

Université de Lille Nord de France

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

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

Présentée par

Matthieu GUILBERT

**Impact de la transactivation des récepteurs membranaires
par le (pro)NGF dans les cancers**

Soutenue le 9 Septembre 2015 devant la commission d'examen :

Rapporteurs : Priv. Doz. Dr. Véronique ORIAN-ROUSSEAU

Pr. Danielle TROUTAUD

Examineur : Pr. Dominique CHEVALIER

Directeurs de thèse : Pr. Robert Alain TOILLON

Pr. Nicolas MAGNÉ

Remerciements

Les travaux réalisés dans ce manuscrit de thèse ont été effectués au sein du laboratoire INSERM U908 « Plasticité Cellulaire et Cancer » dirigé par Madame le Professeur Xuefen le Bourhis.

Je souhaite remercier, dans un premier temps, l'INSERM et la région Nord-pas-de-Calais pour m'avoir accordé une allocation de recherche durant ces 3 années de thèse.

Je tiens à remercier profondément Madame le Professeur Xuefen le Bourhis qui, en tant que directrice du laboratoire, m'a accueilli et soutenu dans la réalisation de mes travaux.

Je remercie également mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Robert-Alain Toillon, qui m'a dirigé et soutenu du Master 2 jusqu'à maintenant. Votre expérience, vos conseils et votre humour m'ont permis de m'épanouir pleinement dans le laboratoire. Merci pour toutes ces discussions, scientifiques ou non, que nous avons partagé dans notre bureau.

Je souhaite également remercier mon co-directeur de thèse, Monsieur le Professeur Nicolas Magné. Votre expertise médicale m'aura été d'une aide précieuse. Je suis heureux d'avoir pu bénéficier de votre expérience et de votre énergie débordante.

Pour l'honneur qu'ils me font en faisant partie de ce jury, je tiens à remercier vivement Madame le Professeur Véronique Orian-Rousseau et Madame le Professeur Danielle Troutaud qui ont bien voulu expertiser ce manuscrit, et enfin Monsieur le Professeur Dominique Chevalier qui a accepté d'examiner ces travaux.

Un très grand merci à tous les membres du laboratoire INSERM U908 qui m'ont supporté durant ces trois années :

Eric, ton humour n'a d'égal que ton expérience scientifique.

Chann, Monsieur cellules souches, merci pour tous tes conseils, et surtout pour ta bonne humeur persistante.

PO et Pamela, vous et vos petits Zebra allez me manquer, très certainement!

Valérie Chopin, j'aurais aimé mieux te connaître, ton arrivée dans le laboratoire est une chance pour tous.

Sylvain, merci pour ton énergie.

Nathalie, tes conseils techniques m'ont bien aidé !

Valérie Cendré, ton rire me manquera tout autant que ta bienveillance.

Véro, les matins passés ensemble ont été un plaisir.

J'ai une pensée particulière pour mes amis, mes compagnons de galère durant ma thèse :

Léo, mon « sempai » ! Tu m'as énormément aidé durant plus de deux ans, nos coups de blues en alternance m'ont permis de tenir !

Cyril, j'ai toujours pu compter sur toi, et ça, c'est très précieux.

Elisa, merci d'avoir supporté mes boulettes...

Jérémy, nos discussions sur la politique ou le foot vont me manquer !!

Justine et Barbara, les spice-girls, je n'ai pas de mots pour vous remercier. On a vécu tant de choses ensemble. Juste, MERCI !

Constance, qui a partagé avec moi une fin de thèse épique !

Romain, la relève, je te souhaite le meilleur pour l'avenir !

Je voudrais également remercier mes compagnons issus du monde médical : Sophie, Samia, Thomas et Raphaëlle, vos discussions m'ont tellement apporté !

Je souhaite enfin remercier ma famille, sans qui rien n'aurait été possible.

Enfin, Shôko, tu as été, tu es et tu resteras mon moteur, merci de me supporter, pour le meilleur et pour le pire. まことに、ありがとうございました～～

Résumé

Le laboratoire INSERM U908 a montré que le Nerve Growth Factor (NGF) et son précurseur, le proNGF, sont impliqués dans l'agressivité des tumeurs mammaires *via* des effets sur la croissance, l'angiogenèse ou encore la migration / invasion. Pour autant, aucune thérapie ciblée n'a, à ce jour, été approuvée suite à des essais cliniques de traitements visant à inhiber les effets du (pro)NGF et de leurs récepteurs dans les cancers. Ces résultats indiquent que la phosphorylation de TrkA est nécessaire mais pas suffisante pour expliquer le(s) mécanisme(s) par lequel(s) le NGF ou son précurseur participe(nt) au développement tumoral. L'obtention de lignées tumorales résistantes au Lestaurtinib est un phénomène rapide, nous avons donc émis l'hypothèse que la signalisation de TrkA indépendante de sa phosphorylation existe de façon « innée » dans les cellules tumorales. Par l'analyse protéomique, nous avons ainsi découvert que le NGF induit le recrutement de CD44 et d'une cascade de signalisation p115RhoGEF / RhoA et RhoC / ROCK1 (Aubert L*, Guilbert M* et al, Oncotarget, 2015 ; *co-premier auteur). Nous avons ainsi montré que le NGF *via* le complexe TrkA / CD44 induit la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de sein *in vitro*, et augmente la tumorigénicité *in vivo*. Quant au proNGF, j'ai pu observer qu'il induit l'internalisation de l'EGFR par la phosphorylation du résidu Y1068. Il en résulte une diminution des effets prolifératif et pro-invasif de l'EGF dans les cellules tumorales. Ces résultats fondamentaux sont tout à fait intéressants, même s'ils nécessitent leurs consolidations, et doivent permettre de démontrer le caractère pronostique de la détection de TrkA et ses corécepteurs dans le cancer. Ainsi nos études permettront le développement de thérapies ciblées par des firmes pharmaceutiques.

Abstract

The INSERM U908 unit has showed that Nerve Growth factor (NGF) and its precursor (proNGF) are implicated in tumor aggressiveness via their effects on growth, angiogenesis or migration/invasion and metastasis. Nevertheless, (pro)NGF and their receptors targeted therapies failed to demonstrate efficiency and clinical trial are disappointing. These results indicate that TrkA phosphorylation is not sufficient to explain molecular mechanisms of (pro)NGF effects on tumors. Indeed, we obtained Lestaurtinib resistant cell lines within 3 weeks of treatment which indicated that resistant mechanisms are innate. So, by functional proteomics analyses, we described that NGF induced the formation of TrkA / CD44 complex and then the recruitment of p115RhoGEF / RhoA / ROCK1 signaling cascade (Aubert L*, Guilbert M* et al, Oncotarget, 2015 ; *equally contributed to this work). We showed that CD44 mediated effects participate to invasive effects of NGF *in vitro*, and *in vivo*, we demonstrated that CD44 increases NGF induced tumorigenicity. In a second part, I observed that the proNGF regulated EGFR turn over through its phosphorylation on Y1068. This effect on EGFR decreased proliferative and pro-invasive effects of EGF in cancer cells. These fundamental results are interesting and need to be consolidated to ensure development of prognosis or targeted therapies.

SOMMAIRE

Introduction	- 15 -
A. Les (pro)neurotrophines et leurs récepteurs	- 15 -
I. Les (pro)neurotrophines	- 15 -
1. Découverte.....	- 15 -
2. Organisation	- 15 -
3. Structure.....	- 16 -
a. Gènes	- 16 -
b. Protéines	- 17 -
4. Expression et rôles physiologiques	- 19 -
a. Expression des différentes neurotrophines.....	- 19 -
b. Rôle des neurotrophines matures	- 20 -
c. Rôle des précurseurs.....	- 21 -
II. Les récepteurs aux (pro)neurotrophines	- 22 -
1. Le récepteur p75^{NTR}	- 22 -
a. Découverte	- 22 -
b. Structure	- 22 -
✓ Gène.....	- 22 -
✓ Protéines.....	- 23 -
<i>Domaine extracellulaire.....</i>	<i>- 23 -</i>
<i>Domaine transmembranaire.....</i>	<i>- 23 -</i>
<i>Domaine intracellulaire</i>	<i>- 23 -</i>
<i>Autres formes de p75^{NTR}</i>	<i>- 24 -</i>
c. Interaction avec les ligands	- 26 -
d. Voies de signalisation induites	- 27 -
✓ Rôle pro-apoptotique	- 27 -
✓ Rôle dans la survie cellulaire	- 28 -
2. Les récepteurs Tropomyosin-receptor kinases (Trk)	- 30 -

SOMMAIRE

a.	Découverte	- 30 -
b.	Structure	- 30 -
✓	<i>Gènes</i>	- 30 -
✓	<i>Protéines</i>	- 30 -
	<i>Domaine extracellulaire</i>	- 31 -
	<i>Domaines transmembranaire et intracellulaire</i>	- 31 -
✓	<i>Isoformes</i>	- 33 -
	<i>Isoformes de TrkA</i>	- 33 -
	<i>Isoformes de TrkB</i>	- 35 -
	<i>Isoformes de TrkC</i>	- 36 -
c.	Interaction avec les ligands	- 37 -
✓	<i>Interaction Trk/neurotrophines</i>	- 37 -
✓	<i>Interaction Trk/proneurotrophines</i>	- 38 -
d.	Voies de signalisation induites	- 38 -
✓	<i>PI3-K</i>	- 39 -
✓	<i>MAPK</i>	- 39 -
✓	<i>PLCY-PKC</i>	- 41 -
✓	<i>Le rétrocontrôle du récepteur</i>	- 41 -
3.	<i>La sortiline</i>	- 44 -
a.	Découverte	- 44 -
b.	Structure	- 44 -
✓	<i>Gène</i>	- 44 -
✓	<i>Protéine</i>	- 45 -
	<i>Domaine extracellulaire</i>	- 45 -
	<i>Domaine transmembranaire et intracellulaire</i>	- 45 -
c.	Interaction avec les ligands	- 46 -
d.	Voies de signalisation induites	- 47 -
✓	<i>Rôle dans le trafic intracellulaire</i>	- 47 -
✓	<i>Rôle pro-apoptotique</i>	- 48 -

SOMMAIRE

✓ Rôle dans la migration cellulaire	- 48 -
4. Interaction entre les récepteurs.....	- 49 -
a. Interaction Trk/p75 ^{NTR}	- 50 -
b. Interaction p75 ^{NTR} /sortiline	- 51 -
c. Interaction Trk/sortiline.....	- 52 -
III. (pro)NGF et cancers	- 53 -
1. Neurotrophines, Trks et cancers	- 54 -
a. Cancer colorectal.....	- 54 -
b. Cancer de la thyroïde.....	- 54 -
c. Cancer du poumon	- 55 -
d. Cancer du pancréas.....	- 55 -
e. Cancer de la prostate	- 55 -
f. Neuroblastome	- 56 -
g. Cancer de l’ovaire	- 56 -
h. Cancer du sein	- 57 -
i. Cancer des voies aéro-digestives supérieures (VADS).....	- 57 -
2. proneurotrophines et cancers.....	- 58 -
a. Cancer du pancréas.....	- 58 -
b. Cancer de la prostate	- 58 -
c. Cancer du foie	- 59 -
d. Mélanome.....	- 59 -
e. Cancer du sein	- 59 -
3. Thérapies anti-cancéreuses basées sur l’axe neurotrophine/Trk -	60 -
B. Modèles d’études.....	- 62 -
I. La glande mammaire.....	- 62 -
1. Généralités	- 62 -
a. Anatomie	- 62 -
b. Développement.....	- 65 -

SOMMAIRE

2. Les cancers du sein.....	- 66 -
a. Epidémiologie et étiologie	- 66 -
b. Le développement tumoral.....	- 68 -
✓ <i>Les différentes étapes du développement tumoral.....</i>	- 68 -
✓ <i>Les altérations génétiques</i>	- 69 -
c. Classification.....	- 70 -
✓ <i>Le grade SBR.....</i>	- 70 -
✓ <i>Le stade TNM.....</i>	- 71 -
✓ <i>La classification moléculaire.....</i>	- 72 -
d. Prise en charge thérapeutique.....	- 75 -
✓ <i>Les thérapies conventionnelles</i>	- 75 -
<i>Carcinomes in situ</i>	- 75 -
<i>Carcinomes invasifs.....</i>	- 75 -
<i>Cancer du sein métastatique</i>	- 76 -
✓ <i>Les thérapies émergentes.....</i>	- 77 -
<i>Ciblage des facteurs de croissance et de leurs récepteurs</i>	- 77 -
<i>Ciblage des cascades de signalisation induites</i>	- 79 -
e. Importance de CD44 dans les cancers du sein	- 83 -
II. Les voies aéro-digestives supérieures (VADS).....	- 87 -
1. Généralités	- 87 -
a. Cavités naso-sinusiennes et rhinopharynx	- 88 -
b. Larynx	- 88 -
c. Cavité buccale et oropharynx	- 89 -
d. Hypopharynx	- 89 -
2. Les cancers des VADS.....	- 90 -
a. Epidémiologie et facteurs de risque	- 90 -
b. Développement tumoral	- 92 -
c. Classification.....	- 93 -
✓ <i>Les différents groupes de cancers des VADS</i>	- 93 -

SOMMAIRE

✓ <i>Le stade TNM</i>	- 94 -
d. Importance d'EGFR dans les cancers des VADS	- 96 -
e. Prise en charge thérapeutique.....	- 99 -
✓ <i>Les thérapies conventionnelles</i>	- 99 -
✓ <i>Les thérapies émergentes</i>	- 101 -
Démarche expérimentale	- 106 -
Résultats	- 110 -
I. Article 1	- 110 -
II. Article 2	- 151 -
Discussion & Perspectives	- 172 -
I. Etude de l'interactome de TrkA induit par le NGF	- 172 -
1. <i>Interaction TrkA / CD44</i>	- 172 -
2. <i>Signalisations induites par le complexe TrkA / CD44</i>	- 174 -
3. <i>Applications cliniques</i>	- 176 -
II. Etude des interactomes induits par le proNGF	- 177 -
1. <i>Communications croisées entre le proNGF et EGFR</i>	- 177 -
2. <i>Rôle de la tyrosine 1068 de l'EGFR</i>	- 178 -
3. <i>Applications cliniques</i>	- 179 -
Bibliographie	- 184 -

