucine-rich motifs of the extracellular domain. *Journal of neuroimmunology* **107:** 42-49.

Duffy MJ, McGowan PM, Crown J (2012). Targeted therapy for triple-negative breast cancer: where are we? *International journal of cancer Journal international du cancer* **131:** 2471-2477.

Eccles SA (2011). The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *The International journal of developmental biology* **55:** 685-696.

Eibl JK, Strasser BC, Ross GM (2012). Structural, biological, and pharmacological strategies for the inhibition of nerve growth factor. *Neurochemistry international* **61:** 1266-1275.

El Saghir NS, Tfayli A, Hatoum HA, Nachef Z, Dinh P, Awada A (2011). Treatment of metastatic breast cancer: state-of-the-art, subtypes and perspectives. *Critical reviews in oncology/hematology* **80:** 433-449.

El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Dolle L, Descamps S, Hondermarck H (2003). Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **278:** 16952-16956.

Elenbaas B, Weinberg RA (2001). Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Experimental cell research* **264:** 169-184.

Ellis LM, Hicklin DJ (2009). Resistance to Targeted Therapies: Refining Anticancer Therapy in the Era of Molecular Oncology. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15:** 7471-7478.

Engelman JA (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature reviews Cancer* **9:** 550-562.

## BIBLIOGRAPHIE

- Epa WR, Markovska K, Barrett GL (2004). The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation. *Journal of neurochemistry* **89**: 344-353.
- Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A *et al* (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell death and differentiation* **15**: 504-514.
- Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, Lluch A (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer treatment reviews* **38**: 698-707.
- Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR *et al* (2001). The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *The Journal of biological chemistry* **276**: 32687-32695.
- Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD (2001). The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Molecular and cellular neurosciences* **18**: 210-220.
- Fahnestock M, Yu G, Coughlin MD (2004a). ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule? *Progress in brain research* **146**: 101-110.
- Fahnestock M, Yu G, Michalski B, Mathew S, Colquhoun A, Ross GM *et al* (2004b). The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *Journal of neurochemistry* **89**: 581-592.
- Fang L, Barekati Z, Zhang B, Liu Z, Zhong X (2011). Targeted therapy in breast cancer: what's new? *Swiss medical weekly* **141**: w13231.
- Faoro L, Singleton PA, Cervantes GM, Lennon FE, Choong NW, Kanteti R *et al* (2010). EphA2 mutation in lung squamous cell carcinoma promotes increased cell survival, cell invasion, focal adhesions, and mammalian target of rapamycin activation. *The Journal of biological chemistry* **285**: 18575-18585.
- Farina AR, Tacconelli A, Cappabianca L, Cea G, Panella S, Chioda A *et al* (2009). The alternative TrkAIII splice variant targets the centrosome and promotes genetic instability. *Molecular and cellular biology* **29**: 4812-4830.
- Farina AR, Di Ianni N, Cappabianca L, Ruggeri P, Ragone M, Ianni G *et al* (2013). TrkAIII promotes microtubule nucleation and assembly at the centrosome in SH-SY5Y neuroblastoma cells, contributing to an undifferentiated anaplastic phenotype. *BioMed research international* **2013**: 740187.
- Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D *et al* (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* **24**: 4660-4671.

## BIBLIOGRAPHIE

- Faux C, Hawadle M, Nixon J, Wallace A, Lee S, Murray S *et al* (2007). PTPsigma binds and dephosphorylates neurotrophin receptors and can suppress NGF-dependent neurite outgrowth from sensory neurons. *Biochimica et biophysica acta* **1773**: 1689-1700.
- Feng D, Kim T, Ozkan E, Light M, Torkin R, Teng KK *et al* (2010). Molecular and structural insight into proNGF engagement of p75NTR and sortilin. *Journal of molecular biology* **396**: 967-984.
- Festuccia C, Muzi P, Gravina GL, Millimaggi D, Specca S, Dolo V *et al* (2007). Tyrosine kinase inhibitor CEP-701 blocks the NTRK1/NGF receptor and limits the invasive capability of prostate cancer cells in vitro. *International journal of oncology* **30**: 193-200.
- Festuccia C, Gravina GL, Muzi P, Millimaggi D, Dolo V, Vicentini C *et al* (2009). Her2 crosstalks with TrkA in a subset of prostate cancer cells: rationale for a guided dual treatment. *The Prostate* **69**: 337-345.
- Figueroa-Magalhaes MC, Jelovac D, Connolly RM, Wolff AC (2014). Treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast* **23**: 128-136.
- Finger C, Escher C, Schneider D (2009). The single transmembrane domains of human receptor tyrosine kinases encode self-interactions. *Science signaling* **2**: ra56.
- Finn RS, Bengala C, Ibrahim N, Roche H, Sparano J, Strauss LC *et al* (2011). Dasatinib as a single agent in triple-negative breast cancer: results of an open-label phase 2 study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**: 6905-6913.
- Foehr ED, Lin X, O'Mahony A, Geleziunas R, Bradshaw RA, Greene WC (2000). NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**: 7556-7563.
- Fornier MN, Morris PG, Abbruzzi A, D'Andrea G, Gilewski T, Bromberg J *et al* (2011). A phase I study of dasatinib and weekly paclitaxel for metastatic breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **22**: 2575-2581.
- Forsyth PA, Krishna N, Lawn S, Valadez JG, Qu X, Fenstermacher DA *et al* (2014). p75 neurotrophin receptor cleavage by alpha- and gamma-secretases is required for neurotrophin-mediated proliferation of brain tumor-initiating cells. *The Journal of biological chemistry* **289**: 8067-8085.
- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS (2010). Triple-negative breast cancer. *The New England journal of medicine* **363**: 1938-1948.
- Foulkes WD, Shuen AY (2013). In brief: BRCA1 and BRCA2. *The Journal of pathology* **230**: 347-349.
- Fox SB, Generali DG, Harris AL (2007). Breast tumour angiogenesis. *Breast cancer research : BCR* **9**: 216.



## BIBLIOGRAPHIE

- Frade JM (2005). Nuclear translocation of the p75 neurotrophin receptor cytoplasmic domain in response to neurotrophin binding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**: 1407-1411.
- Friedman WJ, Greene LA (1999). Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Experimental cell research* **253**: 131-142.
- Fu N, Lindeman GJ, Visvader JE (2014). The mammary stem cell hierarchy. *Current topics in developmental biology* **107**: 133-160.
- Gall TM, Frampton AE (2013). Gene of the month: E-cadherin (CDH1). *Journal of clinical pathology* **66**: 928-932.
- Gallardo R, Ivarsson Y, Schymkowitz J, Rousseau F, Zimmermann P (2010). Structural diversity of PDZ-lipid interactions. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **11**: 456-467.
- Gargano N, Levi A, Alema S (1997). Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA receptors. *Journal of neuroscience research* **50**: 1-12.
- Garrett JT, Arteaga CL (2011). Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. *Cancer biology & therapy* **11**: 793-800.
- Garton AJ, Flint AJ, Tonks NK (1996). Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Molecular and cellular biology* **16**: 6408-6418.
- Gatzinsky KP, Haugland RP, Thrasivoulou C, Orike N, Budi-Santoso AW, Cowen T (2001). p75 and TrkA receptors are both required for uptake of NGF in adult sympathetic neurons: use of a novel fluorescent NGF conjugate. *Brain research* **920**: 226-238.
- Geetha T, Jiang J, Wooten MW (2005). Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Molecular cell* **20**: 301-312.
- Geetha T, Wooten MW (2008). TrkA receptor endolysosomal degradation is both ubiquitin and proteasome dependent. *Traffic* **9**: 1146-1156.
- Gelmon K, Dent R, Mackey JR, Laing K, McLeod D, Verma S (2012). Targeting triple-negative breast cancer: optimising therapeutic outcomes. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23**: 2223-2234.
- Gentry JJ, Barker PA, Carter BD (2004). The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions. *Progress in brain research* **146**: 25-39.
- George DJ, Dionne CA, Jani J, Angeles T, Murakata C, Lamb J *et al* (1999). Sustained in vivo regression of Dunning H rat prostate cancers treated with combinations of androgen ablation and Trk tyrosine kinase inhibitors, CEP-751 (KT-6587) or CEP-701 (KT-5555). *Cancer research* **59**: 2395-2401.

## BIBLIOGRAPHIE

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

Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T *et al* (2006). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine* **355**: 2733-2743.

Ghilardi JR, Freeman KT, Jimenez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, Kuskowski MA *et al* (2010). Administration of a tropomyosin receptor kinase inhibitor attenuates sarcoma-induced nerve sprouting, neuroma formation and bone cancer pain. *Molecular pain* **6**: 87.

Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC *et al* (2012). Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The lancet oncology* **13**: 25-32.

Gnoni A, Marech I, Silvestris N, Vacca A, Lorusso V (2011). Dasatinib: an anti-tumour agent via Src inhibition. *Current drug targets* **12**: 563-578.

Gokmen-Polar Y, Toroni RA, Hocevar BA, Badve S, Zhao Q, Shen C *et al* (2011). Dual targeting of EphA2 and ER restores tamoxifen sensitivity in ER/EphA2-positive breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **127**: 375-384.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **22**: 1736-1747.

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

Goltsov A, Faratian D, Langdon SP, Bown J, Goryanin I, Harrison DJ (2011). Compensatory effects in the PI3K/PTEN/AKT signaling network following receptor tyrosine kinase inhibition. *Cellular signalling* **23**: 407-416.

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

Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN (2007). Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Advances in experimental medicine and biology* **608**: 1-22.

Gonzalez-Angulo AM, Akcakanat A, Liu S, Green MC, Murray JL, Chen H *et al* (2014). Open-label randomized clinical trial of standard neoadjuvant chemotherapy with paclitaxel followed by FEC versus the combination of paclitaxel and everolimus followed by FEC in

## BIBLIOGRAPHIE

women with triple receptor-negative breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **25**: 1122-1127.

Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ *et al* (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer research* **65**: 5278-5283.

Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF *et al* (1995). E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer research* **55**: 5195-5199.

Grass GD, Tolliver LB, Bratoeva M, Toole BP (2013). CD147, CD44, and the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway cooperate to regulate breast epithelial cell invasiveness. *The Journal of biological chemistry* **288**: 26089-26104.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *The EMBO journal* **16**: 1647-1655.

Greco A, Miranda C, Pierotti MA (2010). Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma. *Molecular and cellular endocrinology* **321**: 44-49.

Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, Valletta JS *et al* (1996). Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**: 7950-7964.

Groenendijk FH, Bernards R (2014). Drug resistance to targeted therapies: Deja vu all over again. *Molecular oncology*.

Guilluy C, Garcia-Mata R, Burridge K (2011). Rho protein crosstalk: another social network? *Trends in cell biology* **21**: 718-726.

Guo W, Pylayeva Y, Pepe A, Yoshioka T, Muller WJ, Inghirami G *et al* (2006). Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* **126**: 489-502.

Gusenbauer S, Vlaicu P, Ullrich A (2013). HGF induces novel EGFR functions involved in resistance formation to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* **32**: 3846-3856.