SOMMAIRE

Sommaire des illustrations

Figure 1: Organisation de la famille des neurotrophines	- 16 -
Figure 2 : Représentation schématique des (pro)neurotrophines	- 18 -
Figure 3 : Représentation schématique de p75 ^{NTR}	- 26 -
Figure 4 : Signalisation induites par p75 ^{NTR}	- 29 -
Figure 5 : Représentation schématique de TrkA	- 32 -
Figure 6 : Schéma représentatif des isoformes de TrkA	- 34 -
Figure 7 : Schéma représentatif des isoformes de TrkB	- 35 -
Figure 8 : Schéma représentatif des isoformes de TrkC	- 36 -
Figure 9 : Signalisations induites par les récepteurs Trk, exemple de TrkA.....	- 43 -
Figure 10 : Représentation schématique de la sortiline.....	- 46 -
Figure 11 : Signalisations induites par la sortiline	- 49 -
Figure 12 : Exemples d'interactions entre les récepteurs aux (pro)neurotrophines.....	- 53 -
Figure 13 : Anatomie de la glande mammaire	- 63 -
Figure 14 : Représentation schématique de la structure d'un lobe mammaire	- 64 -
Figure 15 : Représentation schématique d'une alvéole.....	- 65 -
Figure 16 : Principe de la prise en charge thérapeutique dans le cancer du sein	- 77 -
Figure 17 : Les thérapies ciblées émergentes dans le cancer du sein.....	- 82 -
Figure 18 : Représentation schématique de CD44	- 84 -
Figure 19 : Régions anatomiques des voies aéro-digestives supérieures.....	- 87 -
Figure 20 : Anatomie du larynx	- 88 -
Figure 21 : Anatomie de la cavité buccale	- 89 -
Figure 22 : Représentation schématique de l'EGFR.....	- 97 -
Figure 23 : Principes de la prise en charge thérapeutique dans les cancers des VADS....	- 101 -
Figure 24 : Les thérapies ciblées émergentes dans les cancers des VADS.....	- 104 -
Figure 25 : Schéma récapitulatif des différentes interactions induites par le (pro)NGF et leurs signalisations sous-jacentes.	- 181 -

SOMMAIRE

Sommaire des Tables

Tableau 1 : Les neurotrophines humaines.....	- 17 -
Tableau 2 : Le récepteur p75 ^{NTR} humain.....	- 23 -
Tableau 3 : Les isoformes des récepteurs Trks humains.....	- 33 -
Tableau 4 : La sortiline humaine.....	- 44 -
Tableau 5 : Evolution de l'incidence des cancers du sein en France.....	- 67 -
Tableau 6 : Facteurs augmentant ou diminuant le risque de cancer du sein.....	- 68 -
Tableau 7 : Critères histologiques de la classification SBR.....	- 71 -
Tableau 8 : Classification TNM dans les cancers du sein.....	- 72 -
Tableau 9 : Classification moléculaire dans les cancers du sein.....	- 74 -
Tableau 10 : Le récepteur CD44 humain.....	- 83 -
Tableau 11 : Evolution de l'incidence des cancers VADS (Taux Standardisé Monde).....	- 90 -
Tableau 12: Répartition des cancers des VADS.....	- 94 -
Tableau 13 : Classification TNM des cancers de la cavité buccale et du pharynx.....	- 95 -
Tableau 14 : Le récepteur EGFR humain.....	- 96 -

ABRÉVIATIONS

-A-

ADAM17/TACE : **A** Disintegrin **A**nd **M**etalloprotease **17** / **TNF-Alpha** **C**onverting **E**nzyme

ADCC : **A**ntibody-**D**eendent **C**ell-mediated **C**ytotoxicity

AMPc : **A**dénosine **M**ono**P**hosphate cyclique

AP : **A**daptator **P**rotein

ApoA-V : **A**polipoprotein **A-V**

ARMS : **A**nkirin **R**epeat-rich **M**embrane **S**paning

ARNm : **A**cide **R**ibo**N**ucléique **m**essenger

-B-

Bad : **B**cl2-associated **a**gonist of cell **d**eath

BDNF : **B**rain-**D**erived **N**eurotrophic **F**actor

BRCA : **B**Reast **C**Ancer

-C-

CA : **C**orne d'**A**mmon

CAMK : **C**a²⁺/**C**AL**M**ODULIN-regulated protein **K**inase

C-CBL : **C**ell-**C**asitas **B**-lineage **L**ymphoma

CCI : **C**arcinome **C**analaire **I**nvasif

CCIS : **C**arcinome **C**analaire ***I**n **S**itu*

CCND1 : **C**yc**L**i**N** **D**1

CD44 : **C**luster of **D**ifferentiation **44**

CD74 : **C**luster of **D**ifferentiation **74**

CDH-1 : **C**a**D**Herin-1

CDK 4 : **C**yclin-**D**eendent **K**inase **4**

CDKN1A : **C**yclin-**D**eendent **K**inase **i**n**H**ibitor **1A**

CI-M6P/IGF-2R: **C**ation **I**ndependant-**M**annose-**6**-**P**hosphate / **I**nsulin **G**rowth **F**actor **R**eceptor

CLI : **C**arcinome **L**obulaire **I**nvasif

CLIS : **C**arcinome **L**obulaire ***I**n **S**itu*

CREB : **C**AMP **R**esponse **E**lement **B**inding

CRD : **C**ystein **R**ich **D**omain

CrkL : **C**rk **L**ike protein

CTF : **C**-**T**erminal **F**ragment

ABRÉVIATIONS

-D-

DAG : DiAcylGlycérol

DD : Death Domain

-E-

ECD : Extracellular Domain

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ER : Element de Réponse

Erk : Extracellular-signal-regulated kinase

-F-

FAP1 : Fas-Associated Protein 1

FGF : Fibroblast Growth Factor

FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor

FL : Full-Lenth

FLT-3 : Fms-Like Tyrosine kinase 3

FRKH : FoRKHead

Frs : FGF receptor substrate

FSHR : Follicle-Stimulating Hormone Receptor

-G-

GAP : GTPase-Activating Protein

GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor

GGA2 : Golgi-localized, Gamma adaptin ear-containing, ARF-binding

Gp110 : Glycoprotein 110

Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2

Gy : Gray

-H-

HAS : Haute Autorité de Santé

HB-EGF : Heparin-Binding EGF-like Growth Factor

ABRÉVIATIONS

HER2 : Human Epidermal Growth Factor **R**eceptor-2

HGF / SF : Hepatic **G**rowth **F**actor / Scatter **F**actor

Hsp90 : Heat shock protein **90**

-I-

ICD : IntraCellular **D**omain

Ig-C1 : Immunoglobulin-like **C2** type **1**

Ig-C2 : Immunoglobulin-like **C2** type **2**

IGF : Insulin Growth **F**actor

IGFR : Insulin Growth **F**actor **R**eceptor

IκB : Inhibitor of kappa **B**

IκK-β : IκB **K**inase **B**eta

IP3 : Inositol 1,4,5-trisPhosphate **3**

IP3K : Inositol 1,4,5-trisPhosphate **3-K**inase

IRAK : Interleukin-1 **R**eceptor-Associated **K**inase

IRS : Insulin **R**eceptor **S**ubstrate

-J-

JNK : c-Jun **N**-terminal **K**inase

-K-

KO : **K**nock **O**ut

-L-

LDLR : Low **D**ensity **L**ipoprotein **R**eceptor

LNGFR : Low affinity **N**erve **G**rowth **F**actor **R**eceptor

LpL : **L**ipoprotein **L**ipase

-M-

MAPK : **M**itogen-Activated **P**rotein **K**inases

MDGF-1 : **M**ammary-Derived **G**rowth **F**actor-1

ABRÉVIATIONS

MDR : **M**ulti-**D**rug **R**esistance

MEF2D : **M**ADS box transcription **E**nhancer **F**actor **2** polypeptide **D**

MITF : **M**icrophthalmia-Associated **T**ranscription **F**actor

MMP : **M**atrix **M**étallo**P**rotéases

MPR : **M**annose-6-**P**hosphate **R**eceptors

MRIP : **M**yosin phosphatase-**R**ho-**I**nteracting **P**rotein

MSK1 : **M**itogen and **S**tress-activated protein **K**inase **1**

mTOR : **m**ammalian **T**arget **O**f **R**apamycin

Myc : **M**yelocytomatosis oncogene

-N-

NADE : **N**eurotrophin **A**ssociated cell **D**eath **E**xecutor

NEDD : **N**eural precursor cell **E**xpressed, **D**evelopmentally **D**own regulated

NeuroD : **N**eurogenic **D**ifferentiation factor

NFκB : **N**uclear **F**actor **κ** **B**

NGF : **N**erve **G**rowth **F**actor

NGFR : **N**erve **G**rowth **F**actor **R**eceptor

NK : **N**atural **K**iller

NOMA-GAP : **N**eurite **O**utgrowth **M**ulti**A**daptor **R**ho**G**AP

NRAGE : **N**eurotrophin **R**ecptor **I**nteracting **M**AGE homologue

NRH2 : **N**eurotrophin **R**ecptor **H**omolog **2**

NRIF : **N**eurotrophin **R**ecptor **I**nteracting **F**actor

NT-3 : **N**euro**T**rophine-**3**

NT-4/5 : **N**euro**T**rophine-**4/5**

NTR3 : **N**euro**T**ensin **R**eceptor **3**

NTRK : **N**eurotrophic **T**yrosine **K**inase **R**eceptor

NTSR : **N**euro**T**en**S**in **R**eceptor

-P-

p115RhoGEF : **p**115 **R**ho **G**uanine nucleotide **E**xchange **F**actor **1**

p62 : **P**KC-interacting protein **p**62

p75^{NTR} : **p**75 **N**euro**T**rophin **R**eceptor

PACAP : **P**ituitary **A**denylate **C**yclase **A**ctivating **P**eptide

ABRÉVIATIONS

PACS1 : Phosphofurin Acidic Cluster Sorting protein 1

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PDZ : Post-Synaptic Disc-large Zona

PI3-K : PhosphoInositide 3 Kinase

PIK3CA : PhosphatidyInositol 4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic subunit Alpha isoform

PIP2 : PhosphatidyInositol-4,5-diPhosphate

PKC : Protein Kinase C

PLC : PhosphoLipase C

-R-

Rac : Ras-related c3 botulinum toxin substrate

Raf : Rapidly accelerated fibrosarcoma

Rap1 : Ras-related protein 1

RAP : Receptor Associated Protein

Ras : Rat sarcoma oncogene

RB1 : RetinoBlastoma-associated protein 1

RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G

RET : REarranged during Transfection

RhoA : Ras homolog gene family, member A

RhoC : Ras homolog gene family, member C

RIP : Regulated Intramembrane Proteolysis

RIP2 : Receptor-Interacting Protein 2

ROCK1 : RHO-associated, Coiled-coil-containing protein Kinase 1

ROS : c-ROS oncogene 1

RPTP : Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase

Rsk : Ribosomal protein s6 kinase

-S-

SBR : Scarff-Bloom-Richardson

SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency

Shc : Src homology 2 domain containin protein

SHP : Src-Homology 2 containing tyrosine Phosphatase

SORCS : SORtilin-related receptor CNS expressed 1

ABRÉVIATIONS

SorLA : **SOR**tilin-related Receptor **L**(DRL class) **A**

SORT-1 : **Sortilin 1**

SOS : **Son Of Sevenless**

SP1 : **Specificity Protein 1**

SPV : **Serine, Proline, Valine**

-T-

Tcf 12 : **Transcription factor 12**

TGF : **Transforming Growth Factor**

TGFR : **Transforming Growth Factor Receptor**

TNFR : **Tumor Necrosis Factor Receptor**

TNM : **Tumor Node Metastasis**

TP53 : **Tumor suppressor p53**

TPM3 : **Tropomyosin alpha-3 chain**

TPR : **Translocated Promoter Region**

TRADD : **TNF Receptor type 1-Associated Death Domain protein**

TRAF6 : **TNF Receptor-Associated Factor 6**

TrkA : **Tropomyosin-receptor kinase A**

TrkB : **Tropomyosin-receptor kinase B**

TrkC : **Tropomyosin-receptor kinase C**

-U-

UTDL : **Unité Terminale Ducto-Lobulaire**

-V-

VADS : **Voies Aéro-Digestives Supérieures**

VEGF : **Vascular Endothelial Growth Factor**

VEGFR : **Vascular Endothelial Growth Factor Receptor**

VPS26 : **Vacuolar Protein Sorting 35**

VPS35 : **Vacuolar Protein Sorting 35**

Vps10p : **Vacuolar protein sorting 10 protein**

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Introduction

A. Les (pro)neurotrophines et leurs récepteurs

I. Les (pro)neurotrophines

1. Découverte

En 1951, Rita Levi-Montalcini et Viktor Hamburger observent que la greffe d'un sarcome sur un embryon de poulet s'accompagne de l'innervation du tissu tumoral par l'hôte (Levi-Montalcini *et al.*, 1951). Avec Stanley Cohen, ils isolent le **Nerve Growth Factor (NGF)**, facteur diffusible responsable de cette innervation (Cohen *et al.*, 1954). Ce fut la première neurotrophine, mais également le premier facteur de croissance identifié. Le séquençage du NGF a ensuite été réalisé par Angeletti et Bradshaw en 1971 (Angeletti *et al.*, 1971). Pour l'ensemble de ces travaux, Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen ont été récompensés par le prix Nobel de médecine en 1984.

Les autres membres de la famille des neurotrophines ont été identifiés plus tard. Le **Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)** a été purifié en 1982 à partir d'extraits de cerveaux de cochons (Barde *et al.*, 1982). Puis, la **NeuroTrophine-3 (NT-3)** a été découverte en 1990 (Hohn *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1990; Maisonpierre *et al.*, 1990; Rosenthal *et al.*, 1990). Et enfin la **NeuroTrophine-4/5 (NT-4/5)** a été identifiée par homologie de séquence avec le NGF en 1991 (Berkemeier *et al.*, 1991; Hallbook *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1992).

2. Organisation

La famille des neurotrophines comprend donc 4 membres (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5). Ce sont des facteurs de croissance dont les membres partagent 5 récepteurs (Figure 1). Chaque neurotrophine possède un récepteur de haute affinité : **TrkA (Tropomyosin receptor kinase A)** pour le NGF, TrkB pour le BDNF et NT-4/5 et enfin TrkC pour la NT-3. En plus de ces récepteurs, les neurotrophines se lient également à un récepteur de faible affinité commun : **p75^{NTR} (p75 NeuroTrophin Receptor)**. La NT-3 peut également interagir avec les récepteurs TrkA et TrkB avec une faible affinité. Il a en outre été montré que les précurseurs des neurotrophines, les proneurotrophines, peuvent activer les récepteurs Trk et p75^{NTR} par le biais d'un autre récepteur : la sortiline (Figure 1).

INTRODUCTION

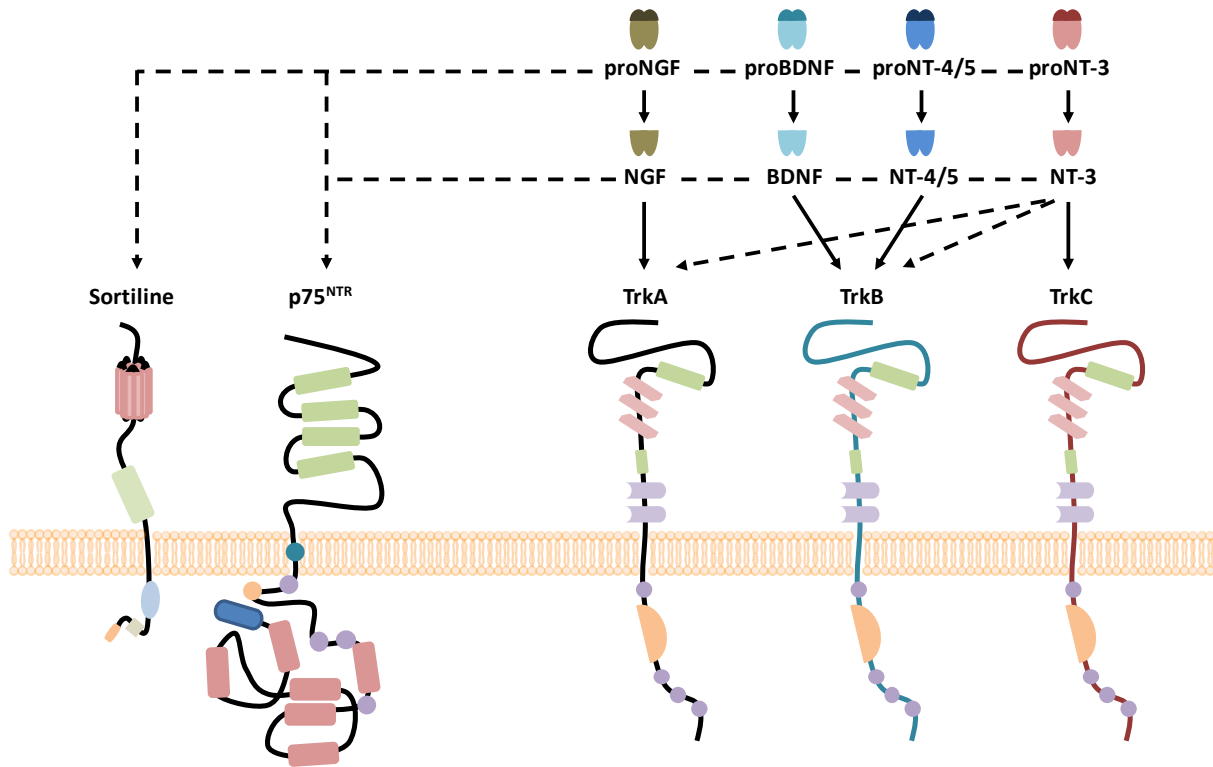


Figure 1: Organisation de la famille des neurotrophines

Association entre les différentes (pro)neurotrophines et leurs récepteurs. Les (pro)neurotrophines interagissent avec la sortiline et p75^{NTR}, TrkA est le récepteur de haute affinité du (pro)NGF, TrkB celui du (pro)BDNF et du (pro)NT-4/5 et TrkC celui du (pro)NT-3. Les récepteurs disposent de différents domaines fonctionnels extracellulaires (domaine riche en cystéines (vert), riche en leucines (rectangle rouge), Ig-C2 (violet), β -propeller (cylindre rouge)) et intracellulaires (site de phosphorylation (rond violet), site de palmitoylation (rond orange), tyrosine kinase (orange), domaine de mort (rouge)).

3. Structure

a. Gènes

Les neurotrophines sont très conservées au cours de l'évolution. Issues d'un gène ancestral, 3 événements de duplication ont mené aux 4 gènes retrouvés chez l'Homme (Hallbook 1999). Ces gènes sont répartis sur des chromosomes différents. Le gène codant le NGF se situe sur le chromosome 1, alors que les chromosomes 11, 12 et 19 contiennent respectivement les gènes codant le BDNF, la NT-3 et la NT-4/5. Les ARN messagers (ARNm) transcrits sont de tailles variables et contiennent entre 1 et 3 exons. Toutes les protéines traduites sont cependant issues d'un seul exon codant.

INTRODUCTION

Nom (protéine)	Gène /ARNm			Protéine	
	N° NCBI	Localisation	Taille	N° Uniprot	Taille
NGF	NM_002506	1p13,1	1052	P01138	241
BDNF	NM_170735	11p13	4659	P23560	247
NT-3	NM_002527	12p13	1204	P20783	257
NT-4/5	NM_006179	19q13,3	1021	P34130	210

Tableau 1 : Les neurotrophines humaines

Les différentes neurotrophines, leurs localisations chromosomiques et la taille des ARNm correspondants en paire de base. Le numéro d'accèsion NCBI correspond au transcrit majoritaire. Le numéro d'accèsion Uniprot et la taille de la protéine en acide aminé correspond à la préproneurotrophine.

b. Protéines

Les neurotrophines sont toutes synthétisées sous forme de pré-proneurotrophines contenant un peptide signal hydrophobe, un propeptide et la neurotrophine mature (Figure 2 A). Ces précurseurs sont ensuite progressivement maturés. Le peptide signal est éliminé dans le réticulum endoplasmique (Martoglio 2003). Puis, le propeptide peut être clivé à différents moments de la maturation. Si le clivage est intracellulaire, il sera effectué par des protéases comme la **furine** (Bresnahan *et al.*, 1990) ou des pro-protéines convertases (Seidah *et al.*, 1996). Si le clivage est extracellulaire, ce sont certaines **métalloprotéases** (MMP-3 et MMP-7) ou la **plasmine** qui induisent la maturation. La protéolyse est réalisée au niveau d'un site consensus constitué d'acides aminés dibasiques : Arg-X-(Lys/Arg)-Arg.

INTRODUCTION

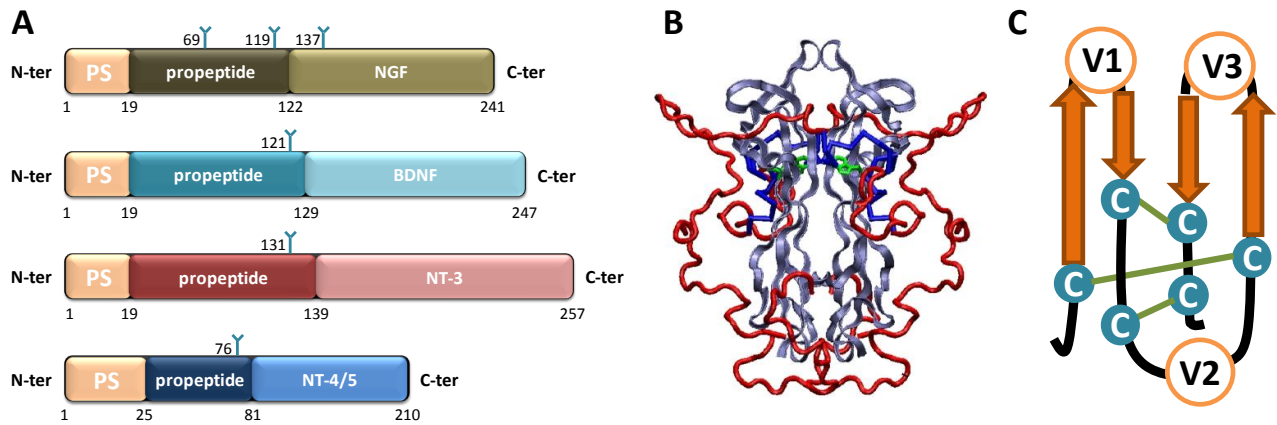


Figure 2 : Représentation schématique des (pro)neurotrophines

A. préneurotrophines constituées d'un peptide signal (orange) d'un propeptide (foncé) et de la protéine mature (clair), Y représente les sites de glycosylation. B. Dimère de proNGF constitué de 2 protomères avec la partie mature NGF (bleu) au centre permettant l'interaction et le propeptide (rouge) rejeté en périphérie. C. Monomère de NGF composé de 3 régions variables V1-3 (blanc) 4 feuillets β 1-4 (orange) et 6 cystéines (bleu) qui forment 3 ponts disulfures (vert) (Paoletti *et al.*, 2009; Paoletti *et al.*, 2011)

Tous les membres de la famille des (pro)neurotrophines adoptent une conformation tridimensionnelle similaire (Figure 2 B). Le propeptide, lorsqu'il n'est pas encore clivé, recouvre le dimère de neurotrophines matures, alors que seul, il ne présente aucune structure tertiaire (Kliemann *et al.*, 2004). La neurotrophine mature est composée de 4 feuillets β (β 1- β 4) séparés par 3 boucles variables (V1-V3) et un nœud de cystéines formant une structure rigide *via* 3 ponts disulfures ($C^{15}-C^{80}$, $C^{58}-C^{108}$, $C^{68}-C^{110}$ pour le NGF mature) (Figure 2 C) (McDonald *et al.*, 1991; McDonald *et al.*, 1993). En solution, ces protéines forment des homodimères présentant une symétrie axiale. L'interaction se fait par des liaisons non covalentes entre deux neurotrophines matures, notamment *via* l'interaction entre les feuillets β 1/ β 2 d'un premier protomère avec les feuillets β 3/ β 4 d'un second protomère (Wiesmann *et al.*, 2001). Le propeptide, quant à lui, a plusieurs rôles. Le premier est de favoriser la formation des ponts disulfures de la protéine mature (Rattenholl *et al.*, 2001; Rattenholl *et al.*, 2001). Il est également responsable du masquage d'un acide aminé essentiel pour l'interaction neurotrophine / Trk (par exemple W^{21} du NGF mature) expliquant ainsi la faible affinité des proneurotrophines envers les récepteurs Trk (Hauburger *et al.*, 2007; Kliemann *et al.*, 2007; Paoletti *et al.*, 2009; Paoletti *et al.*, 2011). De plus, le propeptide semble modifier la conformation de la neurotrophine mature favorisant ainsi l'interaction du dimère avec le récepteur $p75^{NTR}$ (Nykjaer *et al.*, 2004; Pimenta *et al.*, 2014). Il est enfin

INTRODUCTION

directement responsable de l'interaction entre les proneurotrophines et la sortiline, grâce à une région de 27 acides aminés. Il s'agit de la région N⁶⁹-E⁹⁶ pour le proNGF (Suter *et al.*, 1991) et de la région K⁷⁶-E¹⁰³ pour le proBDNF (Chen *et al.*, 2005). Le propeptide du proNT4/5 est, par ailleurs, plus court et dépourvu d'une partie de ce domaine d'interaction, ce qui semble expliquer l'absence de liaison entre le proNT-4/5 et la sortiline. Enfin, concernant proNT-3, aucune interaction directe avec la sortiline n'a encore été démontrée à ce jour. Il est possible que l'insertion de 7 acides aminés (R⁹⁴-N¹⁰⁰) dans la région d'interaction décrite précédemment modifie l'affinité de la proneurotrophine pour ce récepteur.

4. Expression et rôles physiologiques

a. Expression des différentes neurotrophines

Comme leurs noms l'indiquent, les neurotrophines jouent un rôle central dans le développement et le maintien du système nerveux central et périphérique (Barde 1994). Chaque membre de la famille présente un profil d'expression particulier, supposant des rôles biologiques différents. Le patron d'expression de ces différentes neurotrophines au sein des organes est cependant bien conservé chez les mammifères (Yamamoto *et al.*, 1996).

Le **NGF** est retrouvé dans de nombreux organes, son niveau d'expression étant corrélé au degré d'innervation sympathique de l'organe en question (Shelton *et al.*, 1984). En effet, en plus des tissus neuronaux (cerveau, ganglions spinaux) le NGF est fortement exprimé dans le cœur et la rate, deux organes fortement régulés par le système nerveux sympathique (Yamamoto *et al.*, 1996). Dans le cerveau, le NGF est néanmoins exprimé en moyenne 20 fois plus que dans les autres organes (Shelton *et al.*, 1986). Cette expression n'est cependant pas homogène. Peu d'ARNm sont détectés dans le cervelet alors qu'ils sont abondants dans le tronc cérébral, l'hippocampe, l'hypothalamus, le cortex entorhinal, le néocortex et le prosencéphale basal (Korsching *et al.*, 1985; Shelton *et al.*, 1986; Whitemore *et al.*, 1986; Spillantini *et al.*, 1989; Ceccatelli *et al.*, 1991; Lauterborn *et al.*, 1991).

Le **BDNF**, présente un patron d'expression assez similaire au NGF (Yamamoto *et al.*, 1996). En effet, il est fortement exprimé dans les mêmes tissus non-neuronaux (cœur et rate). Quelques différences ont néanmoins été décrites. Il semblerait que le BDNF soit plus présent dans la moelle épinière que le NGF. Il est, de manière générale, exprimé plus largement dans tout le système nerveux central (Ernfors *et al.*, 1990; Phillips *et al.*, 1990; Ceccatelli *et al.*, 1991; Friedman *et al.*, 1991; Guthrie *et al.*, 1991; Gall *et al.*, 1992; Castren *et al.*, 1995).

INTRODUCTION

Concernant la **NT-3**, sa localisation tissulaire est très différente. En effet, cette neurotrophine s'exprime préférentiellement dans les tissus non neuronaux (cœur, foie, poumon, rein) (Maisonpierre *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1996). Elle est cependant retrouvée dans certaines zones du cerveau comme l'hippocampe (aire CA2 de la corne d'Ammon, grains du gyrus dentaire), grain du cervelet et, dans une moindre mesure, dans la *substantia nigra*, le thalamus ou encore le complexe amygdalien (Ernfors *et al.*, 1990; Maisonpierre *et al.*, 1990; Ceccatelli *et al.*, 1991; Lauterborn *et al.*, 1994; Seroogy *et al.*, 1994).