Hahn WC, Weinberg RA (2002). Rules for making human tumor cells. *The New England journal of medicine* **347**: 1593-1603.

Hallbook F, Ibanez CF, Persson H (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* **6**: 845-858.

Hallbook F (1999). Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Current opinion in neurobiology* **9**: 616-621.

Halon A, Donizy P, Surowiak P, Matkowski R (2013). ERM/Rho protein expression in ductal breast cancer: a 15 year follow-up. *Cell Oncol (Dordr)* **36**: 181-190.

## BIBLIOGRAPHIE

- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.
- Hanahan D, Coussens LM (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell* **21**: 309-322.
- Hanker AB, Pfefferle AD, Balko JM, Kuba MG, Young CD, Sanchez V *et al* (2013). Mutant PIK3CA accelerates HER2-driven transgenic mammary tumors and induces resistance to combinations of anti-HER2 therapies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 14372-14377.
- Harbeck N, Beckmann MW, Rody A, Schneeweiss A, Muller V, Fehm T *et al* (2013). HER2 Dimerization Inhibitor Pertuzumab - Mode of Action and Clinical Data in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* **8**: 49-55.
- Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Morl K *et al* (2004). Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6226-6230.
- Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S *et al* (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**: 5287-5312.
- Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG *et al* (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by G $\alpha$ 13. *Science* **280**: 2112-2114.
- Hasan W, Pedchenko T, Krizsan-Agbas D, Baum L, Smith PG (2003). Sympathetic neurons synthesize and secrete pro-nerve growth factor protein. *Journal of neurobiology* **57**: 38-53.
- Hasenauer S, Malinger D, Koschut D, Pace G, Matzke A, von Au A *et al* (2013). Internalization of Met requires the co-receptor CD44v6 and its link to ERM proteins. *PLoS one* **8**: e62357.
- Hassiotou F, Geddes D (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* **26**: 29-48.
- Head J, Johnston SR (2004). New targets for therapy in breast cancer: farnesyltransferase inhibitors. *Breast cancer research : BCR* **6**: 262-268.
- Heerssen HM, Segal RA (2002). Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends in neurosciences* **25**: 160-165.
- Heerssen HM, Pazyra MF, Segal RA (2004). Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons. *Nature neuroscience* **7**: 596-604.

## BIBLIOGRAPHIE

- Heimann R, Lan F, McBride R, Hellman S (2000). Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer research* **60**: 298-304.
- Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* **350**: 678-683.
- Hendry IA, Stockel K, Thoenen H, Iversen LL (1974). The retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain research* **68**: 103-121.
- Hermey G (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **66**: 2677-2689.
- Herrlich P, Morrison H, Sleeman J, Orian-Rousseau V, Konig H, Weg-Remers S *et al* (2000). CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. *Annals of the New York Academy of Sciences* **910**: 106-118; discussion 118-120.
- Herrup K, Shooter EM (1973). Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 3884-3888.
- Hertweck MK, Erdfelder F, Kreuzer KA (2011). CD44 in hematological neoplasias. *Annals of hematology* **90**: 493-508.
- Higgins MJ, Baselga J (2011). Targeted therapies for breast cancer. *The Journal of clinical investigation* **121**: 3797-3803.
- Higuchi H, Yamashita T, Yoshikawa H, Tohyama M (2003). PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts. *The EMBO journal* **22**: 1790-1800.
- Hiramoto-Yamaki N, Takeuchi S, Ueda S, Harada K, Fujimoto S, Negishi M *et al* (2010). Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism. *The Journal of cell biology* **190**: 461-477.
- Hisata S, Sakisaka T, Baba T, Yamada T, Aoki K, Matsuda M *et al* (2007). Rap1-PDZ-GEF1 interacts with a neurotrophin receptor at late endosomes, leading to sustained activation of Rap1 and ERK and neurite outgrowth. *The Journal of cell biology* **178**: 843-860.
- Hochgrafe F, Zhang L, O'Toole SA, Browne BC, Pinese M, Porta Cubas A *et al* (2010). Tyrosine phosphorylation profiling reveals the signaling network characteristics of Basal breast cancer cells. *Cancer research* **70**: 9391-9401.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* **344**: 339-341.
- Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF, 3rd, Hynes NE (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive

## BIBLIOGRAPHIE

- breast tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 8933-8938.
- Holden PH, Asopa V, Robertson AG, Clarke AR, Tyler S, Bennett GS *et al* (1997). Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor. *Nature biotechnology* **15**: 668-672.
- Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emlet DR, Dieterich R, Wong AJ (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 12419-12424.
- Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC (2001). NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* **32**: 801-814.
- Howe CL, Mobley WC (2004). Signaling endosome hypothesis: A cellular mechanism for long distance communication. *Journal of neurobiology* **58**: 207-216.
- Howe CL, Mobley WC (2005). Long-distance retrograde neurotrophic signaling. *Current opinion in neurobiology* **15**: 40-48.
- Hsiao YH, Chou MC, Fowler C, Mason JT, Man YG (2010). Breast cancer heterogeneity: mechanisms, proofs, and implications. *Journal of Cancer* **1**: 6-13.
- Hu M, Polyak K (2008). Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *Eur J Cancer* **44**: 2760-2765.
- Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF *et al* (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC genomics* **7**: 96.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience* **24**: 677-736.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry* **72**: 609-642.
- Huang PH, Mukasa A, Bonavia R, Flynn RA, Brewer ZE, Cavenee WK *et al* (2007). Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 12867-12872.
- Huang X, Gao L, Wang S, McManaman JL, Thor AD, Yang X *et al* (2010). Heterotrimerization of the growth factor receptors erbB2, erbB3, and insulin-like growth factor-i receptor in breast cancer cells resistant to herceptin. *Cancer research* **70**: 1204-1214.
- Hubbard SR, Miller WT (2007). Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current opinion in cell biology* **19**: 117-123.

## BIBLIOGRAPHIE

- Huber LJ, Chao MV (1995). A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation. *Journal of neuroscience research* **40**: 557-563.
- Iacaruso MF, Galli S, Marti M, Villalta JI, Estrin DA, Jares-Erijman EA *et al* (2011). Structural model for p75(NTR)-TrkA intracellular domain interaction: a combined FRET and bioinformatics study. *Journal of molecular biology* **414**: 681-698.
- Ibanez CF (2007). Message in a bottle: long-range retrograde signaling in the nervous system. *Trends in cell biology* **17**: 519-528.
- Ince TA, Richardson AL, Bell GW, Saitoh M, Godar S, Karnoub AE *et al* (2007). Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. *Cancer cell* **12**: 160-170.
- Incorvati JA, Shah S, Mu Y, Lu J (2013). Targeted therapy for HER2 positive breast cancer. *Journal of hematology & oncology* **6**: 38.
- Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR *et al* (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 3060-3064.
- Iulita MF, Do Carmo S, Ower AK, Fortress AM, Aguilar LF, Hanna M *et al* (2014). Nerve growth factor metabolic dysfunction in Down's syndrome brains. *Brain : a journal of neurology* **137**: 860-872.
- Iyengar P, Espina V, Williams TW, Lin Y, Berry D, Jelicks LA *et al* (2005). Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *The Journal of clinical investigation* **115**: 1163-1176.
- Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK (2002). Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* **416**: 279-280.
- Jahanzeb M (2008). Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-positive breast cancer. *Clinical breast cancer* **8**: 324-333.
- Jeanneteau F, Chao MV (2006). Promoting neurotrophic effects by GPCR ligands. *Novartis Foundation symposium* **276**: 181-189; discussion 189-192, 233-187, 275-181.
- Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P *et al* (2006). Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *The Journal of clinical investigation* **116**: 1561-1570.
- Jhaveri K, Esteva FJ (2014). Pertuzumab in the Treatment of HER2+ Breast Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* **12**: 591-598.
- Jiang X, Shapiro DJ (2014). The immune system and inflammation in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology* **382**: 673-682.

## BIBLIOGRAPHIE

- Jimenez-Andrade JM, Ghilardi JR, Castaneda-Corral G, Kuskowski MA, Mantyh PW (2011). Preventive or late administration of anti-NGF therapy attenuates tumor-induced nerve sprouting, neuroma formation, and cancer pain. *Pain* **152**: 2564-2574.
- Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E *et al* (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* **47**: 545-554.
- Johnston S, Phippen J, Jr., Pivot X, Lichinitser M, Sadeghi S, Dieras V *et al* (2009). Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 5538-5546.
- Jones KR, Reichardt LF (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 8060-8064.
- Jung KM, Tan S, Landman N, Petrova K, Murray S, Lewis R *et al* (2003). Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *The Journal of biological chemistry* **278**: 42161-42169.
- Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS *et al* (2009). Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer cell* **15**: 429-440.
- Kaenel P, Mosimann M, Andres AC (2012). The multifaceted roles of Eph/ephrin signaling in breast cancer. *Cell adhesion & migration* **6**: 138-147.
- Kalluri R, Zeisberg M (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer* **6**: 392-401.
- Kang S, Bader AG, Vogt PK (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 802-807.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 5425-5436.
- Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE (2001). Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry* **276**: 18169-18177.
- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF (1991). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* **252**: 554-558.
- Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C (2009). Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1796**: 91-98.



## BIBLIOGRAPHIE

- Karnoub AE, Symons M, Campbell SL, Der CJ (2004). Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. *Breast cancer research and treatment* **84**: 61-71.
- Kataoka Y, Mukohara T, Shimada H, Saijo N, Hirai M, Minami H (2010). Association between gain-of-function mutations in PIK3CA and resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **21**: 255-262.
- Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR, Bapsy PP, Vaid A, Wardley A *et al* (2009a). Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 5529-5537.
- Kaufman B, Trudeau M, Awada A, Blackwell K, Bachelot T, Salazar V *et al* (2009b). Lapatinib monotherapy in patients with HER2-overexpressing relapsed or refractory inflammatory breast cancer: final results and survival of the expanded HER2+ cohort in EGF103009, a phase II study. *The lancet oncology* **10**: 581-588.
- Khosravi-Far R, Der CJ (1994). The Ras signal transduction pathway. *Cancer metastasis reviews* **13**: 67-89.
- Kiewe P, Thiel E (2008). Ertumaxomab: a trifunctional antibody for breast cancer treatment. *Expert opinion on investigational drugs* **17**: 1553-1558.
- Kim MJ, Chang JS, Park SK, Hwang JI, Ryu SH, Suh PG (2000a). Direct interaction of SOS1 Ras exchange protein with the SH3 domain of phospholipase C-gamma1. *Biochemistry* **39**: 8674-8682.
- Kim MJ, Kim E, Ryu SH, Suh PG (2000b). The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation. *Experimental & molecular medicine* **32**: 101-109.
- Kim T, Hempstead BL (2009). NRH2 is a trafficking switch to regulate sortilin localization and permit proneurotrophin-induced cell death. *The EMBO journal* **28**: 1612-1623.
- Kinzler KW, Vogelstein B (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* **386**: 761, 763.
- Kiris E, Wang T, Yanpallewar S, Dorsey SG, Becker J, Bavari S *et al* (2014). TrkA in vivo function is negatively regulated by ubiquitination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**: 4090-4098.
- Kirkbride KC, Sung BH, Sinha S, Weaver AM (2011). Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell adhesion & migration* **5**: 187-198.
- Klapper LN, Waterman H, Sela M, Yarden Y (2000). Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer research* **60**: 3384-3388.