Enfin, la neurotrophine **NT-4/5** présente un profil d'expression encore différent. Elle n'est quasiment pas exprimée dans le cerveau, à part durant les stades précoces du développement. Concernant les tissus non-neuronaux, c'est la prostate qui concentre le plus d'ARNm (Ip *et al.*, 1992; Timmusk *et al.*, 1993).

b. Rôle des neurotrophines matures

Durant les étapes précoces du développement, la NT-3 joue un rôle fondamental dans la bonne formation du système nerveux périphérique. En effet, la localisation de la NT-3 et de son récepteur (TrkC), l'utilisation d'anticorps bloquants et des études *in vitro* suggèrent un effet mitogénique, migratoire et conduisant à la différenciation des cellules de la crête neurale (Kalcheim *et al.*, 1992; Pinco *et al.*, 1993; Tessarollo *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1993; Elkabes *et al.*, 1994). A un stade plus tardif, la NT-3 est impliquée dans le développement des ganglions spinaux en permettant la maturation des neurones sensitifs (Wright *et al.*, 1992; Gaese *et al.*, 1994; Tessarollo *et al.*, 1994; Kucera *et al.*, 1995). Le BDNF semble également jouer un rôle dans la différenciation des cellules de la crête neurale en neurones sensitifs (Kalcheim *et al.*, 1988; Sieber-Blum 1991). Il semblerait que le BDNF, la NT-3 et la NT-4/5, participent également au maintien de la survie des motoneurones au cours de l'embryogénèse (Henderson *et al.*, 1993). Le NGF, quant à lui, est impliqué dans le développement et dans la survie des neurones sensitifs de type nocicepteur (thermocepteurs et récepteurs polymodaux) et des neurones sympathiques (Johnson *et al.*, 1980; Pearson *et al.*, 1983; Lewin *et al.*, 1993; Crowley *et al.*, 1994; Lewin *et al.*, 1994). En plus de leurs rôles respectifs dans le développement du système nerveux au cours de l'embryogénèse, les neurotrophines sont essentielles chez l'adulte. Elles sont alors impliquées dans la plasticité des cellules neuronales (McAllister *et al.*, 1999; Poo 2001). Par exemple, le NGF est engagé dans le maintien des connections synaptiques entre les neurones pré-ganglionnaires et les neurones sympathiques (Purves *et al.*, 1976). Il a également été démontré que le BDNF était requis pour une bonne

INTRODUCTION

transmission synaptique au sein de l'hippocampe (Korte *et al.*, 1995). Enfin, le NGF fait le lien entre l'inflammation et la douleur en cas de blessure. Le taux de NGF est augmenté après inflammation d'un tissu, permettant la synthèse de neuropeptides qui mène à une hyperalgésie (Donnerer *et al.*, 1992; Lewin *et al.*, 1993; Lewin *et al.*, 1994; Woolf *et al.*, 1994).

c. Rôle des précurseurs

Alors que les premiers effets biologiques des neurotrophines ont été décrits en 1951 (Levi-Montalcini *et al.*, 1951), ce n'est qu'au début des années 2000 que l'action des proneurotrophines a été découverte. C'est l'équipe de Lee qui démontra pour la première fois que celles-ci pouvaient être sécrétées par les cellules et induire la mort des neurones (Lee *et al.*, 2001). La présence des proneurotrophines puis leur sécrétion ont été retrouvées dans les cellules microgliales, les neurones corticaux et sympathiques, ou encore les astrocytes (Hasan *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2004; Bruno *et al.*, 2006; Domeniconi *et al.*, 2007). De plus, il semblerait que la principale forme sécrétée par les neurones sympathiques et par les tissus innervés cibles soit le proNGF (Bierl *et al.*, 2005). L'importance physiologique du proNGF a, par ailleurs, été décrite suite à l'étude des nombreuses maladies neurodégénératives. En effet, une expression non physiologique de cette proneurotrophine est impliquée dans des maladies telles que la maladie de Pick, Alzheimer ou encore le syndrome de Down (Fahnestock *et al.*, 2001; Belrose *et al.*, 2014; Iulita *et al.*, 2014). Alors que sa forme mature induit des effets neuroprotecteurs, le proNGF induit la mort des cellules neuronales, caractéristique de ces pathologies. En outre, l'effet pro-apoptotique a été démontré dans d'autres types cellulaires comme les cellules **NK** (Natural Killer) et les muscles lisses (Rogers *et al.*, 2010; Campagnolo *et al.*, 2014). Les effets pro-apoptotiques ont par la suite été confirmés pour les autres proneurotrophines (Teng *et al.*, 2005; Yano *et al.*, 2009). Ensemble, ces résultats démontrent que la balance mort/survie cellulaire observée durant le développement du système nerveux peut être régulée par les neurotrophines et leurs précurseurs (Teng *et al.*, 2010).

INTRODUCTION

II. Les récepteurs aux (pro)neurotrophines

1. Le récepteur p75^{NTR}

a. Découverte

C'est en 1973 qu'a été découvert le premier récepteur aux neurotrophines. A cette époque, le NGF venait juste d'être séquencé et les autres membres de la famille n'avaient pas encore été identifiés. Il a donc été appelé **NGF-Receptor (NGFR)** (Herrup *et al.*, 1973). En 1979, une étude portant sur l'affinité du NGF envers son récepteur a mis en évidence deux régions d'interaction, de haute ($K_d=10^{-11}M$) et de basse affinité ($K_d=10^{-9} M$), qui s'avérèrent être deux récepteurs distincts (Sutter *et al.*, 1979). Le récepteur de basse affinité a été cloné puis séquencé en 1986 (Chao *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 1986). Il prit le nom de **Low affinity Nerve Growth Factor Receptor (LNGFR)**. La découverte et l'étude des autres membres de la famille des neurotrophines a cependant montré que tous les membres de cette famille étaient capables de se fixer sur ce récepteur (Rodriguez-Tebar *et al.*, 1990; Rodriguez-Tebar *et al.*, 1992; Ryden *et al.*, 1995). La masse moléculaire de ce récepteur (glycosylations incluses) étant de 75 kDa (Large *et al.*, 1989), LNGFR fut alors rebaptisé **p75^{NTR}**.

b. Structure

✓ Gène

Le récepteur p75^{NTR} est codé par un gène d'environ 23 kb situé sur la région q21-q22 du chromosome 17. Ce gène, appelé NGFR en référence au premier nom du récepteur p75^{NTR}, code un ARN messager de 3,4 kb à partir de 6 exons. Il n'existe qu'un seul site majeur d'initiation de la transcription (Sehgal *et al.*, 1988). La régulation de l'expression de NGFR est réalisée par un promoteur dépourvu de séquence consensus de type TATA ou CAAT mais contenant une séquence riche en GC constituant un élément de réponse (ER) au facteur de transcription **SP1 (Specificity Protein 1)** (Ramos *et al.*, 2007). D'autres séquences régulatrices ont également été identifiées. Certaines permettent la liaison avec des activateurs transcriptionnels comme **NeuroD (Neurogenic Differentiation factor)** (Metsis 2001) ou l'**acide rétinolique** (Metsis *et al.*, 1992). Alors que d'autres recrutent des inhibiteurs de transcription comme la **vitamine D3** (Naveilhan *et al.*, 1996), la **testostérone** (Persson *et al.*, 1990) ou encore le facteur de transcription **Tcf 12 (Transcription factor 12)** (Chiamello *et al.*, 1995).

INTRODUCTION

Nom (protéine)	Gène / ARNm			Protéine	
	N° NCBI	Localisation	Taille	N° Uniprot	Taille
p75 ^{NTR}	NM_002507	17q21-q22	3420	P08138	427

Tableau 2 : Le récepteur p75^{NTR} humain

Le récepteur p75^{NTR}, la localisation chromosomique de son gène et la taille de l'ARNm correspondant en paire de base. Le numéro d'accèsion NCBI correspond au transcrit majoritaire. Le numéro d'accèsion Uniprot et la taille de la protéine en acide aminé correspondent à la forme complète du récepteur.

✓ Protéines

L'ARNm de NGFR est ensuite traduit en une protéine de 427 acides aminés constituée d'un peptide signal (28 acides aminés), d'un domaine extracellulaire (222 acides aminés), d'une région transmembranaire (22 acides aminés) et d'une partie intracellulaire (155 acides aminés) (Figure 3).

Domaine extracellulaire

La partie extracellulaire du récepteur est composée de 4 domaines riches en cystéines (**CRD** - **C**ystein **R**ich **D**omain) caractéristiques de la famille du **Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR)** (Aggarwal 2003). Chaque CRD possède 6 cystéines formant 3 ponts disulfures permettant la liaison avec les ligands (Yan *et al.*, 1991). La partie extracellulaire présente également un site de N-glycosylation (N³³) et une région riche en O-glycosylations (de I¹⁶⁸ à G²¹⁸) permettant notamment l'adressage du récepteur à la membrane (Breuza *et al.*, 2002), mais aussi son interaction avec les ligands (Gong *et al.*, 2008).

Domaine transmembranaire

La partie transmembranaire est essentielle pour la dimérisation du récepteur. En effet, la cystéine 257 permet d'établir un pont disulfure entre deux monomères, de manière ligand-indépendante (Vilar *et al.*, 2009). Elle fait elle-même partie d'une structure en hélice- α unique, classant p75^{NTR} dans la catégorie des récepteurs transmembranaires de type I.

Domaine intracellulaire

La partie intracellulaire de p75^{NTR} présente également certaines homologies avec les récepteurs au TNF. En effet, 78 acides aminés (R³¹⁶-S³⁹³) de la partie intracellulaire forment un domaine de mort (**Death Domain, DD**) (Boldin *et al.*, 1995). Cette structure globulaire est

INTRODUCTION

constituée de 6 hélices α (DD1 à DD6) dont la conformation est cependant différente de celle d'autres membres de la famille des TNFR comme TNFR1 ou Fas. L'orientation de la première hélice α (DD1) de p75^{NTR} est parallèle aux hélices DD5 et DD6 (domaine de mort de sous-type II) alors que l'hélice DD1 de Fas est perpendiculaire à ces dernières (domaine de mort de sous-type I) (Liepinsh *et al.*, 1997). Ce changement conformationnel retrouvé chez p75^{NTR} empêche une multimérisation *via* ce domaine. Ce domaine de mort de sous-type II recrute également des protéines adaptatrices de natures différentes menant ainsi à des signalisations différentes (Roux *et al.*, 2002). Le recrutement de protéines adaptatrices peut également se faire *via* le motif **SPV** (Serine, Proline, Valine) situé en région C-terminale du récepteur. En effet, c'est un site d'interaction avec les protéines contenant un domaine **PDZ** (Post-Synaptic Disc-large Zona). En plus de ces domaines, la partie intracellulaire de p75^{NTR} abrite un domaine Chopper. Ce domaine, de 29 acides aminés, situé en région juxtamembranaire du récepteur (K²⁷⁴-L³⁰²), est responsable de la majeure partie de l'activité pro-apoptotique de p75^{NTR} (Coulson *et al.*, 2000). Cette région transmembranaire contient également la cystéine 279 qui permet la palmitoylation du récepteur (Barker *et al.*, 1994). Cette modification post-traductionnelle est importante pour la signalisation induite par le NGF car elle est engagée dans le maintien de l'interaction entre TrkA et p75^{NTR} (Mirnics *et al.*, 2005). Il existe d'autres modifications post-traductionnelles du domaine intracellulaire de p75^{NTR}. La phosphorylation de la sérine 304 participe par exemple à la relocalisation du récepteur dans les radeaux lipidiques après stimulation par le ligand (Higuchi *et al.*, 2003). Plus récemment, la phosphorylation de la sérine 277 a été décrite comme étant importante dans le rétrocontrôle du récepteur (Butowt *et al.*, 2009). Il a également été montré que la phosphorylation des tyrosines 336 et 368 permet la régulation de l'activité de **Ras** et de **RhoA** (**Ras homolog gene family, member A**) (Blochl *et al.*, 2004). Enfin, la phospho-tyrosine 336 est également responsable du recrutement de **c-Cbl** (cell-Casitas **B**-lineage **L**ymphoma), une ubiquitine-ligase menant à la dégradation du récepteur (Ohrt *et al.*, 2004).

Autres formes de p75^{NTR}

Outre la forme complète de p75^{NTR} décrite précédemment, il existe des formes tronquées, soit issues d'un épissage alternatif, soit issues d'une protéolyse du récepteur (Figure 3).

L'épissage alternatif consiste en l'élimination de l'exon 3, ce qui entraîne la délétion des domaines riches en cystéines 2, 3 et 4 (Dechant *et al.*, 1997; Von Schack *et al.*, 2001). Cette isoforme tronquée est incapable de se lier avec ses ligands. Même si la fonction

INTRODUCTION

biologique de celle-ci reste inconnue, une inhibition de son expression, associée à un **KO** (**Knock Out**) de la forme complète de p75^{NTR} entraîne des malformations du système nerveux de la souris plus importantes que l'inhibition de l'expression de la forme complète uniquement.