## BIBLIOGRAPHIE

- Kleer CG, Bloushtain-Qimron N, Chen YH, Carrasco D, Hu M, Yao J *et al* (2008). Epithelial and stromal cathepsin K and CXCL14 expression in breast tumor progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**: 5357-5367.
- Klein R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M (1989). trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *The EMBO journal* **8**: 3701-3709.
- Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M (1991a). The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* **65**: 189-197.
- Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S *et al* (1991b). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* **66**: 395-403.
- Klein R, Lamballe F, Bryant S, Barbacid M (1992). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* **8**: 947-956.
- Kliemann M, Rattenholl A, Golbik R, Balbach J, Lilie H, Rudolph R *et al* (2004). The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS letters* **566**: 207-212.
- Kliemann M, Golbik R, Rudolph R, Schwarz E, Lilie H (2007). The pro-peptide of proNGF: structure formation and intramolecular association with NGF. *Protein science : a publication of the Protein Society* **16**: 411-419.
- Knudson AG (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature reviews Cancer* **1**: 157-162.
- Knudson AG, Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**: 820-823.
- Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I *et al* (2010). Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 20009-20014.
- Komander D, Rape M (2012). The ubiquitin code. *Annual review of biochemistry* **81**: 203-229.
- Kommaddi RP, Thomas R, Ceni C, Daigneault K, Barker PA (2011). Trk-dependent ADAM17 activation facilitates neurotrophin survival signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**: 2061-2070.
- Kong H, Boulter J, Weber JL, Lai C, Chao MV (2001). An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: 176-185.

## BIBLIOGRAPHIE

- Korhonen JM, Said FA, Wong AJ, Kaplan DR (1999). Gab1 mediates neurite outgrowth, DNA synthesis, and survival in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry* **274**: 37307-37314.
- Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG *et al* (1998). p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science* **280**: 2109-2111.
- Kozasa T, Hajicek N, Chow CR, Suzuki N (2011). Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G12 and G13. *Journal of biochemistry* **150**: 357-369.
- Kruttgen A, Schneider I, Weis J (2006). The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain Pathol* **16**: 304-310.
- Kumar V, Mahal BA (2012). NGF - the TrkA to successful pain treatment. *Journal of pain research* **5**: 279-287.
- Kuruvilla R, Zweifel LS, Glebova NO, Lonze BE, Valdez G, Ye H *et al* (2004). A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell* **118**: 243-255.
- Lacey JV, Jr., Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang SC, Leitzmann MF *et al* (2009). Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC cancer* **9**: 84.
- Lachance C, Belliveau DJ, Barker PA (1997). Blocking nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor on sympathetic neurons transiently reduces trkA activation but does not affect neuronal survival. *Neuroscience* **81**: 861-871.
- Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G (2006). p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-related cancer* **13**: 293-325.
- Lad SP, Peterson DA, Bradshaw RA, Neet KE (2003). Individual and combined effects of TrkA and p75NTR nerve growth factor receptors. A role for the high affinity receptor site. *The Journal of biological chemistry* **278**: 24808-24817.
- Ladjemi MZ, Jacot W, Chardes T, Pelegrin A, Navarro-Teulon I (2010). Anti-HER2 vaccines: new prospects for breast cancer therapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **59**: 1295-1312.
- Lae M, Freneaux P, Sastre-Garau X, Chouchane O, Sigal-Zafrani B, Vincent-Salomon A (2009). Secretory breast carcinomas with ETV6-NTRK3 fusion gene belong to the basal-like carcinoma spectrum. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **22**: 291-298.
- Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, Foveau B, Vanhecke E, Romon R *et al* (2009). TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* **28**: 1960-1970.

## BIBLIOGRAPHIE

- Lagadec C, Romon R, Tastet C, Meignan S, Com E, Page A *et al* (2010). Ku86 is important for TrkA overexpression-induced breast cancer cell invasion. *Proteomics Clinical applications* **4**: 580-590.
- Lai YL, Mau BL, Cheng WH, Chen HM, Chiu HH, Tzen CY (2008). PIK3CA exon 20 mutation is independently associated with a poor prognosis in breast cancer patients. *Annals of surgical oncology* **15**: 1064-1069.
- Lakhani SR, Collins N, Stratton MR, Sloane JP (1995). Atypical ductal hyperplasia of the breast: clonal proliferation with loss of heterozygosity on chromosomes 16q and 17p. *Journal of clinical pathology* **48**: 611-615.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* **66**: 967-979.
- Lanave C, Colangelo AM, Saccone C, Alberghina L (2007). Molecular evolution of the neurotrophin family members and their Trk receptors. *Gene* **394**: 1-12.
- Lane HA, Motoyama AB, Beuvink I, Hynes NE (2001). Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **12 Suppl 1**: S21-22.
- Lange CA, Yee D (2011). Killing the second messenger: targeting loss of cell cycle control in endocrine-resistant breast cancer. *Endocrine-related cancer* **18**: C19-24.
- Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van den Bossche J, Schouppe E, Mommer C *et al* (2011). Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *The International journal of developmental biology* **55**: 861-867.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J *et al* (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**: 645-648.
- Large TH, Weskamp G, Helder JC, Radeke MJ, Misko TP, Shooter EM *et al* (1989). Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system. *Neuron* **2**: 1123-1134.
- Lauring J, Park BH, Wolff AC (2013). The phosphoinositide-3-kinase-Akt-mTOR pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* **11**: 670-678.
- Le AP, Friedman WJ (2012). Matrix metalloproteinase-7 regulates cleavage of pro-nerve growth factor and is neuroprotective following kainic acid-induced seizures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**: 703-712.
- Lee EY, Muller WJ (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**: a003236.

## BIBLIOGRAPHIE

- Lee FS, Chao MV (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 3555-3560.
- Lee FS, Rajagopal R, Chao MV (2002a). Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine & growth factor reviews* **13**: 11-17.
- Lee FS, Rajagopal R, Kim AH, Chang PC, Chao MV (2002b). Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *The Journal of biological chemistry* **277**: 9096-9102.
- Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW *et al* (2005). PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* **24**: 1477-1480.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**: 1945-1948.
- Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Harris AL (2000). Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *The Journal of pathology* **190**: 430-436.
- Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y *et al* (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation* **121**: 2750-2767.
- Lemmon MA, Schlessinger J (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**: 1117-1134.
- Lerebours F, Lidereau R (2002). Molecular alterations in sporadic breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* **44**: 121-141.
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in neurobiology* **69**: 341-374.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *The Journal of experimental zoology* **116**: 321-361.
- Lewis CE, Pollard JW (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer research* **66**: 605-612.
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V *et al* (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research* **67**: 1030-1037.
- Li W, Shi L, You Y, Gong Y, Yin B, Yuan J *et al* (2010). Downstream of tyrosine kinase/docking protein 6, as a novel substrate of tropomyosin-related kinase C receptor, is involved in neurotrophin 3-mediated neurite outgrowth in mouse cortex neurons. *BMC biology* **8**: 86.

## BIBLIOGRAPHIE

- Li Y, Zhang T, Schwartz SJ, Sun D (2009). New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **12**: 17-27.
- Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA *et al* (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**: 1275-1281.
- Liedtke C, Kiesel L (2012). Breast cancer molecular subtypes--modern therapeutic concepts for targeted therapy of a heterogeneous entity. *Maturitas* **73**: 288-294.
- Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *The EMBO journal* **16**: 4999-5005.
- Light JE, Koyama H, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R *et al* (2012). Clinical significance of NTRK family gene expression in neuroblastomas. *Pediatric blood & cancer* **59**: 226-232.
- Lin BZ, Pilch PF, Kandror KV (1997). Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles. *The Journal of biological chemistry* **272**: 24145-24147.
- Lin DC, Quevedo C, Brewer NE, Bell A, Testa JR, Grimes ML *et al* (2006). APPL1 associates with TrkA and GIPC1 and is required for nerve growth factor-mediated signal transduction. *Molecular and cellular biology* **26**: 8928-8941.
- Lindeman GJ, Visvader JE (2010). Insights into the cell of origin in breast cancer and breast cancer stem cells. *Asia-Pacific journal of clinical oncology* **6**: 89-97.
- Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, Elmberger G, Skoog L, Lehtio J *et al* (2009). Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **20**: 1639-1646.
- Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R *et al* (2009a). Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer research* **69**: 6871-6878.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ (2009b). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews Drug discovery* **8**: 627-644.
- Liu PC, Liu X, Li Y, Covington M, Wynn R, Huber R *et al* (2006). Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer biology & therapy* **5**: 657-664.
- Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *The Journal of cell biology* **139**: 1861-1872.

## BIBLIOGRAPHIE

- Logue JS, Morrison DK (2012). Complexity in the signaling network: insights from the use of targeted inhibitors in cancer therapy. *Genes & development* **26**: 641-650.
- Louderbough JM, Schroeder JA (2011). Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Molecular cancer research : MCR* **9**: 1573-1586.
- Louie E, Chen XF, Coomes A, Ji K, Tsirka S, Chen EI (2013). Neurotrophin-3 modulates breast cancer cells and the microenvironment to promote the growth of breast cancer brain metastasis. *Oncogene* **32**: 4064-4077.
- Lozano-Ondoua AN, Symons-Liguori AM, Vanderah TW (2013). Cancer-induced bone pain: Mechanisms and models. *Neuroscience letters* **557 Pt A**: 52-59.
- Lu B, Pang PT, Woo NH (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nature reviews Neuroscience* **6**: 603-614.
- Lu QL, Liu J, Zhu XL, Xu WJ (2014). Expression of nerve growth factor and hypoxia inducible factor-1alpha and its correlation with angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban* **34**: 359-362.
- Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M (2001). Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *Journal of the National Cancer Institute* **93**: 1852-1857.
- Ma WY, Murata E, Ueda K, Kuroda Y, Cao MH, Abe M *et al* (2010). A synthetic cell-penetrating peptide antagonizing TrkA function suppresses neuropathic pain in mice. *Journal of pharmacological sciences* **114**: 79-84.
- MacDonald JI, Meakin SO (1996). Deletions in the extracellular domain of rat trkA lead to an altered differentiative phenotype in neurotrophin responsive cells. *Molecular and cellular neurosciences* **7**: 371-390.
- Macias H, Hinck L (2012). Mammary gland development. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* **1**: 533-557.
- Mackey J, Gelmon K, Martin M, McCarthy N, Pinter T, Rupin M *et al* (2009). TRIO-012: a multicenter, multinational, randomized, double-blind phase III study of IMC-1121B plus docetaxel versus placebo plus docetaxel in previously untreated patients with HER2-negative, unresectable, locally recurrent or metastatic breast cancer. *Clinical breast cancer* **9**: 258-261.
- Macrae M, Neve RM, Rodriguez-Viciano P, Haqq C, Yeh J, Chen C *et al* (2005). A conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2. *Cancer cell* **8**: 111-118.
- Magne N, Chargari C, Conforti R, Toillon RA, Bauduceau O, Vedrine L *et al* (2010). [Mechanisms of resistance to molecular targeted therapies in breast cancer: update and future]. *Bulletin du cancer* **97**: 385-395.