D'autres formes, issues de clivages protéolytiques, existent. En effet, p75^{NTR} est un récepteur transmembranaire pouvant subir une protéolyse de type **RIP** (**Regulated Intramembrane Proteolysis**) permettant un clivage de la partie extracellulaire (**ECD** – **ExtraCellular Domain**) puis un clivage de la partie intracellulaire (**ICD** – **IntraCellular Domain**) de part et d'autre de la membrane plasmique (Brown *et al.*, 2000; Skeldal *et al.*, 2011). Le premier clivage, permettant de libérer **p75^{NTR}-ECD**, est réalisé par **ADAM17/TACE** (**A Disintegrin And Metalloprotease 17 / TNF-Alpha Converting Enzyme**), une métalloprotéase de la famille des α -sécrétases. Cette première protéolyse semble avoir lieu 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). Les parties transmembranaire et cytoplasmique de p75^{NTR} prennent alors le nom de **p75^{NTR}-CTF** (**C-Terminal Fragment**). Un second clivage vient alors séparer la partie transmembranaire de la partie cytoplasmique au niveau de la valine 263 et de la valine 264 (Jung *et al.*, 2003). Cette protéolyse est réalisée par un complexe protéique γ -sécrétase dont fait partie l'enzyme **préséniline-1** (Zampieri *et al.*, 2005). Le domaine transmembranaire joue un rôle central dans ce clivage. En effet, la cystéine 257 et le motif A²⁶²XXXG²⁶⁶, situés tous deux dans le domaine transmembranaire et responsables de la dimérisation du récepteur, sont requis pour cette protéolyse (Sykes *et al.*, 2012). D'autres acteurs sont également nécessaires à la génération de **p75^{NTR}-ICD**. Ainsi, **TRAF6** (**TNF Receptor-Associated Factor 6**), une E3-Ubiquitine ligase ciblant p75^{NTR}, s'associe avec la préséniline-1 pour conduire au clivage de p75^{NTR}-CTF (Powell *et al.*, 2009). La sortiline joue également un rôle dans ce phénomène car elle faciliterait l'internalisation de p75^{NTR} dans les endosomes précoces où le clivage a lieu (Skeldal *et al.*, 2012).

Le rôle des différentes formes tronquées de p75^{NTR} reste mal connu. Cependant, il est désormais admis qu'elles participent également à la signalisation du récepteur après stimulation par les (pro)neurotrophines.

INTRODUCTION

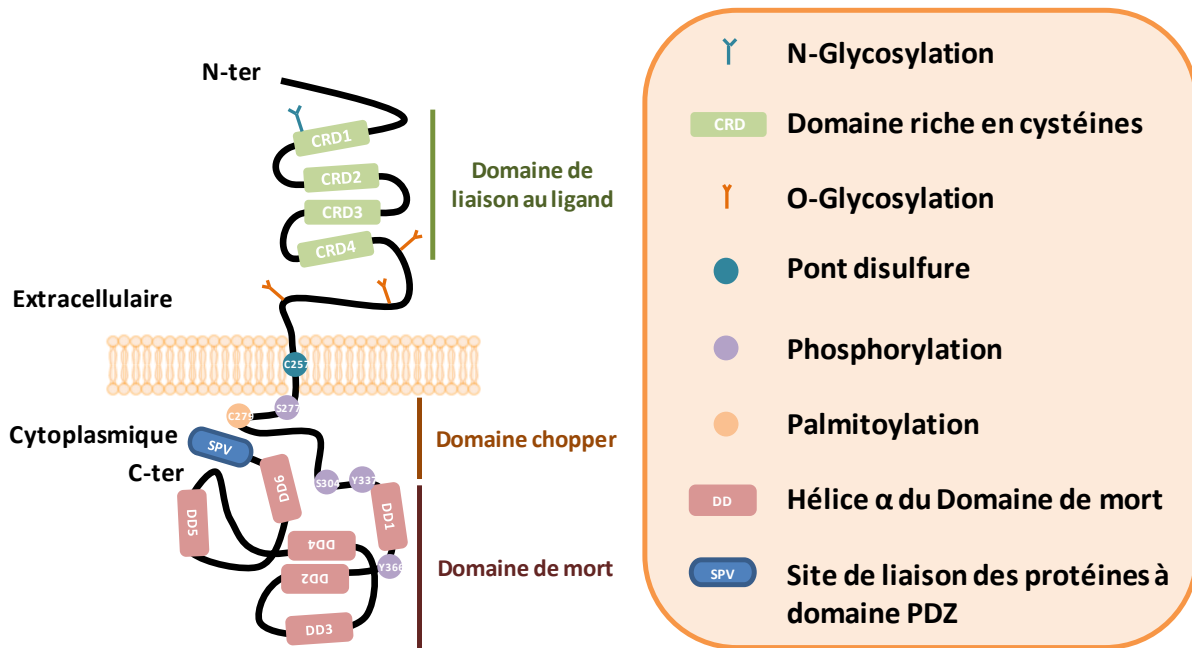


Figure 3 : Représentation schématique de p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} est composé d'un domaine extracellulaire qui abrite 4 régions riches en cystéines (vert) avec plusieurs sites de glycosylation (Y), d'un domaine transmembranaire contenant la cystéine C257 importante pour la dimérisation du récepteur, et d'une région cytoplasmique constituée d'un domaine chopper juxtamembranaire (orange), d'un domaine de mort (rouge) et de plusieurs sites de phosphorylation (violet) (Roux et al., 2002).

c. Interaction avec les ligands

p75^{NTR} est le récepteur commun à toutes les (pro)neurotrophines. L'interaction des proneurotrophines avec p75^{NTR} se fait *via* la partie mature de celles-ci (Feng et al., 2010), le prodomaine n'interagissant pas directement avec le récepteur (Nykjaer et al., 2004). Néanmoins, les proneurotrophines peuvent se lier sur p75^{NTR} avec une affinité plus forte que les formes matures (Lee et al., 2001). Ceci peut s'expliquer par le changement conformationnel induit par le propeptide sur la partie mature augmentant l'affinité de celle-ci pour p75^{NTR}. Que ce soit sous la forme de son précurseur ou sous sa forme mature, la neurotrophine interagit avec les régions riches en cystéines de p75^{NTR} *via* ses boucles variables. Bien que les séquences diffèrent selon les neurotrophines, ce sont les boucles V1 (résidus 23 à 35) et/ou V3 (résidus 93 à 98) qui sont responsables de l'interaction (Shamovsky et al., 1999). Ainsi, pour le NGF, ce sont les lysines 32, 34 (V1) et 95 (V3) qui jouent un rôle clé dans l'interaction. Le BDNF, quant à lui, interagit uniquement *via* sa boucle V3 (lysine 95 et 96, arginine 97) alors que, concernant les neurotrophines NT-3 et NT4/5, c'est *via* la boucle

INTRODUCTION

V1 que l'interaction se réalise (arginine 31 et histidine 33 pour NT-3, arginine 34 et 36 pour NT-4/5). La reconnaissance du ligand par p75^{NTR} se fait par les 4 domaines riches en cystéines (CRD). Plus précisément, c'est la région comprise entre la cystéine 39 et l'alanine 96 de p75^{NTR} (CRD 2 et 3) qui apparaît comme centrale dans l'interaction (Baldwin *et al.*, 1995; Shamovsky *et al.*, 1999). La glycosylation du récepteur est également essentielle à l'interaction avec le ligand (Aurikko *et al.*, 2005). Cette étude, en accord avec des travaux plus récents (Vilar *et al.*, 2009), montre par ailleurs que le récepteur est déjà sous forme de dimère avant la fixation du ligand. La fixation de ce dernier entraînerait uniquement un changement conformationnel du dimère permettant ainsi le recrutement des protéines adaptatrices et donc la signalisation intracellulaire.

d. Voies de signalisation induites

p75^{NTR} est un récepteur dont l'activation peut mener, selon le contexte cellulaire, à l'apoptose ou la croissance cellulaire (Figure 4). Ne disposant pas d'activité catalytique propre, c'est le recrutement de protéines adaptatrices que déterminera le type de signalisation induite.

✓ Rôle pro-apoptotique

L'effet pro-apoptotique de p75^{NTR} est induit par le recrutement de protéines adaptatrices comme **TRAF2** (TNF Receptor Associated Factor 2), **NRAGE** (Neurotrophin Receptor Interacting MAGE homologue), **NADE** (Neurotrophin Associated cell Death Executor), **NRIF** (Neurotrophin Receptor Interacting Factor) ou encore **NRH2** (Neurotrophin Receptor Homolog 2) (Ye *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2001; Salehi *et al.*, 2002; Kenchappa *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009). Ce recrutement se fait soit au niveau du domaine Chopper, soit sur le domaine de mort. L'apoptose induite passe par la voie mitochondriale après activation de **Rac**. Le lien entre les protéines adaptatrices et Rac n'est pas encore bien connu, cependant l'activation de Rac par p75^{NTR} mène à la phosphorylation de **JNK** (c-Jun N-terminal Kinase). Cette kinase va à son tour phosphoryler les facteurs de transcription **c-Jun** et **p53**, mais aussi activer certaines protéines menant à la libération du **cytochrome c** par la mitochondrie comme **Bim**, **Bad** et **Bax**. La libération du **cytochrome C** provoque ensuite une cascade apoptotique par l'activation des **caspases 3, 6 et 9** (Nykjaer *et al.*, 2005). L'activation de p75^{NTR} conduit également à la synthèse de **céramides** via l'hydrolyse de sphingomyélines par des sphingomyélinases (Dobrowsky *et al.*, 1994). Ces céramides peuvent, à forte

INTRODUCTION

concentration, induire la mort cellulaire (Casaccia-Bonofil *et al.*, 1996). De manière intéressante, à faible concentration, ces céramides peuvent induire des effets inverses (Wang *et al.*, 1999), conduisant p75^{NTR} à des effets sur la survie cellulaire.

✓ Rôle dans la survie cellulaire

p75^{NTR} est en effet un récepteur aux effets très différents suivant le contexte cellulaire. Ainsi, il peut induire la survie cellulaire par les céramides, et plus généralement par l'activation de la voie **NFκB** (Nuclear Factor Kappa B) (Hamanoue *et al.*, 1999). Cette voie peut être activée de différentes manières. Bien que les signalisations n'aient pas encore été totalement élucidées, le recrutement des protéines adaptatrices **FAP1** (Fas-Associated Protein 1) et **RIP2** (Receptor-Interacting Protein 2) par p75^{NTR} permet une augmentation de l'activité transcriptionnelle de NFκB (Irie *et al.*, 1999; Khursigara *et al.*, 2001). Le clivage de p75^{NTR} joue également un rôle dans l'activation de cette voie. L'ubiquitylation de p75^{NTR} par TRAF6 permet la libération de p75^{NTR}-ICD dans le cytoplasme (Kanning *et al.*, 2003). Ce complexe p75^{NTR}-ICD / TRAF6 recrute ensuite la protéine d'échafaudage **p62** (PKC-interacting protein **p62**) qui va faire le lien entre le récepteur et la kinase **PKCι** (Protein Kinase C iota). Une fois activée, la PKC va induire une cascade de signalisation passant par **IRAK** (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase) et **IκK-β** (IκB Kinase Beta) qui va libérer **NFκB** de **IκB** (Inhibitor of kappa B) et donc favoriser la transcription NFκB-dépendante de gènes impliqués dans la survie cellulaire (Wooten *et al.*, 2001; Mamidipudi *et al.*, 2004; Powell *et al.*, 2009). Le recrutement de NRH2 peut également favoriser la survie neuronale par l'interaction avec les récepteurs de la famille des Trk.

INTRODUCTION

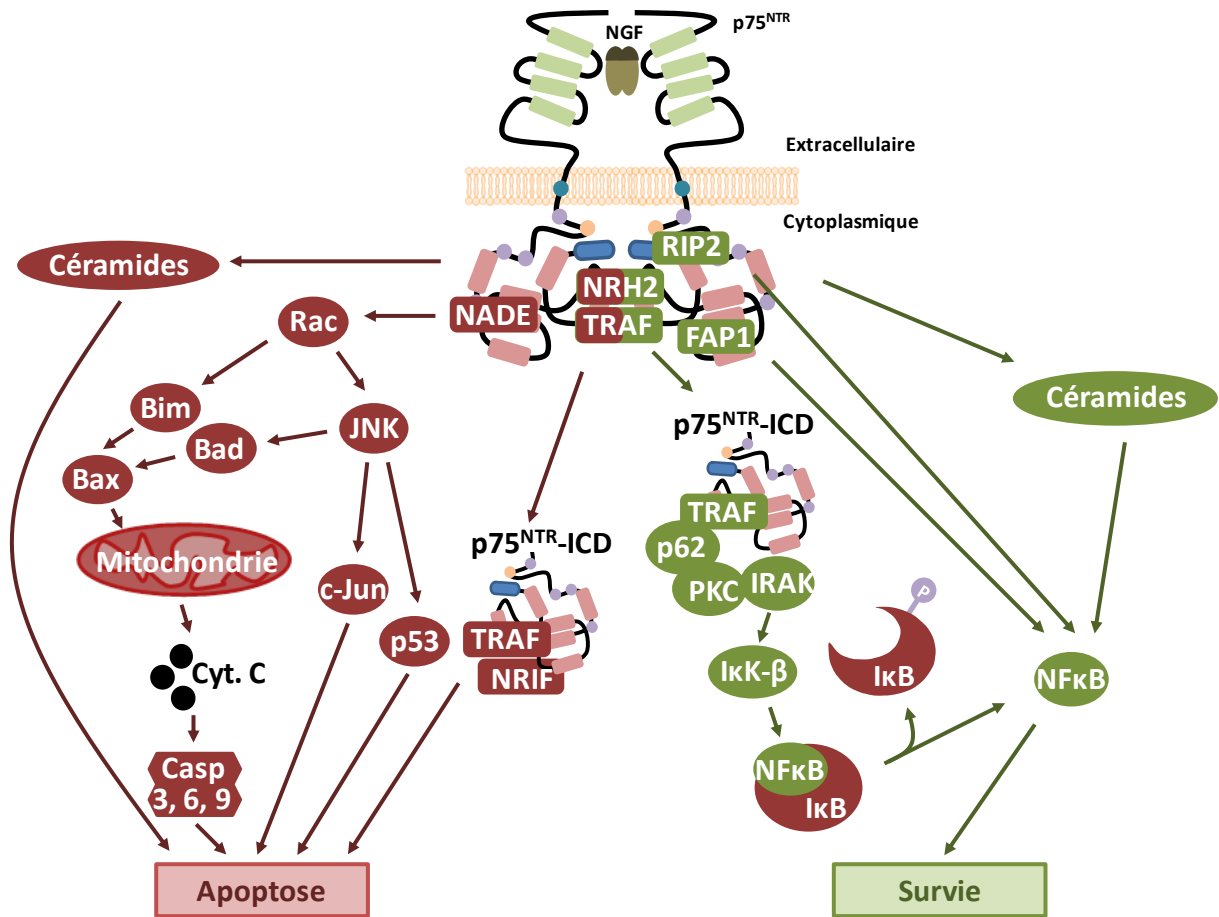


Figure 4 : Signalisation induites par p75^{NTR}

L'activation de p75^{NTR} mène au recrutement de protéines adaptatrices au niveau des différents domaines fonctionnels du récepteur. Ces protéines permettent, selon le contexte, la survie cellulaire (vert) ou l'apoptose (rouge). NADE, Neurotrophin Receptor associating Death Effector ; Rac, Ras-related C3 botulinum toxin ; Bim, Bcl-2-interacting mediator of cell death ; Bad, Bcl-2 antagonist of cell death ; Bax, Bcl-2-associated x protein ; Cyt. C, Cytochrome C ; Casp, Caspase ; JNK, c-Jun N-terminal Kinase ; c-Jun ; p53 ; p75^{NTR}-ICD, p75^{NTR}-IntraCellular Domain ; TRAF, TNF Receptor Associated Factor ; NRIF, Neurotrophin Receptor Interacting Factor ; NRH2, Neurotrophin Receptor Homologue 2 ; RIP2, Receptor-Interacting Protein 2 ; FAP1, Fas-Associated Protein 1 ; p62, PKC-interacting protein p62 ; PKC, Protein Kinase C ; IRAK, Interleukin-1 Receptor Associated Kinase ; IκK-β, IκB Kinase-Beta ; IκB, Inhibitor of kappa B ; NFκB, Nuclear Factor kappa .

INTRODUCTION

2. Les récepteurs *Tropomyosin-receptor kinases* (*Trk*)

a. Découverte

Le premier membre de la famille des récepteurs tyrosine kinase **Trk** a été identifié durant la fin des années 80 par l'équipe de Martin-Zanca. A l'origine de cette découverte, le séquençage d'une protéine oncogénique révéla que cette dernière était le résultat d'une fusion entre la tropomyosine et un récepteur tyrosine kinase encore non identifié (Martin-Zanca *et al.*, 1986). Ce récepteur a alors pris le nom de **Tropomyosine receptor kinase** et sa caractérisation complète a été publiée en 1989 (Martin-Zanca *et al.*, 1989). Par la suite, deux autres récepteurs présentant une forte homologie de séquence avec **Trk**, ont été purifiés. On les a appelé respectivement **TrkB** et **TrkC** (Klein *et al.*, 1989; Lamballe *et al.*, 1991). Le lien entre les différentes neurotrophines et ces récepteurs a été ensuite rapidement établi, définissant ainsi TrkA comme le récepteur de haute affinité du NGF et de la NT-3 (Cordon-Cardo *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1991), TrkB comme celui du BDNF, de la NT-3 et de la NT-4/5 (Klein *et al.*, 1991; Soppet *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1992), quant à TrkC il fut défini comme le récepteur à la NT-3 exclusivement (Lamballe *et al.*, 1991) (Figure 1).

b. Structure

✓ *Gènes*

TrkA, TrkB et TrkC sont respectivement codés par les gènes **NTRK1**, **2** et **3** répartis sur les chromosomes 1, 9 et 15. Ces trois gènes sont issus d'un même gène ancestral ayant subi deux événements de duplication (Hallbook 1999). Ils possèdent des séquences régulatrices permettant la fixation de facteurs de transcription tels que **NFκB**, **CREB** (**CAMP Response Element Binding**) ou encore le complexe **AP-1**. Leur transcription produit des ARNm comportant entre 19 et 24 exons et codant pour des récepteurs d'environ 800 acides aminés.

✓ *Protéines*

Les trois récepteurs présentent une structure conformationnelle similaire. Ce sont des récepteurs transmembranaires de type I avec une activité tyrosine kinase intrinsèque. Ils possèdent tous une région extracellulaire d'environ 400 acides aminés, une seule région transmembranaire d'une quinzaine d'acides aminés et une région cytoplasmique d'un peu plus de 350 acides aminés. Les domaines fonctionnels étant similaires pour les trois récepteurs, seule une description détaillée de la structure de TrkA sera réalisée ci-dessous (Figure 5).

INTRODUCTION

Domaine extracellulaire

Après clivage d'un peptide signal de 32 acides aminés, la protéine mature TrkA dispose d'une région extracellulaire de 391 acides aminés (A²⁷-G⁴¹⁷). Cette région est divisée en un groupement de 3 domaines riches en leucines (Y⁴⁰-L¹¹¹) encadrés de deux domaines riches en cystéines (C³⁰-L⁶⁵ et V¹³⁸-V¹⁸⁷) et suivis de deux domaines « Immunoglobulin-like » **Ig-C1** (P¹⁸⁸-S²⁷⁷) (**Immunoglobulin-like C2 type 1**) et **Ig-C2** (W²⁹³-N³⁵⁹) (**Immunoglobulin-like C2 type 2**) (Schneider *et al.*, 1991). Ces domaines jouent un rôle dans la fixation des ligands, mais aussi dans la dimérisation des récepteurs (Arevalo *et al.*, 2000; Wiesmann *et al.*, 2001). En plus de ces 5 domaines, la partie extracellulaire est fortement glycosylée (N⁸⁹, N¹¹⁵, N¹⁸², N²⁵⁶, N²⁷⁵, N³⁵²), faisant passer le récepteur de 80kDa à 140kDa, avec également l'existence d'une forme intermédiaire partiellement glycosylée de 110kDa (Wehrman *et al.*, 2007). Ces N-glycosylations sont nécessaires à la localisation du récepteur à la membrane plasmique et préviennent une éventuelle activation ligand-indépendante du récepteur (Watson *et al.*, 1999). Elles semblent également jouer un rôle direct dans la signalisation induite par les neurotrophines car un récepteur non glycosylé peut se dimériser sous l'effet de son ligand mais est incapable d'induire la réponse cellulaire attendue (Friedman *et al.*, 1999).

Domaines transmembranaire et intracellulaire

Le domaine transmembranaire de TrkA est composé d'une seule hélice α de 16 acides aminés (L⁴¹⁸-L⁴³³). Il est suivi par une région cytoplasmique de 357 acides aminés (N⁴³⁴-G⁷⁹⁰) abritant un domaine tyrosine kinase (I⁵⁰⁴-L⁷⁷⁵) responsable de l'activité catalytique du récepteur. Ce domaine tyrosine kinase contient 3 tyrosines (Y⁶⁷⁰, Y⁶⁷⁴, Y⁶⁷⁵) responsables de la trans-autophosphorylation du récepteur (Cunningham *et al.*, 1997). En dehors de ce domaine, quatre autres tyrosines phosphorylables (Y⁴⁹⁰, Y⁶⁹⁵, Y⁷⁵¹, Y⁷⁸⁵) permettent la signalisation du récepteur après recrutement de protéines adaptatrices (Obermeier *et al.*, 1993; Obermeier *et al.*, 1993).

INTRODUCTION

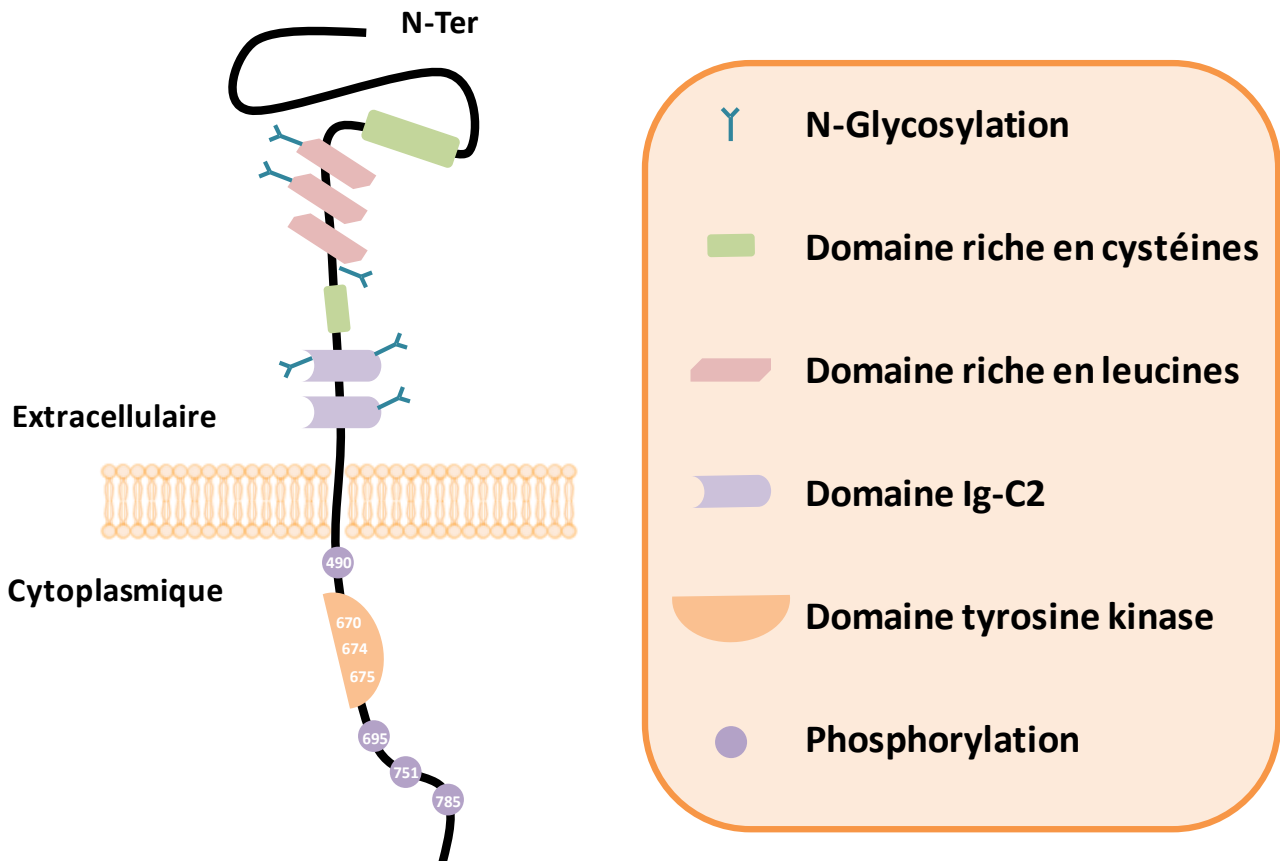


Figure 5 : Représentation schématique de TrkA

Le récepteur TrkA est composé d'une région extracellulaire qui comporte 2 domaines riches en cystéines (vert), 3 domaines riches en leucines (rouge) et 2 domaines Ig-C2 (violet), et plusieurs sites de glycosylation (Y). Il est suivi d'une région transmembranaire puis d'une région cytoplasmique qui comprend un domaine tyrosine kinase (orange) et plusieurs sites de phosphorylation (violet).

INTRODUCTION

✓ Isoformes

Tous les récepteurs de la famille des Trk possèdent différentes isoformes issues d'épissages alternatifs (Tableau 3).

Nom (protéine)		Gène / ARNm			Protéine	
Récepteur	Isoforme	N° NCBI	Exons	Taille	N° Uniprot	Taille
TrkA	TrkA-I	NM_001012331.1	16	2647	P04629-2	790
	TrkA-II	NM_002529.3	17	2663	P04629-1	796
	TrkA-III	NM_001007792.1	14	2581	P04629-4	698
TrkB	TrkB-FL	NM_006180.3	21	5560	Q16620-1	838
	TrkB-T1	NM_001007097.1	13	7111	Q16620-2	477
	TrkB-T-shc	NM_001018066.2	14	8292	Q16620-3	537
TrkC	TrkC-A	NM_001012338.1	19	2860	Q16288-1	839
	TrkC-B	NM_001007156.1	15	3997	Q16288-2	612
	TrkC-C	NM_002530.3	18	2818	Q16288-3	825
	TrkC-D	NM_001243101.1	18	2938	Q16288-4	830

Tableau 3 : Les isoformes des récepteurs Trks humains

Famille des récepteurs Trks, la localisation chromosomique de leurs gènes et les tailles des ARNm correspondants en paire de base. Le numéro d'accension NCBI correspond aux différentes isoformes associées. Le numéro d'accension Uniprot et la taille de la protéine en acides aminés correspondent à chaque isoforme décrite.

Isoformes de TrkA

Considéré comme canonique, l'isoforme **TrkA-II** est codée par 17 exons donnant un récepteur de pleine longueur (Figure 6). Cette isoforme est préférentiellement retrouvée dans les tissus neuronaux mais également, dans une moindre mesure, dans les reins et les poumons (Barker *et al.*, 1993). L'isoforme **TrkA-I** est, quant à elle, issue d'un épissage alternatif de l'exon 11, conduisant à la perte de 6 acides aminés. Cette séquence, retrouvée entre le domaine **Ig-C2** et le domaine transmembranaire, est appelée insert de spécificité. En effet, ces 6 acides aminés seraient impliqués dans la liaison avec **NT-3** (Clary *et al.*, 1994). **TrkA-I** est exprimé préférentiellement dans les tissus non-neuronaux, supposant des rôles différents de l'isoforme **TrkA-II**. L'épissage alternatif des exons 8 et 9 en plus de l'exon 11 mène à l'expression de l'isoforme **TrkA-III**. Cette isoforme semble être retrouvée dans les zones hypoxiques et participerait au développement des thymocytes (Tacconelli *et al.*, 2007). Enfin,

INTRODUCTION

Dubus et ses collaborateurs ont décrit deux dernières isoformes chez le rat (Dubus *et al.*, 2000). Elles sont retrouvées dans le thymus, les poumons, les testicules et les reins. Appelée respectivement **TrkA-L0** et **TrkA-L1**, elles présentent une délétion complète (pour **TrkA-L0**) ou partielle (pour **TrkA-L1**) de la région riche en leucines. Les conséquences fonctionnelles de cette délétion restent néanmoins mal connues.