## BIBLIOGRAPHIE

- Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hempstead BL (1994). High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *The Journal of biological chemistry* **269**: 6884-6891.
- Mahdi KM, Nassiri MR, Nasiri K (2013). Hereditary genes and SNPs associated with breast cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **14**: 3403-3409.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM *et al* (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* **247**: 1446-1451.
- Maliartchouk S, Debeir T, Beglova N, Cuello AC, Gehring K, Saragovi HU (2000a). Genuine monovalent ligands of TrkA nerve growth factor receptors reveal a novel pharmacological mechanism of action. *The Journal of biological chemistry* **275**: 9946-9956.
- Maliartchouk S, Feng Y, Ivanisevic L, Debeir T, Cuello AC, Burgess K *et al* (2000b). A designed peptidomimetic agonistic ligand of TrkA nerve growth factor receptors. *Molecular pharmacology* **57**: 385-391.
- Mannello F (2013). Understanding breast cancer stem cell heterogeneity: time to move on to a new research paradigm. *BMC medicine* **11**: 169.
- Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer metastasis reviews* **32**: 303-315.
- Marcusson EG, Horazdovsky BF, Cereghino JL, Gharakhanian E, Emr SD (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* **77**: 579-586.
- Marone R, Cmiljanovic V, Giese B, Wymann MP (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochimica et biophysica acta* **1784**: 159-185.
- Marsh HN, Dubreuil CI, Quevedo C, Lee A, Majdan M, Walsh GS *et al* (2003). SHP-1 negatively regulates neuronal survival by functioning as a TrkA phosphatase. *The Journal of cell biology* **163**: 999-1010.
- Marshall CJ (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-185.
- Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* **319**: 743-748.
- Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T, Barbacid M (1989). Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Molecular and cellular biology* **9**: 24-33.
- Martin TA, Harrison G, Mansel RE, Jiang WG (2003). The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Critical reviews in oncology/hematology* **46**: 165-186.



## BIBLIOGRAPHIE

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

Matusica D, Skeldal S, Sykes AM, Palstra N, Sharma A, Coulson EJ (2013). An intracellular domain fragment of the p75 neurotrophin receptor (p75(NTR)) enhances tropomyosin receptor kinase A (TrkA) receptor function. *The Journal of biological chemistry* **288**: 11144-11154.

Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia-Closas M (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Molecular oncology* **4**: 174-191.

Mayer EL, Krop IE (2010). Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**: 3526-3532.

Mazella J, Zsuzger N, Navarro V, Chabry J, Kaghad M, Caput D *et al* (1998). The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry* **273**: 26273-26276.

Mazella J (2001). Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cellular signalling* **13**: 1-6.

Mazzoni IE, Said FA, Aloyz R, Miller FD, Kaplan D (1999). Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**: 9716-9727.

McCarthy C, Walker E (2014). Tropomyosin receptor kinase inhibitors: a patent update 2009 - 2013. *Expert opinion on therapeutic patents* **24**: 731-744.

McClatchey AI (2014). ERM proteins at a glance. *Journal of cell science* **127**: 3199-3204.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Franklin RA, Montalto G *et al* (2012). Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance. *Oncotarget* **3**: 1068-1111.

McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL (1991). New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* **354**: 411-414.

McKelvey L, Shorten GD, O'Keeffe GW (2013). Nerve growth factor-mediated regulation of pain signalling and proposed new intervention strategies in clinical pain management. *Journal of neurochemistry* **124**: 276-289.

Meakin SO, MacDonald JI, Gryz EA, Kubu CJ, Verdi JM (1999). The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA. A model for discriminating proliferation and differentiation. *The Journal of biological chemistry* **274**: 9861-9870.

## BIBLIOGRAPHIE

- Mercurio AM, Lipscomb EA, Bachelder RE (2005). Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **10**: 283-290.
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature reviews Cancer* **6**: 924-935.
- Mersin H, Yildirim E, Berberoglu U, Gulben K (2008). The prognostic importance of triple negative breast carcinoma. *Breast* **17**: 341-346.
- Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, Saini KS, Viale G, Loi S *et al* (2012). Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**: 1879-1887.
- Miao H, Li DQ, Mukherjee A, Guo H, Petty A, Cutter J *et al* (2009). EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer cell* **16**: 9-20.
- Miao H, Gale NW, Guo H, Qian J, Petty A, Kaspar J *et al* (2014). EphA2 promotes infiltrative invasion of glioma stem cells in vivo through cross-talk with Akt and regulates stem cell properties. *Oncogene*.
- Mijatovic T, Gailly P, Mathieu V, De Neve N, Yeaton P, Kiss R *et al* (2007). Neurotensin is a versatile modulator of in vitro human pancreatic ductal adenocarcinoma cell (PDAC) migration. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology* **29**: 315-326.
- Miknyoczki SJ, Chang H, Klein-Szanto A, Dionne CA, Ruggeri BA (1999). The Trk tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits significant antitumor efficacy in preclinical xenograft models of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **5**: 2205-2212.
- Miknyoczki SJ, Wan W, Chang H, Dobrzanski P, Ruggeri BA, Dionne CA *et al* (2002). The neurotrophin-trk receptor axes are critical for the growth and progression of human prostatic carcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts in nude mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**: 1924-1931.
- Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA *et al* (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* **357**: 2666-2676.
- Miranda C, Greco A, Miele C, Pierotti MA, Van Obberghen E (2001). IRS-1 and IRS-2 are recruited by TrkA receptor and oncogenic TRK-T1. *Journal of cellular physiology* **186**: 35-46.
- Mitra G (1991). Mutational analysis of conserved residues in the tyrosine kinase domain of the human trk oncogene. *Oncogene* **6**: 2237-2241.
- Mitra S, Stemke-Hale K, Mills GB, Claerhout S (2012). Interactions between tumor cells and microenvironment in breast cancer: a new opportunity for targeted therapy. *Cancer science* **103**: 400-407.

## BIBLIOGRAPHIE

Moasser MM (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* **26**: 6469-6487.

Modi S, Stopeck A, Linden H, Solit D, Chandarlapaty S, Rosen N *et al* (2011). HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**: 5132-5139.

Mohamed A, Krajewski K, Cakar B, Ma CX (2013). Targeted therapy for breast cancer. *The American journal of pathology* **183**: 1096-1112.

Mohd Sharial MS, Crown J, Hennessy BT (2012). Overcoming resistance and restoring sensitivity to HER2-targeted therapies in breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23**: 3007-3016.

Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J (2001). Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer research* **61**: 4744-4749.

Molloy NH, Read DE, Gorman AM (2011). Nerve growth factor in cancer cell death and survival. *Cancers* **3**: 510-530.

Monshipouri M, Jiang H, Lazarovici P (2000). NGF stimulation of erk phosphorylation is impaired by a point mutation in the transmembrane domain of trkA receptor. *Journal of molecular neuroscience : MN* **14**: 69-76.

Moore KM, Thomas GJ, Duffy SW, Warwick J, Gabe R, Chou P *et al* (2014). Therapeutic Targeting of Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **106**.

Moreno-Aspitia A (2010). Clinical overview of sorafenib in breast cancer. *Future Oncol* **6**: 655-663.

Moriki T, Maruyama H, Maruyama IN (2001). Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *Journal of molecular biology* **311**: 1011-1026.

Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL (2001). Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer research* **61**: 8887-8895.

Mouri A, Nomoto H, Furukawa S (2007). Processing of nerve growth factor: the role of basic amino acid clusters in the pro-region. *Biochemical and biophysical research communications* **353**: 1056-1062.

Moy B, Kirkpatrick P, Kar S, Goss P (2007). Lapatinib. *Nature reviews Drug discovery* **6**: 431-432.

## BIBLIOGRAPHIE

- Mueller MM, Fusenig NE (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews Cancer* **4**: 839-849.
- Mueller SC, Gherzi G, Akiyama SK, Sang QX, Howard L, Pineiro-Sanchez M *et al* (1999). A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *The Journal of biological chemistry* **274**: 24947-24952.
- Mukhopadhyay UK, Mooney P, Jia L, Eves R, Raptis L, Mak AS (2010). Doubles game: Src-Stat3 versus p53-PTEN in cellular migration and invasion. *Molecular and cellular biology* **30**: 4980-4995.
- Munck Petersen C, Nielsen MS, Jacobsen C, Tauris J, Jacobsen L, Gliemann J *et al* (1999). Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *The EMBO journal* **18**: 595-604.
- Murphy DA, Courtneidge SA (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 413-426.
- Murray SS, Perez P, Lee R, Hempstead BL, Chao MV (2004). A novel p75 neurotrophin receptor-related protein, NRH2, regulates nerve growth factor binding to the TrkA receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 2742-2749.
- Muthuswamy SK (2011). Trastuzumab resistance: all roads lead to SRC. *Nature medicine* **17**: 416-418.
- Naderi A, Teschendorff AE, Barbosa-Morais NL, Pinder SE, Green AR, Powe DG *et al* (2007). A gene-expression signature to predict survival in breast cancer across independent data sets. *Oncogene* **26**: 1507-1516.
- Naderi A, Hughes-Davies L (2009). Nerve growth factor/nuclear factor-kappaB pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* **135**: 211-216.
- Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA *et al* (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer cell* **6**: 117-127.
- Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J *et al* (2005). Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer research* **65**: 473-482.
- Nahta R, Esteva FJ (2006). Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer letters* **232**: 123-138.
- Nahta R, Esteva FJ (2007). Trastuzumab: triumphs and tribulations. *Oncogene* **26**: 3637-3643.

## BIBLIOGRAPHIE

- Nahta R, O'Regan RM (2010). Evolving strategies for overcoming resistance to HER2-directed therapy: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Clinical breast cancer* **10 Suppl 3**: S72-78.
- Nakagawara A, Brodeur GM (1997). Role of neurotrophins and their receptors in human neuroblastomas: a primary culture study. *Eur J Cancer* **33**: 2050-2053.
- Narayan M, Wilken JA, Harris LN, Baron AT, Kimbler KD, Maihle NJ (2009). Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells. *Cancer research* **69**: 2191-2194.
- Negrini S, D'Alessandro R, Meldolesi J (2013). NGF signaling in PC12 cells: the cooperation of p75(NTR) with TrkA is needed for the activation of both mTORC2 and the PI3K signalling cascade. *Biology open* **2**: 855-866.
- Ng YP, Cheung ZH, Ip NY (2006). STAT3 as a downstream mediator of Trk signaling and functions. *The Journal of biological chemistry* **281**: 15636-15644.
- Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D *et al* (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *The EMBO journal* **20**: 2180-2190.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z *et al* (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 5367-5374.
- Nkondjock A, Ghadirian P (2005). [Risk factors and risk reduction of breast cancer]. *Medecine sciences : M/S* **21**: 175-180.
- Normanno N, Morabito A, De Luca A, Piccirillo MC, Gallo M, Maiello MR *et al* (2009). Target-based therapies in breast cancer: current status and future perspectives. *Endocrine-related cancer* **16**: 675-702.
- Nowell PC (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**: 23-28.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS *et al* (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**: 843-848.
- Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM (2005). p75NTR--live or let die. *Current opinion in neurobiology* **15**: 49-57.
- Nykjaer A, Willnow TE (2012). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in neurosciences* **35**: 261-270.
- Oakman C, Viale G, Di Leo A (2010). Management of triple negative breast cancer. *Breast* **19**: 312-321.
- Obeid E, Nanda R, Fu YX, Olopade OI (2013). The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *International journal of oncology* **43**: 5-12.

## BIBLIOGRAPHIE

- Obermeier A, Halfter H, Wiesmuller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A (1993a). Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *The EMBO journal* **12**: 933-941.
- Obermeier A, Lammers R, Wiesmuller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A (1993b). Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *The Journal of biological chemistry* **268**: 22963-22966.
- Obermeier A, Bradshaw RA, Seedorf K, Choidas A, Schlessinger J, Ullrich A (1994). Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *The EMBO journal* **13**: 1585-1590.
- Odegaard E, Staff AC, Abeler VM, Kopolovic J, Onsrud M, Lazarovici P *et al* (2007). The activated nerve growth factor receptor p-TrkA is selectively expressed in advanced-stage ovarian carcinoma. *Human pathology* **38**: 140-146.
- Oesterreich S, Fuqua SA (1999). Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocrine-related cancer* **6**: 405-419.
- Ohmichi M, Decker SJ, Saltiel AR (1992). Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by nerve growth factor involves indirect coupling of the trk proto-oncogene with src homology 2 domains. *Neuron* **9**: 769-777.
- Ohr T, Mancini A, Tamura T, Niedenthal R (2004). c-Cbl binds to tyrosine-phosphorylated neurotrophin receptor p75 and induces its ubiquitination. *Cellular signalling* **16**: 1291-1298.
- Okada Y, Eibl G, Guha S, Duffy JP, Reber HA, Hines OJ (2004). Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells. *Clinical & experimental metastasis* **21**: 285-292.
- Olson EM (2012). Maximizing human epidermal growth factor receptor 2 inhibition: a new oncologic paradigm in the era of targeted therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**: 1712-1714.
- Ong SH, Guy GR, Hadari YR, Laks S, Gotoh N, Schlessinger J *et al* (2000). FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Molecular and cellular biology* **20**: 979-989.
- Orian-Rousseau V, Morrison H, Matzke A, Kastilan T, Pace G, Herrlich P *et al* (2007). Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin. *Molecular biology of the cell* **18**: 76-83.
- Orian-Rousseau V, Ponta H (2008). Adhesion proteins meet receptors: a common theme? *Advances in cancer research* **101**: 63-92.
- Orian-Rousseau V (2010). CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur J Cancer* **46**: 1271-1277.

## BIBLIOGRAPHIE

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

Orimo A, Weinberg RA (2006). Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* **5**: 1597-1601.

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

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

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M *et al* (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England journal of medicine* **351**: 2817-2826.

Palyi-Krekk Z, Barok M, Isola J, Tammi M, Szollosi J, Nagy P (2007). Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur J Cancer* **43**: 2423-2433.

Pandey PR, Saidou J, Watabe K (2010). Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. *Front Biosci (Landmark Ed)* **15**: 226-236.

Pang WW, Hartmann PE (2007). Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **12**: 211-221.

Paoletti F, Covaceuszach S, Konarev PV, Gonfloni S, Malerba F, Schwarz E *et al* (2009). Intrinsic structural disorder of mouse proNGF. *Proteins* **75**: 990-1009.

Paoletti F, Malerba F, Kelly G, Noinville S, Lamba D, Cattaneo A *et al* (2011). Conformational plasticity of proNGF. *PloS one* **6**: e22615.

Papatsoris AG, Liolitsa D, Deliveliotis C (2007). Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert opinion on investigational drugs* **16**: 303-309.

Parkhurst CN, Zampieri N, Chao MV (2010). Nuclear localization of the p75 neurotrophin receptor intracellular domain. *The Journal of biological chemistry* **285**: 5361-5368.

Paulson AK, Linklater ES, Berghuis BD, App CA, Oostendorp LD, Paulson JE *et al* (2013). MET and ERBB2 are coexpressed in ERBB2+ breast cancer and contribute to innate resistance. *Molecular cancer research : MCR* **11**: 1112-1121.

Pawson T, Gish GD, Nash P (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends in cell biology* **11**: 504-511.

Pazyra-Murphy MF, Hans A, Courchesne SL, Karch C, Cosker KE, Heerssen HM *et al* (2009). A retrograde neuronal survival response: target-derived neurotrophins regulate MEF2D and bcl-w. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**: 6700-6709.

## BIBLIOGRAPHIE

- Pedersen K, Angelini PD, Laos S, Bach-Faig A, Cunningham MP, Ferrer-Ramon C *et al* (2009). A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis. *Molecular and cellular biology* **29**: 3319-3331.
- Peiro G, Ortiz-Martinez F, Gallardo A, Perez-Balaguer A, Sanchez-Paya J, Ponce JJ *et al* (2014). Src, a potential target for overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast carcinoma. *British journal of cancer*.
- Peng X, Greene LA, Kaplan DR, Stephens RM (1995). Deletion of a conserved juxtamembrane sequence in Trk abolishes NGF-promoted neuritogenesis. *Neuron* **15**: 395-406.
- Perez-Pinera P, Hernandez T, Garcia-Suarez O, de Carlos F, Germana A, Del Valle M *et al* (2007). The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Molecular and cellular biochemistry* **295**: 19-26.
- Perez A, Neskey DM, Wen J, Pereira L, Reategui EP, Goodwin WJ *et al* (2013). CD44 interacts with EGFR and promotes head and neck squamous cell carcinoma initiation and progression. *Oral oncology* **49**: 306-313.
- Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Davidson NE, Geyer CE, Jr. *et al* (2011). Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**: 3366-3373.
- Perez P, Coll PM, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV (1995). NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Molecular and cellular neurosciences* **6**: 97-105.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA *et al* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**: 747-752.
- Perou CM (2011). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *The oncologist* **16 Suppl 1**: 61-70.
- Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH *et al* (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *The Journal of biological chemistry* **272**: 3599-3605.
- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I *et al* (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine* **353**: 1659-1672.
- Pillay V, Allaf L, Wilding AL, Donoghue JF, Court NW, Greenall SA *et al* (2009). The plasticity of oncogene addiction: implications for targeted therapies directed to receptor tyrosine kinases. *Neoplasia* **11**: 448-458, 442 p following 458.



## BIBLIOGRAPHIE

Pimenta AC, Dourado DF, Martins JM, Melo A, Dias Soeiro Cordeiro MN, Almeida RD *et al* (2014). Dynamic Structure of NGF and proNGF Complexed with p75NTR: Pro-Peptide Effect. *Journal of chemical information and modeling*.

Pivot X, Schneeweiss A, Verma S, Thomssen C, Passos-Coelho JL, Benedetti G *et al* (2011). Efficacy and safety of bevacizumab in combination with docetaxel for the first-line treatment of elderly patients with locally recurrent or metastatic breast cancer: results from AVADO. *Eur J Cancer* **47**: 2387-2395.

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

Podlesniy P, Kichev A, Pedraza C, Saurat J, Encinas M, Perez B *et al* (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. *The American journal of pathology* **169**: 119-131.

Podo F, Buydens LM, Degani H, Hilhorst R, Klipp E, Gribbestad IS *et al* (2010). Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Molecular oncology* **4**: 209-229.

Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R (2009). Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**: 7479-7491.

Pollard JW (2008). Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *Journal of leukocyte biology* **84**: 623-630.

Polyak K (2007). Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of clinical investigation* **117**: 3155-3163.

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

Ponta H, Wainwright D, Herrlich P (1998). The CD44 protein family. *The international journal of biochemistry & cell biology* **30**: 299-305.

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

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI *et al* (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* **12**: R68.

Quistgaard EM, Madsen P, Groftehaug MK, Nissen P, Petersen CM, Thirup SS (2009). Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nature structural & molecular biology* **16**: 96-98.

## BIBLIOGRAPHIE

- Rabbani SA, Mazar AP (2007). Evaluating distant metastases in breast cancer: from biology to outcomes. *Cancer metastasis reviews* **26**: 663-674.
- Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM (1987). Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* **325**: 593-597.
- Rajagopal R, Chen ZY, Lee FS, Chao MV (2004). Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 6650-6658.
- Rajagopal R, Chao MV (2006). A role for Fyn in Trk receptor transactivation by G-protein-coupled receptor signaling. *Molecular and cellular neurosciences* **33**: 36-46.
- Rakha EA, Abd El Rehim D, Pinder SE, Lewis SA, Ellis IO (2005). E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathology* **46**: 685-693.
- Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V *et al* (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast cancer research : BCR* **12**: 207.
- Rapisarda A, Melillo G (2012). Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy. *Advances in cancer research* **114**: 237-267.
- Rattenholl A, Lilie H, Grossmann A, Stern A, Schwarz E, Rudolph R (2001a). The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from Escherichia coli inclusion bodies. *European journal of biochemistry / FEBS* **268**: 3296-3303.
- Rattenholl A, Ruoppolo M, Flagiello A, Monti M, Vinci F, Marino G *et al* (2001b). Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *Journal of molecular biology* **305**: 523-533.
- Ratushny V, Astsaturov I, Burtness BA, Golemis EA, Silverman JS (2009). Targeting EGFR resistance networks in head and neck cancer. *Cellular signalling* **21**: 1255-1268.
- Razis E, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Kalofonos HP, Pavlakis K *et al* (2011). Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **128**: 447-456.
- Reichardt LF (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **361**: 1545-1564.
- Reis-Filho JS, Tutt AN (2008). Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* **52**: 108-118.
- Reis LO, Dias FG, Castro MA, Ferreira U (2011). Male breast cancer. *The aging male : the official journal of the International Society for the Study of the Aging Male* **14**: 99-109.