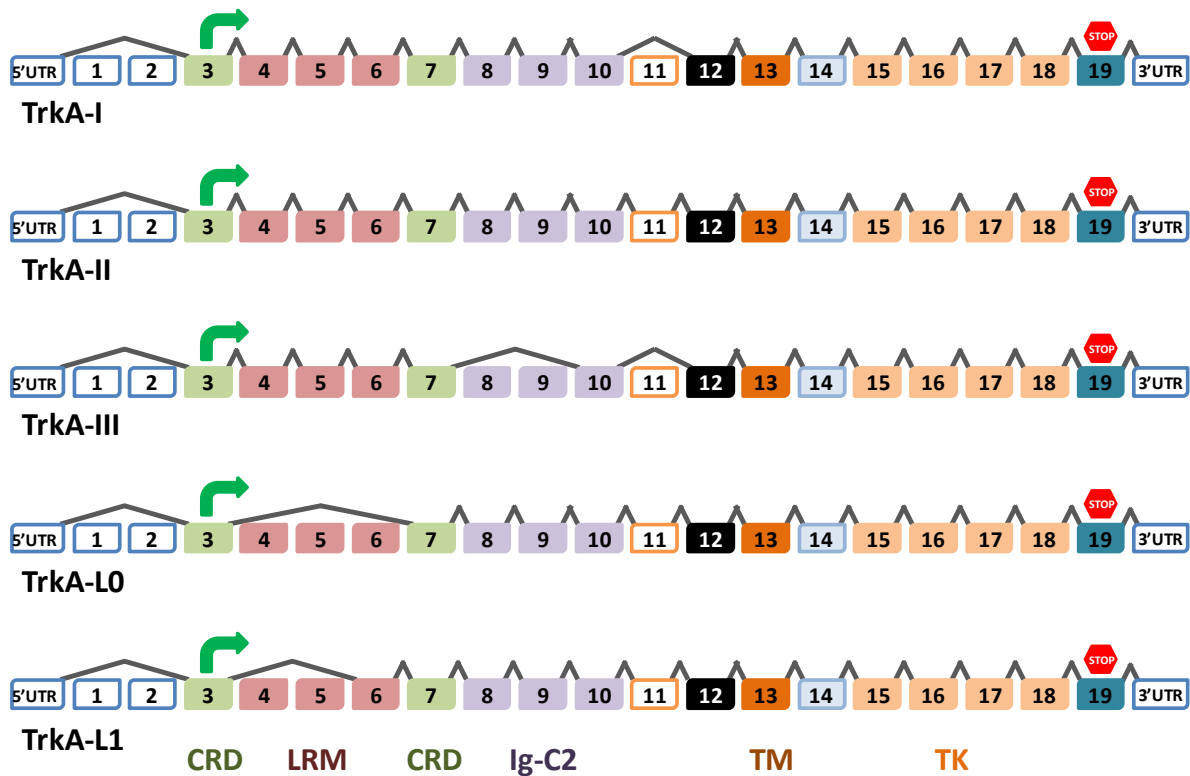


Figure 6 : Schéma représentatif des isoformes de TrkA

Chaque rectangle représente un exon du gène de *TrkA* encadré par les régions 5' et 3' UTR, UnTranslated Region. *TrkA-II* est l'isoforme la plus longue, *TrkA-I* est dépourvu de l'exon 11 qui correspond à l'insert de spécificité, *TrkA-III* est dépourvu des exons 8, 9 (domaine Ig-C2) et 11, *TrkA-L0* est dépourvu des exons 4, 5 et 6 (région riche en leucine) et *TrkA-L1* est dépourvu des exons 4 et 5. Encadré Bleu, région non traduite ; Vert, région riche en cystéines ; Rouge, région riche en leucines ; Violet, domaine Ig-C2 ; Encadré Orange, insert de spécificité ; Noir, core protéique ; Orange foncé, domaine transmembranaire ; Bleu clair, site de liaison à la PLC- γ ; Orange clair, domaine tyrosine kinase ; Bleu foncé, queue cytoplasmique.

INTRODUCTION

Isoformes de TrkB

Les isoformes de **TrkB** présentent des délétions de domaines fonctionnels différents de celle de **TrkA**. Ainsi, on retrouve 3 isoformes majoritaires de TrkB : **TrkB-FL** (**TrkB-Full Lenth**), **TrkB-T1** (**TrkB-Truncated 1**) et **TrkB-T-shc** (**TrkB-Truncated-Src homology 2 domain containin protein**) (Figure 7). Comme son nom l'indique TrkB-FL est l'isoforme de référence, de pleine longueur. TrkB-T1 est, quant à elle, une isoforme tronquée de la quasi-totalité de sa région cytoplasmique. Bien que retrouvée de façon prédominante dans de nombreux organes (cerveau, cœur, poumons,...), son rôle n'est pas complètement élucidé (Stoilov *et al.*, 2002). Elle pourrait jouer le rôle de dominant négatif de TrkB-FL (Haapasalo *et al.*, 2001) ou induire une signalisation cellulaire différente par sa courte région cytoplasmique (Ohira *et al.*, 2005). Enfin, TrkB-T-shc est une isoforme qui, comme TrkB-T1, présente un domaine cytoplasmique tronqué. Cependant, à la différence de TrkB-T1, cette isoforme possède encore le site de liaison à la protéine **Shc** (**S**rc **h**omology 2 **d**omain **c**ontaining **p**rotein) conduisant probablement à une activité biologique différente. L'expression de cette dernière est exclusivement cérébrale (Stoilov *et al.*, 2002).

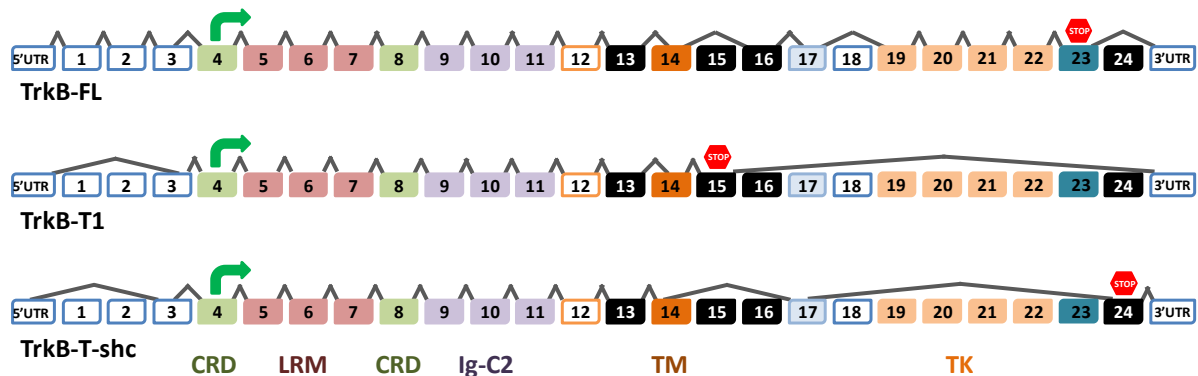


Figure 7 : Schéma représentatif des isoformes de TrkB

Chaque rectangle représente un exon du gène de TrkB encadré par les régions 5' et 3' UTR, UnTranslated Region. TrkB-FL est l'isoforme la plus longue mais dépourvue des exon 15 et 24 (complètement) et 14 et 17 (partiellement), TrkB-T1 est dépourvu des l'exons 16 à 24 (domaine cytoplasmique), TrkB-T-shc est dépourvu des exons 15 et 16 (complètement) et 14 et 17 (partiellement). Encadré Bleu, région non traduite ; Vert, région riche en cystéines ; Rouge, région riche en leucines ; Violet, domaine Ig-C2 ; Encadré Orange, insert de spécificité ; Noir, core protéique; Orange foncé, domaine transmembranaire ; Bleu clair, site de liaison à la PLC- γ ; Orange clair, domaine tyrosine kinase ; Bleu foncé, queue cytoplasmique.

INTRODUCTION

Isoformes de TrkC

De la même manière que TrkA et TrkB, TrkC subit un épissage alternatif conduisant à l'expression de différentes isoformes (Figure 8). La séquence de référence pour TrkC est celle de **TrkC-C**. Comparée à celle-ci, **TrkC-A** présente une insertion de 14 acides aminés (codés par l'exon 20) située dans le domaine tyrosine kinase (McGregor *et al.*, 1994). Cette insertion empêche la fixation des protéines adaptatrices shc et PLCY (Guiton *et al.*, 1995). Concernant l'isoforme **TrkC-B**, l'épissage alternatif conduit à une large délétion de la région cytoplasmique, emportant notamment le domaine tyrosine kinase (Shelton *et al.*, 1995). Celle-ci pourrait avoir, tout comme TrkB-T1, un effet dominant négatif sur TrkC-C (Palko *et al.*, 1999). Enfin, une dernière isoforme, **TrkC-D**, subit un épissage de l'exon 10 mais pas de l'exon 20. Ainsi, tout comme TrkC-A, l'insertion de 14 acides aminés empêche la fixation de shc et PLCY. Cependant, la délétion de l'exon 10 codant pour 9 acides aminés pourrait avoir des conséquences sur la spécificité de liaison ligand/récepteur. En effet, L'exon 10 de TrkC est très homologue à l'insert de spécificité codé par l'exon 11 de TrkA (Shelton *et al.*, 1995).

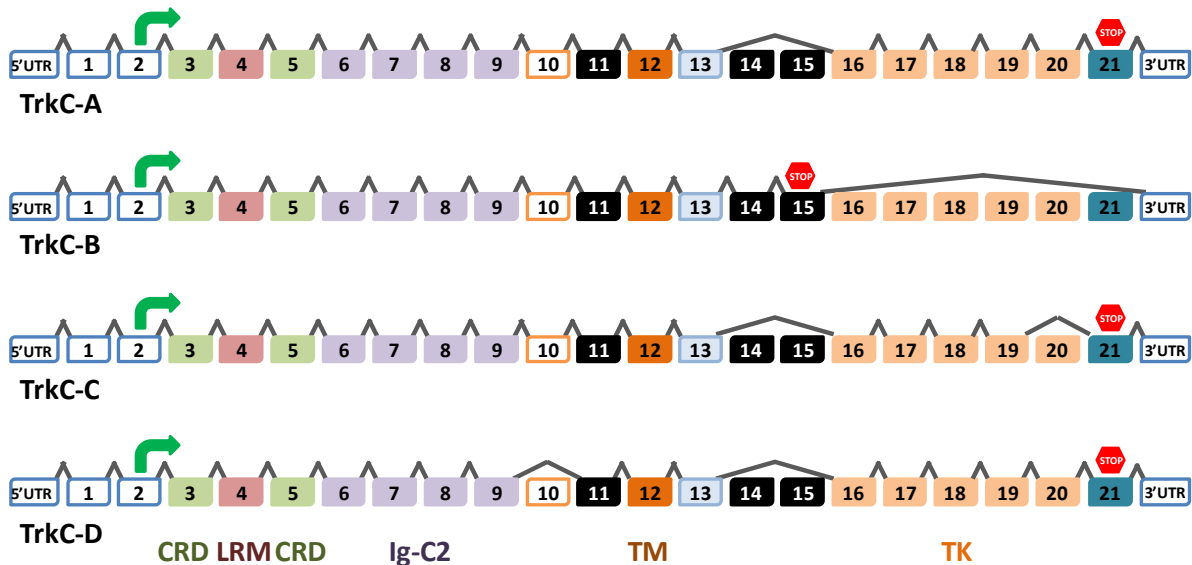


Figure 8 : Schéma représentatif des isoformes de TrkC

Chaque rectangle représente un exon du gène de TrkC encadré par les régions 5' et 3' UTR, UnTranslated Region. TrkC-A est l'isoforme la plus longue mais dépourvue des exon 14 et 15, TrkC-B est pourvu de l'exon 15 qui contient un codon stop, TrkC-C est dépourvu des exons 14, 15 et 20, TrkC-D est dépourvu des exons 10, 14 et 15. Encadré Bleu, région non traduite ; Vert, région riche en cystéines ; Rouge, région riche en leucines ; Violet, domaine Ig-C2 ; Encadré Orange, insert de spécificité ; Noir, core protéique; Orange foncé, domaine transmembranaire ; Bleu clair, site de liaison à la PLC- γ ; Orange clair, domaine tyrosine kinase ; Bleu foncé, queue cytoplasmique.

INTRODUCTION

c. Interaction avec les ligands

✓ *Interaction Trk/neurotrophines*

C'est au début des années 90 que l'activation des récepteurs Trks par les neurotrophines a été démontrée. Afin de déterminer les motifs d'interaction entre les ligands et ces récepteurs, des protéines chimériques ont été réalisées. En remplaçant les différents domaines extracellulaires d'un récepteur Trk par ceux d'un autre membre de la famille, deux équipes différentes ont démontré simultanément l'importance du domaine **Ig-C2** dans la liaison neurotrophine/Trk (Perez *et al.*, 1995; Urfer *et al.*, 1995). Le domaine **Ig-C1**, quant à lui, semble participer au maintien à l'état monomérique du récepteur en l'absence du ligand (prévention d'une auto-activation du récepteur) (Arevalo *et al.*, 2000). Des analyses par cristallographie ont ensuite permis d'établir avec précision deux motifs responsables de l'interaction entre les neurotrophines et les récepteurs Trks (Butte *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 1999; Ultsch *et al.*, 1999; Wiesmann *et al.*, 1999; Wehrman *et al.*, 2007). Le premier, appelé « conserved patch » est un motif de 15 acides aminés situés dans la partie C-terminale du domaine Ig-C2 des récepteurs qui interagit avec 23 acides aminés des neurotrophines matures. Ces séquences d'interactions sont très conservées entre les différents membres de la famille (8 résidus sur 15 pour les récepteurs, 14 sur 23 pour les neurotrophines). Le second motif, appelé « specificity patch », permet la spécificité de liaison d'une neurotrophine pour son récepteur. Dans le cas du BDNF et NT-4/5, ce second motif est très similaire (5 acides aminés en commun sur 7) ce qui explique l'affinité commune pour TrkB. Enfin, comme décrit précédemment, les récepteurs disposent d'un insert de spécificité juxtamembranaire, dont l'expression est régulée par épissage alternatif, permettant l'interaction avec NT-3 (Clary *et al.*, 1994; Ivanisevic *et al.*, 2007).

L'affinité des neurotrophines pour leurs récepteurs est également modifiée par la présence de p75^{NTR}. En effet, des études ont montré que p75^{NTR} présenterait les neurotrophines aux récepteurs Trks permettant d'augmenter l'affinité des ligands pour ceux-ci (Barker 2007; Wehrman *et al.*, 2007). En outre, il augmenterait également la spécificité d'interaction des récepteurs Trks pour leur ligand de prédilection, en empêchant l'activation de TrkA et TrkB par NT-3, et en limitant l'interaction de NT-4/5 avec TrkB (Benedetti *et al.*, 1993; Clary *et al.*, 1994; Bibel *et al.*, 1999; Brennan *et al.*, 1999; Kuruvilla *et al.*, 2004).