## BIBLIOGRAPHIE

- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**: 105-111.
- Rhodes N, Heerding DA, Duckett DR, Eberwein DJ, Knick VB, Lansing TJ *et al* (2008). Characterization of an Akt kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity. *Cancer research* **68**: 2366-2374.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C *et al* (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**: 111-115.
- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD (1999). Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* **286**: 2358-2361.
- Robert NJ, Dieras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON *et al* (2011). RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**: 1252-1260.
- Robinson KN, Manto K, Buchsbaum RJ, MacDonald JI, Meakin SO (2005). Neurotrophin-dependent tyrosine phosphorylation of Ras guanine-releasing factor 1 and associated neurite outgrowth is dependent on the HIKE domain of TrkA. *The Journal of biological chemistry* **280**: 225-235.
- Rocca A, Farolfi A, Bravaccini S, Schirone A, Amadori D (2014). Palbociclib (PD 0332991) : targeting the cell cycle machinery in breast cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy* **15**: 407-420.
- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* **4**: 487-492.
- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Gotz R, Barde YA (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *The EMBO journal* **11**: 917-922.
- Rogers ML, Bailey S, Matusica D, Nicholson I, Muyderman H, Pagadala PC *et al* (2010). ProNGF mediates death of Natural Killer cells through activation of the p75NTR-sortilin complex. *Journal of neuroimmunology* **226**: 93-103.
- Romon R, Adriaenssens E, Lagadec C, Germain E, Hondermarck H, Le Bourhis X (2010). Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. *Molecular cancer* **9**: 157.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE *et al* (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine* **353**: 1673-1684.

## BIBLIOGRAPHIE

- Rong R, Ahn JY, Chen P, Suh PG, Ye K (2003). Phospholipase activity of phospholipase C-gamma1 is required for nerve growth factor-regulated MAP kinase signaling cascade in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry* **278**: 52497-52503.
- Rosario M, Franke R, Bednarski C, Birchmeier W (2007). The neurite outgrowth multiadaptor RhoGAP, NOMA-GAP, regulates neurite extension through SHP2 and Cdc42. *The Journal of cell biology* **178**: 503-516.
- Rose DP, Vona-Davis L (2014). Biochemical and molecular mechanisms for the association between obesity, chronic inflammation, and breast cancer. *Biofactors* **40**: 1-12.
- Roselli S, Wallez Y, Wang L, Vervoort V, Pasquale EB (2010). The SH2 domain protein Shep1 regulates the in vivo signaling function of the scaffolding protein Cas. *Cellular signalling* **22**: 1745-1752.
- Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Lewis M, Shih A, Laramée GR *et al* (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* **4**: 767-773.
- Ross AH (1991). Identification of tyrosine kinase Trk as a nerve growth factor receptor. *Cell regulation* **2**: 685-690.
- Ross JS, Fletcher JA (1998). The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *The oncologist* **3**: 237-252.
- Roux PP, Barker PA (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in neurobiology* **67**: 203-233.
- Roy PG, Thompson AM (2006). Cyclin D1 and breast cancer. *Breast* **15**: 718-727.
- Roy R, Chun J, Powell SN (2012). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature reviews Cancer* **12**: 68-78.
- Ruggeri P, Farina AR, Di Ianni N, Cappabianca L, Ragone M, Ianni G *et al* (2014). The TrkAIII oncoprotein inhibits mitochondrial free radical ROS-induced death of SH-SY5Y neuroblastoma cells by augmenting SOD2 expression and activity at the mitochondria, within the context of a tumour stem cell-like phenotype. *PloS one* **9**: e94568.
- Ryden M, Hempstead B, Ibanez CF (1997). Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor. *The Journal of biological chemistry* **272**: 16322-16328.
- Saez R, Molina MA, Ramsey EE, Rojo F, Keenan EJ, Albanell J *et al* (2006). p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2-positive breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**: 424-431.
- Sakamoto Y, Kitajima Y, Edakuni G, Sasatomi E, Mori M, Kitahara K *et al* (2001). Expression of Trk tyrosine kinase receptor is a biologic marker for cell proliferation and perineural invasion of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncology reports* **8**: 477-484.

## BIBLIOGRAPHIE

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S *et al* (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**: 554.

Sanchez-Bailon MP, Calcabrini A, Gomez-Dominguez D, Morte B, Martin-Forero E, Gomez-Lopez G *et al* (2012). Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cellular signalling* **24**: 1276-1286.

Sasich LD, Sukkari SR (2012). The US FDA's withdrawal of the breast cancer indication for Avastin (bevacizumab). *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* **20**: 381-385.

Scaltriti M, Rojo F, Ocana A, Anido J, Guzman M, Cortes J *et al* (2007). Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **99**: 628-638.

Scaltriti M, Chandarlapaty S, Prudkin L, Aura C, Jimenez J, Angelini PD *et al* (2010). Clinical benefit of lapatinib-based therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast tumors coexpressing the truncated p95HER2 receptor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**: 2688-2695.

Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK (2004). Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 331S-336S.

Schiller MR (2006). Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases--GEFs what's the link. *Cellular signalling* **18**: 1834-1843.

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

Schlessinger J, Lemmon MA (2003). SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2003**: RE12.

Schneider R, Schweiger M (1991). A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene* **6**: 1807-1811.

Seaborn T, Ravni A, Au R, Chow BK, Fournier A, Wurtz O *et al* (2014). Induction of serpinb1a by PACAP or NGF is required for PC12 cells survival after serum withdrawal. *Journal of neurochemistry*.

Segal RA, Greenberg ME (1996). Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annual review of neuroscience* **19**: 463-489.

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

## BIBLIOGRAPHIE

- Serup Andersen O, Boisguerin P, Glerup S, Skeldal S, Volkmer R, Willnow TE *et al* (2010). Identification of a linear epitope in sortilin that partakes in pro-neurotrophin binding. *The Journal of biological chemistry* **285**: 12210-12222.
- Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* **138**: 822-829.
- Shastry M, Yardley DA (2013). Updates in the treatment of basal/triple-negative breast cancer. *Current opinion in obstetrics & gynecology* **25**: 40-48.
- Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL, 3rd, Sweeney C (2008). Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer research* **68**: 1471-1477.
- Shen J, Maruyama IN (2011). Nerve growth factor receptor TrkA exists as a preformed, yet inactive, dimer in living cells. *FEBS letters* **585**: 295-299.
- Sheng M, Sala C (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annual review of neuroscience* **24**: 1-29.
- Shi GX, Jin L, Andres DA (2010). Src-dependent TrkA transactivation is required for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38-mediated Rit activation and neuronal differentiation. *Molecular biology of the cell* **21**: 1597-1608.
- Shi L, Yue J, You Y, Yin B, Gong Y, Xu C *et al* (2006). Dok5 is substrate of TrkB and TrkC receptors and involved in neurotrophin induced MAPK activation. *Cellular signalling* **18**: 1995-2003.
- Shi Y, Mantuano E, Inoue G, Campana WM, Gonias SL (2009). Ligand binding to LRP1 transactivates Trk receptors by a Src family kinase-dependent pathway. *Science signaling* **2**: ra18.
- Shintani T, Noda M (2008). Protein tyrosine phosphatase receptor type Z dephosphorylates TrkA receptors and attenuates NGF-dependent neurite outgrowth of PC12 cells. *Journal of biochemistry* **144**: 259-266.
- Shipitsin M, Polyak K (2008). The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **88**: 459-463.
- Shonukan O, Bagayogo I, McCrea P, Chao M, Hempstead B (2003). Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin. *Oncogene* **22**: 3616-3623.
- Shooter EM (2001). Early days of the nerve growth factor proteins. *Annual review of neuroscience* **24**: 601-629.
- Singer WD, Brown HA, Sternweis PC (1997). Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annual review of biochemistry* **66**: 475-509.

## BIBLIOGRAPHIE

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T *et al* (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**: 396-401.

Sinn HP, Kreipe H (2013). A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)* **8**: 149-154.

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 : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **33**: 614-625.

Skeldal S, Sykes AM, Glerup S, Matusica D, Palstra N, Autio H *et al* (2012). Mapping of the interaction site between sortilin and the p75 neurotrophin receptor reveals a regulatory role for the sortilin intracellular domain in p75 neurotrophin receptor shedding and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **287**: 43798-43809.

Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M *et al* (2011). Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine* **365**: 1273-1283.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**: 177-182.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A *et al* (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine* **344**: 783-792.

Sobottka B, Reinhardt D, Brockhaus M, Jacobsen H, Metzger F (2008). ProNGF inhibits NGF-mediated TrkA activation in PC12 cells. *Journal of neurochemistry* **107**: 1294-1303.

Sole C, Dolcet X, Segura MF, Gutierrez H, Diaz-Meco MT, Gozzelino R *et al* (2004). The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kapp B signaling. *The Journal of cell biology* **167**: 479-492.

Song D, Cui M, Zhao G, Fan Z, Nolan K, Yang Y *et al* (2014). Pathway-based analysis of breast cancer. *American journal of translational research* **6**: 302-311.

Soria G, Ben-Baruch A (2008). The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer letters* **267**: 271-285.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H *et al* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 10869-10874.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A *et al* (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 8418-8423.

## BIBLIOGRAPHIE

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

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A *et al* (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 10393-10398.

Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J *et al* (2006). Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *Journal of the National Cancer Institute* **98**: 262-272.

Sotiriou C, Pusztai L (2009). Gene-expression signatures in breast cancer. *The New England journal of medicine* **360**: 790-800.

Sparano JA, Paik S (2008). Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**: 721-728.

Sparano JA, Moulder S, Kazi A, Coppola D, Negassa A, Vahdat L *et al* (2009). Phase II trial of tipifarnib plus neoadjuvant doxorubicin-cyclophosphamide in patients with clinical stage IIB-IIIC breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**: 2942-2948.

Spector NL, Blackwell KL (2009). Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 5838-5847.

Srinivasan B, Roque CH, Hempstead BL, Al-Ubaidi MR, Roque RS (2004). Microglia-derived pronerve growth factor promotes photoreceptor cell death via p75 neurotrophin receptor. *The Journal of biological chemistry* **279**: 41839-41845.

Stein RC (2001). Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment. *Endocrine-related cancer* **8**: 237-248.

Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M *et al* (2008). An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer research* **68**: 6084-6091.

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

Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA, Kaplan DR (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* **12**: 691-705.



## BIBLIOGRAPHIE

- Sternlicht MD (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast cancer research : BCR* **8**: 201.
- Stoica G, Lungu G, Kim HT, Wong PK (2008). Up-regulation of pro-nerve growth factor, neurotrophin receptor p75, and sortilin is associated with retrovirus-induced spongiform encephalomyelopathy. *Brain research* **1208**: 204-216.
- Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R *et al* (2007). Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* **318**: 287-290.
- Sugiyama N, Gucciardo E, Lehti K (2013a). EphA2 bears plasticity to tumor invasion. *Cell Cycle* **12**: 2927-2928.
- Sugiyama N, Gucciardo E, Tatti O, Varjosalo M, Hyytiainen M, Gstaiger M *et al* (2013b). EphA2 cleavage by MT1-MMP triggers single cancer cell invasion via homotypic cell repulsion. *The Journal of cell biology* **201**: 467-484.
- Suo D, Park J, Harrington AW, Zweifel LS, Mihalas S, Deppmann CD (2014). Coronin-1 is a neurotrophin endosomal effector that is required for developmental competition for survival. *Nature neuroscience* **17**: 36-45.
- Suter U, Heymach JV, Jr., Shooter EM (1991). Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *The EMBO journal* **10**: 2395-2400.
- Suzuki R, Atherton AJ, O'Hare MJ, Entwistle A, Lakhani SR, Clarke C (2000). Proliferation and differentiation in the human breast during pregnancy. *Differentiation; research in biological diversity* **66**: 106-115.
- Swain SM, Kim SB, Cortes J, Ro J, Semiglazov V, Campone M *et al* (2013). Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *The lancet oncology* **14**: 461-471.
- Sykes AM, Palstra N, Abankwa D, Hill JM, Skeldal S, Matusica D *et al* (2012). The effects of transmembrane sequence and dimerization on cleavage of the p75 neurotrophin receptor by gamma-secretase. *The Journal of biological chemistry* **287**: 43810-43824.
- Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Desantis G, Tessitore A, Vetuschchi A *et al* (2004). TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer cell* **6**: 347-360.
- Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Gulino A, Mackay AR (2005). TrkAIII. A novel hypoxia-regulated alternative TrkA splice variant of potential physiological and pathological importance. *Cell Cycle* **4**: 8-9.
- Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Cea G, Panella S, Chioda A *et al* (2007). TrkAIII expression in the thymus. *Journal of neuroimmunology* **183**: 151-161.

## BIBLIOGRAPHIE

- Tagliabue E, Castiglioni F, Ghirelli C, Modugno M, Asnaghi L, Somenzi G *et al* (2000). Nerve growth factor cooperates with p185(HER2) in activating growth of human breast carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* **275**: 5388-5394.
- Takahashi Y, Shimokawa N, Esmaeili-Mahani S, Morita A, Masuda H, Iwasaki T *et al* (2011). Ligand-induced downregulation of TrkA is partly regulated through ubiquitination by Cbl. *FEBS letters* **585**: 1741-1747.
- Tang Y, Olufemi L, Wang MT, Nie D (2008). Role of Rho GTPases in breast cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**: 759-776.
- Tao RH, Maruyama IN (2008). All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. *Journal of cell science* **121**: 3207-3217.
- Tapia V, Gabler F, Munoz M, Yazigi R, Paredes A, Selman A *et al* (2011). Tyrosine kinase A receptor (trkA): a potential marker in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology* **121**: 13-23.
- Tatematsu T, Sasaki H, Shimizu S, Okuda K, Shitara M, Hikosaka Y *et al* (2014). Investigation of neurotrophic tyrosine kinase receptor 1 fusions and neurotrophic tyrosine kinase receptor family expression in non-small-cell lung cancer and sensitivity to AZD7451. *Molecular and clinical oncology* **2**: 725-730.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD *et al* (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**: 5455-5463.
- Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL (2010). Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Developmental neurobiology* **70**: 350-359.
- They JC, Spano JP, Azria D, Raymond E, Penault Llorca F (2014). Resistance to human epidermal growth factor receptor type 2-targeted therapies. *Eur J Cancer* **50**: 892-901.
- Thomas SM, DeMarco M, D'Arcangelo G, Halegoua S, Brugge JS (1992). Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell* **68**: 1031-1040.
- Thompson D, Easton D (2001). Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *American journal of human genetics* **68**: 410-419.
- Thompson D, Easton D (2004). The genetic epidemiology of breast cancer genes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **9**: 221-236.
- Thress K, Macintyre T, Wang H, Whitston D, Liu ZY, Hoffmann E *et al* (2009). Identification and preclinical characterization of AZ-23, a novel, selective, and orally bioavailable inhibitor of the Trk kinase pathway. *Molecular cancer therapeutics* **8**: 1818-1827.

## BIBLIOGRAPHIE

- Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D, Roskelley CD, Melnyk N, Mathers JA *et al* (2002). Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer cell* **2**: 367-376.
- Tognon CE, Somasiri AM, Evdokimova VE, Trigo G, Uy EE, Melnyk N *et al* (2011). ETV6-NTRK3-mediated breast epithelial cell transformation is blocked by targeting the IGF1R signaling pathway. *Cancer research* **71**: 1060-1070.
- Toillon RA, Lagadec C, Page A, Chopin V, Sautiere PE, Ricort JM *et al* (2007). Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**: 1239-1247.
- Tomellini E, Lagadec C, Polakowska R, Le Bourhis X (2014). Role of p75 neurotrophin receptor in stem cell biology: more than just a marker. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **71**: 2467-2481.
- Toole BP, Slomiany MG (2008). Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **11**: 110-121.
- Tran B, Bedard PL (2011). Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast cancer research : BCR* **13**: 221.
- Trimboli AJ, Cantemir-Stone CZ, Li F, Wallace JA, Merchant A, Creasap N *et al* (2009). Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. *Nature* **461**: 1084-1091.
- Troppmair J, Bruder JT, App H, Cai H, Liptak L, Szeberenyi J *et al* (1992). Ras controls coupling of growth factor receptors and protein kinase C in the membrane to Raf-1 and B-Raf protein serine kinases in the cytosol. *Oncogene* **7**: 1867-1873.
- Truzzi F, Marconi A, Lotti R, Dallaglio K, French LE, Hempstead BL *et al* (2008). Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *The Journal of investigative dermatology* **128**: 2031-2040.
- Tsukita S, Yonemura S (1997). ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends in biochemical sciences* **22**: 53-58.
- Twiss JL, Wada HG, Fok KS, Chan SD, Verity AN, Baxter GT *et al* (1998). Duration and magnitude of nerve growth factor signaling depend on the ratio of p75LNTR to TrkA. *Journal of neuroscience research* **51**: 442-453.
- Ullrich A, Schlessinger J (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212.
- 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. *Molecular and cellular neurosciences* **37**: 346-358.

## BIBLIOGRAPHIE

- Uren RT, Turbic A, Wong AW, Klein R, Murray SS, Turnley AM (2014). A novel role of suppressor of cytokine signaling-2 in the regulation of TrkA neurotrophin receptor biology. *Journal of neurochemistry* **129**: 614-627.
- Uren RT, Turnley AM (2014). Regulation of neurotrophin receptor (Trk) signaling: suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) is a new player. *Frontiers in molecular neuroscience* **7**: 39.
- Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Shelton DL, Parada LF, Presta LG (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *The EMBO journal* **14**: 2795-2805.
- Urrea S, Escudero CA, Ramos P, Lisbona F, Allende E, Covarrubias P *et al* (2007). TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal gamma-secretase-mediated release of the p75 intracellular domain. *The Journal of biological chemistry* **282**: 7606-7615.
- Urzua U, Tapia V, Geraldo MP, Selman A, Vega M, Romero C (2012). Nerve growth factor stimulates cellular proliferation of human epithelial ovarian cancer. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **44**: 656-661.
- Vaegter CB, Jansen P, Fjorback AW, Glerup S, Skeldal S, Kjolby M *et al* (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nature neuroscience* **14**: 54-61.
- Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D *et al* (2013). Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nature medicine* **19**: 1469-1472.
- Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M (2007). Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **18**: 977-984.
- Valdez G, Akmentin W, Philippidou P, Kuruvilla R, Ginty DD, Halegoua S (2005). Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**: 5236-5247.
- Valdez G, Philippidou P, Rosenbaum J, Akmentin W, Shao Y, Halegoua S (2007). Trk-signaling endosomes are generated by Rac-dependent macroendocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 12270-12275.
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M *et al* (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**: 530-536.
- van der Geer P, Pawson T (1995). The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends in biochemical sciences* **20**: 277-280.
- Van Kanegan MJ, Strack S (2009). The protein phosphatase 2A regulatory subunits B'beta and B'delta mediate sustained TrkA neurotrophin receptor autophosphorylation and neuronal differentiation. *Molecular and cellular biology* **29**: 662-674.

## BIBLIOGRAPHIE

- Vandermoere F, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Lemoine J, Hondermarck H (2005). The antiapoptotic effect of fibroblast growth factor-2 is mediated through nuclear factor-kappaB activation induced via interaction between Akt and IkappaB kinase-beta in breast cancer cells. *Oncogene* **24**: 5482-5491.
- Vanhecke E, Adriaenssens E, Verbeke S, Meignan S, Germain E, Berteaux N *et al* (2011). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**: 1741-1752.
- Vargo-Gogola T, Rosen JM (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature reviews Cancer* **7**: 659-672.
- Varsano T, Dong MQ, Niesman I, Gacula H, Lou X, Ma T *et al* (2006). GIPC is recruited by APPL to peripheral TrkA endosomes and regulates TrkA trafficking and signaling. *Molecular and cellular biology* **26**: 8942-8952.
- Vaught D, Brantley-Sieders DM, Chen J (2008). Eph receptors in breast cancer: roles in tumor promotion and tumor suppression. *Breast cancer research : BCR* **10**: 217.
- Venkitaraman AR (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**: 171-182.
- Verbeke S, Meignan S, Lagadec C, Germain E, Hondermarck H, Adriaenssens E *et al* (2010). Overexpression of p75(NTR) increases survival of breast cancer cells through p21(waf1). *Cellular signalling* **22**: 1864-1873.
- Verbeke S, Tomellini E, Dhamani F, Meignan S, Adriaenssens E, Xuefen le B (2013). Extracellular cleavage of the p75 neurotrophin receptor is implicated in its pro-survival effect in breast cancer cells. *FEBS letters* **587**: 2591-2596.
- Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J *et al* (2012). Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine* **367**: 1783-1791.
- Vetter ML, Martin-Zanca D, Parada LF, Bishop JM, Kaplan DR (1991). Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 5650-5654.
- Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, Bottiglieri L, Montagna E, Luini A *et al* (2009). Invasive ductal carcinoma of the breast with the "triple-negative" phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity. *Breast cancer research and treatment* **116**: 317-328.
- Viale G (2012). The current state of breast cancer classification. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23 Suppl 10**: x207-210.
- Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Simi A, Karaca E, Reversi A *et al* (2009). Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* **62**: 72-83.

## BIBLIOGRAPHIE

Visvader JE (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* **469**: 314-322.

Voena C, Di Giacomo F, Panizza E, D'Amico L, Boccalatte FE, Pellegrino E *et al* (2013). The EGFR family members sustain the neoplastic phenotype of ALK+ lung adenocarcinoma via EGR1. *Oncogenesis* **2**: e43.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L *et al* (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**: 719-726.

Volosin M, Song W, Almeida RD, Kaplan DR, Hempstead BL, Friedman WJ (2006). Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**: 7756-7766.

Volosin M, Trotter C, Cragolini A, Kenchappa RS, Light M, Hempstead BL *et al* (2008). Induction of proneurotrophins and activation of p75NTR-mediated apoptosis via neurotrophin receptor-interacting factor in hippocampal neurons after seizures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 9870-9879.

von Schack D, Casademunt E, Schweigreiter R, Meyer M, Bibel M, Dechant G (2001). Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nature neuroscience* **4**: 977-978.

Vona-Davis L, Rose DP (2007). Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocrine-related cancer* **14**: 189-206.

Vu T, Claret FX (2012). Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Frontiers in oncology* **2**: 62.

Waldhauer I, Steinle A (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* **27**: 5932-5943.

Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP *et al* (2000). Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular cell* **6**: 909-919.

Walsh T, King MC (2007). Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell* **11**: 103-105.

Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby PJ, Li R (2009). Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* **28**: 2745-2755.

Wang L, Rahn JJ, Lun X, Sun B, Kelly JJ, Weiss S *et al* (2008). Gamma-secretase represents a therapeutic target for the treatment of invasive glioma mediated by the p75 neurotrophin receptor. *PLoS biology* **6**: e289.

## BIBLIOGRAPHIE

Wang L, Zhang Q, Zhang J, Sun S, Guo H, Jia Z *et al* (2011). PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. *BMC cancer* **11**: 248.

Wang SE, Xiang B, Zent R, Quaranta V, Pozzi A, Arteaga CL (2009a). Transforming growth factor beta induces clustering of HER2 and integrins by activating Src-focal adhesion kinase and receptor association to the cytoskeleton. *Cancer research* **69**: 475-482.

Wang T, Yu D, Lamb ML (2009b). Trk kinase inhibitors as new treatments for cancer and pain. *Expert opinion on therapeutic patents* **19**: 305-319.

Wang X, Bauer JH, Li Y, Shao Z, Zetoune FS, Cattaneo E *et al* (2001). Characterization of a p75(NTR) apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *The Journal of biological chemistry* **276**: 33812-33820.

Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F *et al* (2005). Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* **365**: 671-679.

Wang YJ, Valadares D, Sun Y, Wang X, Zhong JH, Liu XH *et al* (2010). Effects of proNGF on neuronal viability, neurite growth and amyloid-beta metabolism. *Neurotoxicity research* **17**: 257-267.

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

Watson FL, Porcionatto MA, Bhattacharyya A, Stiles CD, Segal RA (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *Journal of neurobiology* **39**: 323-336.

Watson FL, Heerssen HM, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin MZ, Segal RA (2001). Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nature neuroscience* **4**: 981-988.

Weaver AM (2006). Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clinical & experimental metastasis* **23**: 97-105.

Weeraratna AT, Dalrymple SL, Lamb JC, Denmeade SR, Miknyoczki S, Dionne CA *et al* (2001). Pan-trk inhibition decreases metastasis and enhances host survival in experimental models as a result of its selective induction of apoptosis of prostate cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**: 2237-2245.

Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H, Garcia KC (2007). Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* **53**: 25-38.

Weidle UH, Scheuer W, Eggle D, Klostermann S, Stockinger H (2010). Cancer-related issues of CD147. *Cancer genomics & proteomics* **7**: 157-169.

## BIBLIOGRAPHIE

- Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS (2010a). The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *The Journal of pathology* **220**: 263-280.
- Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS (2010b). Histological types of breast cancer: how special are they? *Molecular oncology* **4**: 192-208.
- Weiss GJ, Hidalgo M, Borad MJ, Laheru D, Tibes R, Ramanathan RK *et al* (2012). Phase I study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of PHA-848125AC, a dual tropomyosin receptor kinase A and cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *Investigational new drugs* **30**: 2334-2343.
- Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG (1975). An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *Journal of the National Cancer Institute* **55**: 231-273.
- Wellings SR (1980). A hypothesis of the origin of human breast cancer from the terminal ductal lobular unit. *Pathology, research and practice* **166**: 515-535.
- Wells CD, Gutowski S, Bollag G, Sternweis PC (2001). Identification of potential mechanisms for regulation of p115 RhoGEF through analysis of endogenous and mutant forms of the exchange factor. *The Journal of biological chemistry* **276**: 28897-28905.
- Welslau M, Dieras V, Sohn JH, Hurvitz SA, Lalla D, Fang L *et al* (2014). Patient-reported outcomes from EMILIA, a randomized phase 3 study of trastuzumab emtansine (T-DM1) versus capecitabine and lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *Cancer* **120**: 642-651.
- Weltman JK (1987). The 1986 Nobel Prize for Physiology or Medicine awarded for discovery of growth factors: Rita Levi-Montalcini, M.D., and Stanley Cohen, Ph.D. *New England and regional allergy proceedings* **8**: 47-48.
- Weskamp G, Schlondorff J, Lum L, Becherer JD, Kim TW, Saftig P *et al* (2004). Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *The Journal of biological chemistry* **279**: 4241-4249.
- Wesolowski R, Ramaswamy B (2011). Gene expression profiling: changing face of breast cancer classification and management. *Gene expression* **15**: 105-115.
- Westergaard UB, Sorensen ES, Hermey G, Nielsen MS, Nykjaer A, Kirkegaard K *et al* (2004). Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *The Journal of biological chemistry* **279**: 50221-50229.
- Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F (2009). Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast cancer research : BCR* **11**: 209.



## BIBLIOGRAPHIE

Wiesmann C, Ullsch MH, Bass SH, de Vos AM (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* **401**: 184-188.

Wiesmann C, de Vos AM (2001). Nerve growth factor: structure and function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **58**: 748-759.

Williams KC, Coppolino MG (2014). SNARE-dependent interaction of Src, EGFR and beta1 integrin regulates invadopodia formation and tumor cell invasion. *Journal of cell science* **127**: 1712-1725.

Wobus M, Rangwala R, Sheyn I, Hennigan R, Coila B, Lower EE *et al* (2002). CD44 associates with EGFR and erbB2 in metastasizing mammary carcinoma cells. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* **10**: 34-39.

Wolf G, Trub T, Ottinger E, Groninga L, Lynch A, White MF *et al* (1995). PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities. *The Journal of biological chemistry* **270**: 27407-27410.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ *et al* (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**: 118-145.

Wooten MW, Seibenhener ML, Neidigh KB, Vandenplas ML (2000). Mapping of atypical protein kinase C within the nerve growth factor signaling cascade: relationship to differentiation and survival of PC12 cells. *Molecular and cellular biology* **20**: 4494-4504.

Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, Diaz-Meco MT, Barker PA, Moscat J (2001a). The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *The Journal of biological chemistry* **276**: 7709-7712.

Wooten MW, Vandenplas ML, Seibenhener ML, Geetha T, Diaz-Meco MT (2001b). Nerve growth factor stimulates multisite tyrosine phosphorylation and activation of the atypical protein kinase C's via a src kinase pathway. *Molecular and cellular biology* **21**: 8414-8427.

Wright JH, Drueckes P, Bartoe J, Zhao Z, Shen SH, Krebs EG (1997). A role for the SHP-2 tyrosine phosphatase in nerve growth-induced PC12 cell differentiation. *Molecular biology of the cell* **8**: 1575-1585.

Wu C, Lai CF, Mobley WC (2001). Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: 5406-5416.

Wu C, Cui B, He L, Chen L, Mobley WC (2009). The coming of age of axonal neurotrophin signaling endosomes. *Journal of proteomics* **72**: 46-55.

## BIBLIOGRAPHIE

- Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER *et al* (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer research* **64**: 7022-7029.
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**: 959-963.
- Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA, Greenberg ME (1998). Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Molecular and cellular biology* **18**: 1946-1955.
- Xu AM, Huang PH (2010). Receptor tyrosine kinase coactivation networks in cancer. *Cancer research* **70**: 3857-3860.
- Xu H, Eirew P, Mullaly SC, Aparicio S (2014). The omics of triple-negative breast cancers. *Clinical chemistry* **60**: 122-133.
- Xu J, Chen Y, Olopade OI (2010). MYC and Breast Cancer. *Genes & cancer* **1**: 629-640.
- Yamaguchi H (2012). Pathological roles of invadopodia in cancer invasion and metastasis. *European journal of cell biology* **91**: 902-907.
- Yan H, Chao MV (1991). Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *The Journal of biological chemistry* **266**: 12099-12104.
- Yan M, Parker BA, Schwab R, Kurzrock R (2014). HER2 aberrations in cancer: implications for therapy. *Cancer treatment reviews* **40**: 770-780.
- Yano H, Chao MV (2004). Mechanisms of neurotrophin receptor vesicular transport. *Journal of neurobiology* **58**: 244-257.
- Yano H, Chao MV (2005). Biochemical characterization of intracellular membranes bearing Trk neurotrophin receptors. *Neurochemical research* **30**: 767-777.
- Yano H, Torkin R, Martin LA, Chao MV, Teng KK (2009). Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: evidence for retrograde-directed cell killing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**: 14790-14802.
- Yarden Y (2001). Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* **61 Suppl 2**: 1-13.
- Ye H, Kuruvilla R, Zweifel LS, Ginty DD (2003). Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron* **39**: 57-68.
- Yerushalmi R, Hayes MM, Gelmon KA (2009). Breast carcinoma--rare types: review of the literature. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **20**: 1763-1770.

## BIBLIOGRAPHIE

- Yoon SO, Casaccia-Bonofil P, Carter B, Chao MV (1998). Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**: 3273-3281.
- York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW *et al* (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* **392**: 622-626.
- Yu T, Calvo L, Anta B, Lopez-Benito S, Southon E, Chao MV *et al* (2011). Regulation of trafficking of activated TrkA is critical for NGF-mediated functions. *Traffic* **12**: 521-534.
- Yu T, Calvo L, Anta B, Lopez-Benito S, Lopez-Bellido R, Vicente-Garcia C *et al* (2014). In vivo regulation of NGF-mediated functions by Nedd4-2 ubiquitination of TrkA. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**: 6098-6106.
- Zagouri F, Sergentanis TN, Chrysikos D, Papadimitriou CA, Dimopoulos MA, Psaltopoulou T (2013). Hsp90 inhibitors in breast cancer: a systematic review. *Breast* **22**: 569-578.
- Zampieri N, Xu CF, Neubert TA, Chao MV (2005). Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains. *The Journal of biological chemistry* **280**: 14563-14571.
- Zantek ND, Azimi M, Fedor-Chaiken M, Wang B, Brackenbury R, Kinch MS (1999). E-cadherin regulates the function of the EphA2 receptor tyrosine kinase. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 629-638.
- Zardavas D, Baselga J, Piccart M (2013). Emerging targeted agents in metastatic breast cancer. *Nature reviews Clinical oncology* **10**: 191-210.
- Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, Irizarry AR, Kinch MS (2001). EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer research* **61**: 2301-2306.
- Zhang J, Yang PL, Gray NS (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature reviews Cancer* **9**: 28-39.
- Zhang S, Huang WC, Li P, Guo H, Poh SB, Brady SW *et al* (2011). Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nature medicine* **17**: 461-469.
- Zhang Y, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA (2000). Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**: 5671-5678.
- Zheng J, Wang H, Yao J, Zou X (2014). More antitumor efficacy of the PI3K inhibitor GDC-0941 in breast cancer with PIK3CA mutation or HER2 amplification status in vitro. *Die Pharmazie* **69**: 38-42.
- Zheng WH, Kar S, Quirion R (2002). FKHL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *Journal of neurochemistry* **80**: 1049-1061.

## BIBLIOGRAPHIE

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

Zhu ZW, Friess H, Wang L, Bogardus T, Korc M, Kleeff J *et al* (2001). Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**: 105-112.

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

Zoller M (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature reviews Cancer* **11**: 254-267.

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