INTRODUCTION

✓ Interaction Trk/proneurotrophines

Comme décrit précédemment, les effets biologiques des proneurotrophines n'ont été découverts que dans les années 2000, 50 ans après la découverte des effets des neurotrophines matures (Lee *et al.*, 2001). Dans cette étude, Lee et ses collaborateurs montrent que les effets biologiques du proNGF ne passent pas par l'activation de TrkA. Cependant, d'autres études, réalisées plus tard, démontrent une interaction entre la proneurotrophine et ce récepteur (Nykjaer *et al.*, 2004), bien que 10 fois plus faible que l'interaction NGF / TrkA (Fahnestock *et al.*, 2004). En réalité, la capacité du proNGF à activer ou non TrkA dépend du contexte cellulaire. Ainsi, sur des neurones de souris jeunes, le proNGF stimule la neuritogénèse et la survie cellulaire par l'activation de TrkA, alors que sur des neurones issus de souris âgées, une augmentation de l'expression de la sortiline favorise une réponse pro-apoptotique de la proneurotrophine (Al-Shawi *et al.*, 2008). Ces observations sont confortées par des travaux réalisés sur les cellules **PC12** montrant une sous-population dont le traitement au proNGF mène à des effets pro-apoptotiques alors que la population totale traitée présente une augmentation de la survie cellulaire. Cette sous-population a la particularité d'avoir un ratio d'expression $p75^{\text{NTR}} / \text{TrkA}$ augmenté, soulignant ainsi l'importance du taux d'expression de chaque co-récepteur ($p75^{\text{NTR}}$, sortiline et TrkA) dans la régulation de l'activité biologique des proneurotrophines (Masoudi *et al.*, 2009).

d. Voies de signalisation induites

L'activation des récepteurs se fait suite à une dimérisation du récepteur induite par le ligand. Les récepteurs seraient ensuite trans-autophosphorylés sur des résidus tyrosines (Lemmon *et al.*, 2010). Des travaux récents montrent cependant que le ligand n'induirait pas la dimérisation des récepteurs mais plutôt un changement conformationnel d'homodimères pré-formés (Shen *et al.*, 2011). Les premiers résidus phosphorylés sont ceux du domaine tyrosine kinase, puis vient le tour des tyrosines de la queue cytoplasmique du récepteur, ce qui permet, *in fine*, le recrutement de protéines adaptatrices (Stephens *et al.*, 1994) (Figure 5). Dans l'étude de l'axe NGF / TrkA, 3 grandes voies de signalisation ont été décrites : la voie **PI3-K (PhosphoInositide 3 Kinase)**, la voie des **MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases)** et la voie **PLC-PKC (PhosphoLipase C – Protein Kinase C)** (Figure 9). Ces signalisations ont ensuite été extrapolées aux autres récepteurs de la famille (Chao 2003).

INTRODUCTION

✓ PI3-K

La voie PI3-K est essentielle à la survie cellulaire induite par les neurotrophines (Figure 9). Elle est activée suite au recrutement de la protéine adaptatrice **Shc** (**S**rc **h**omology 2 domain **c**ontaining **p**rotein) sur la tyrosine phosphorylée juxtamembranaire (Y⁴⁶⁴ pour TrkA-II) (Dikic *et al.*, 1995). Shc forme alors un complexe avec Grb2, Gab1 et enfin la PI3-K (Holgado-Madruga *et al.*, 1997; Korhonen *et al.*, 1999). Dans d'autres types cellulaires, ce sont les protéines adaptatrices **IRS-1** (**I**nsulin **R**eceptor **S**ubstrate **1**) et IRS-2 qui pourraient permettre le recrutement de la PI3-K (Yamada *et al.*, 1997). Enfin, cette dernière peut être recrutée directement sur une tyrosine de la queue C-terminale (Y⁷²⁵ pour TrkA-II) *via* sa sous-unité **p85** (Ohmichi *et al.*, 1992; Obermeier *et al.*, 1993). Après activation d'Akt, les effecteurs de cette signalisation sont la protéine NFκB, dont la phosphorylation est activatrice, et les protéines Bad et Forkhead qui, une fois phosphorylées, sont séquestrées par 14-3-3 (Datta *et al.*, 1997; Brunet *et al.*, 1999; Foehr *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2002).

De manière intéressante, la voie PI3-K peut être également initiée suite à la transactivation de TrkA par des **RCPG** (**R**écepteur **C**ouplé aux **P**rotéines **G**). Ainsi, l'activation du récepteur **A_{2A}** par l'adénosine conduit à l'activation de **Fyn** ce qui conduit à la phosphorylation de TrkA, de manière complètement indépendante du NGF. Cette phosphorylation de TrkA a pour conséquence l'activation de la voie PI3-K / Akt décrite ci-dessus (Lee *et al.*, 2001; Rajagopal *et al.*, 2006). L'adénosine peut également agir *via* le récepteur **PACAP** (**P**ituitary **A**denylate **C**yclase **A**ctivating **P**eptide) pour produire les mêmes effets sur TrkA *via* la protéine Src (Lee *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2010). Plus généralement, l'activation de l'adénylyl cyclase menant à l'augmentation d'**AMPc** (**A**dénosine **M**ono**P**hosphate cyclique) permet ce type de transactivation (Piiper *et al.*, 2002). Ensemble, ces données soulignent l'importance des communications croisées entre les récepteurs.

✓ MAPK

L'axe (pro)neurotrophine / Trk peut induire deux types d'activation de la voie MAPK impliquant des protéines adaptatrices différentes (Figure 9).

Le premier type est une activation brève, passant par la RhoGTPase Ras (Hagag *et al.*, 1986; Qiu *et al.*, 1991). Tout comme l'activation de la PI3-K, Ras nécessite le recrutement de Shc et Grb2 à partir de la phospho-tyrosine juxtamembranaire du récepteur pour induire une cascade de signalisation. Cette cascade passe ensuite par le recrutement de **SOS** (**S**on **O**f **S**evenless) puis par l'activation des kinases **Raf** (**R**apidly **a**ccelerated **f**ibrosarcoma) (Raf-1 et B-Raf) et des MAPK (Nimnual *et al.*, 1998). Enfin, ce sont les kinases **Rsk** (**R**ibosomal

INTRODUCTION

proteins **s6 kinase**) et **MSK1** (**Mitogen and Stress-activated protein Kinase 1**) qui vont être à leurs tours activées et permettre la phosphorylation du facteur de transcription **CREB** (Xing *et al.*, 1996; Deak *et al.*, 1998). Ce dernier va alors induire la transcription de gènes impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire (Lonze *et al.*, 2002). L'ensemble de cette signalisation est régulée négativement par la Neurofibromine (qui inactive directement Ras) et par les MAPK elles-mêmes (Vogel *et al.*, 2000). En effet, les MAPK induisent l'activation de GEF-SOS qui mène à la dissociation du complexe Grb2 / SOS et donc à un rétrocontrôle rapide de la voie de signalisation (Kao *et al.*, 2001).

Le second type d'activation de la voie MAPK permet une signalisation prolongée dans le temps. Elle nécessite l'internalisation du récepteur par les cavéoles ou par macropinocytose (Peiro *et al.*, 2000; Valdez *et al.*, 2005; Philippidou *et al.*, 2011). Ces types d'endocytoses sont régulés respectivement par la cavéoline et la protéine Pincher. Elles aboutissent à la formation d'endosomes de signalisation, essentiels pour le transport rétrograde (axone vers corps cellulaire) du complexe NGF / TrkA dans les neurones (Grimes *et al.*, 1996). Ce transport est requis pour induire une signalisation efficace dans les corps cellulaires neuronaux. Ainsi, tout au long du transport rétrograde de l'endosome de signalisation, une plateforme de signalisation est maintenue conduisant à l'activation prolongée de la voie MAPK (York *et al.*, 1998; Delcroix *et al.*, 2003). Dans ces endosomes, la protéine adaptatrice **Frs2** (**FGF receptor substrate 2**) reconnaît la phospho-tyrosine juxtamembranaire et recruterait CrkL (Kao *et al.*, 2001). Le rôle de Frs2 est néanmoins controversé (Wu *et al.*, 2001; Postigo *et al.*, 2002) et le recrutement de CrkL pourrait passer par la protéine **ARMS** (**Ankiran Repeat-rich Membrane Spaning**) (Kong *et al.*, 2001; Arevalo *et al.*, 2004; Arevalo *et al.*, 2006). Quelque soit le mode de recrutement de CrkL, cette dernière va activer C3G, une GEF qui va agir sur **Rap1** (**Ras-related protein 1**) (York *et al.*, 1998; Birge *et al.*, 2009). Rap1 active ensuite B-Raf pour enfin mener à la phosphorylation des MAPK. Tout comme l'activation brève de la voie, les MAPK vont activer Rsk et MSK1 permettant la phosphorylation de CREB et stimuler ainsi la transcription de gènes liés à la survie et la différenciation cellulaire. De manière intéressante, une phosphatase joue également un rôle dans l'activation prolongée des MAPK. En effet, après fixation de la protéine adaptatrice NIMA-GAP sur le récepteur, la phosphatase **SHP2** (**Src-Homology 2 containing tyrosine Phosphatase 2**) est recrutée et permet une activation prolongée de la MAPK **Erk5** (**Extracellular-signal-regulated kinase 5**) (Rosario *et al.*, 2007). Cette activation nécessite également l'endocytose du récepteur. Elle conduit à la phosphorylation de **MEF2D** (**MADS**

INTRODUCTION

box transcription Enhancer Factor 2 polypeptide D) qui est un facteur de transcription permettant l'expression de gènes anti-apoptotiques comme Bcl-w (Pazyra-Murphy *et al.*, 2009).

✓ *PLCY-PKC*

L'activation de la voie PLCY-PKC nécessite la phosphorylation de la tyrosine 759 (pour TrkA-II) située sur la queue cytoplasmique du récepteur (Vetter *et al.*, 1991; Obermeier *et al.*, 1993; Stephens *et al.*, 1994) (Figure 9). Cette phosphotyrosine va directement être reconnue par PLC- γ 1 qui va alors induire l'hydrolyse de **PIP2** (Phosphatidyl Inositol 4,5-biPhosphate) produisant ainsi de l'**IP3** (Inositol 1,4,5-triPhosphate) et du **DAG** (DiAcylGlycerol). L'IP3 va se fixer sur son récepteur IP3R situé à la membrane du réticulum endoplasmique et permettre l'ouverture des canaux calciques. Cela va entraîner une augmentation de la concentration en ions calciques (Ca^{2+}) dans le cytoplasme et conduire à l'activation des kinases PKC et **CAMK** (Ca^{2+} /CALMODULIN-regulated protein Kinase). Le DAG va, quant à lui, concentrer la PKC à la membrane plasmique pour faciliter son activation (Singer *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000). Une fois activée, la PKC va favoriser l'activité transcriptionnelle de CREB à travers l'activation de la voie des MAPK (Obermeier *et al.*, 1994; Corbit *et al.*, 1999; Wooten *et al.*, 2000). La CAMK mènera aux mêmes effets par une phosphorylation directe du facteur de transcription (Curtis *et al.*, 1999). Enfin, une autre voie d'activation de la PKC, cette fois-ci dépendante de la phosphotyrosine juxtamembranaire, a également été décrite. Elle met en jeu la protéine adaptatrice Frs2 qui peut recruter la protéine **Src** qui va elle-même directement phosphoryler la PKC- τ (Wooten *et al.*, 2001).

✓ *Le rétrocontrôle du récepteur*

L'activation de TrkA est finement régulée, ce qui nécessite des mécanismes de rétrocontrôle. Pour cela, il existe 3 grands mécanismes : l'internalisation, la déphosphorylation et le clivage protéolytique.

L'internalisation permet, soit la dégradation du récepteur, soit son recyclage. Dans le cas des récepteurs Trks, elle peut se faire par une endocytose dépendante de la clathrine, dépendante de la cavéoline ou encore par macropinocytose (Bilderback *et al.*, 1999; Beattie *et al.*, 2000; Jullien *et al.*, 2003). Les endosomes précoces ainsi formés peuvent suivre plusieurs voies différentes. Soit ils sont dirigés vers une voie de recyclage, pour induire un ré-adressage membranaire du récepteur (Chen *et al.*, 2005). Soit ils sont dirigés vers des endosomes tardifs

INTRODUCTION

qui mèneront à la dégradation du récepteur après fusion avec des lysosomes (Takahashi *et al.*, 2011). Enfin, l'internalisation peut également conduire à la formation des endosomes de signalisation décrits précédemment (Valdez *et al.*, 2007). Le destin du récepteur tient en partie à l'activité tyrosine kinase de ce dernier. En effet, le récepteur dépourvu de domaine tyrosine kinase sera plutôt dirigé vers les endosomes de recyclage alors que les récepteurs possédant une activité tyrosine kinase seront plutôt redirigés vers les endosomes tardifs (Alderson *et al.*, 2000). Ce destin est également dépendant de la polyubiquitinylation du récepteur par **TRAF6** (**T**NF **R**eceptor **A**ssociated **F**actor **6**), ou de sa monoubiquitinylation par c-Cbl ou **NEDD4-2** (**N**eural precursor cell **E**xpressed, **D**evelopmentally **D**own regulated **4-2**) (Arevalo *et al.*, 2006; Jadhav *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2011). Ces modifications post-traductionnelles conduisent à la dégradation de ce dernier. Enfin, le recrutement de l'endophiline B1 au niveau des endosomes précoces favoriserait plutôt le recyclage du récepteur (Wan *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2009).

La régulation de l'activité des Trks se fait également par le recrutement de phosphatases qui déphosphoryleront ces derniers. Ainsi, la protéine SHP-1 est recrutée par la phospho-tyrosine juxtamembranaire et peut déphosphoryler les tyrosines du domaine tyrosine kinase (Marsh *et al.*, 2003; Montano 2009). Certains membres de la famille des **RPTP** (**R**eceptor-type **P**rotein **T**yrosine **P**hosphatase) ont également été décrits comme ayant des effets similaires (Shintani *et al.*, 2001; Faux *et al.*, 2007; Shintani *et al.*, 2008).

Enfin, une forme soluble de TrkA, issue d'un clivage du récepteur a été retrouvée *in vitro* et *in vivo*. Des études ont montré que le clivage est dépendant de la stimulation au NGF et pourrait donc constituer un autre mécanisme de régulation de l'activité du récepteur (Cabrera *et al.*, 1996; Ancot *et al.*, 2009).

INTRODUCTION

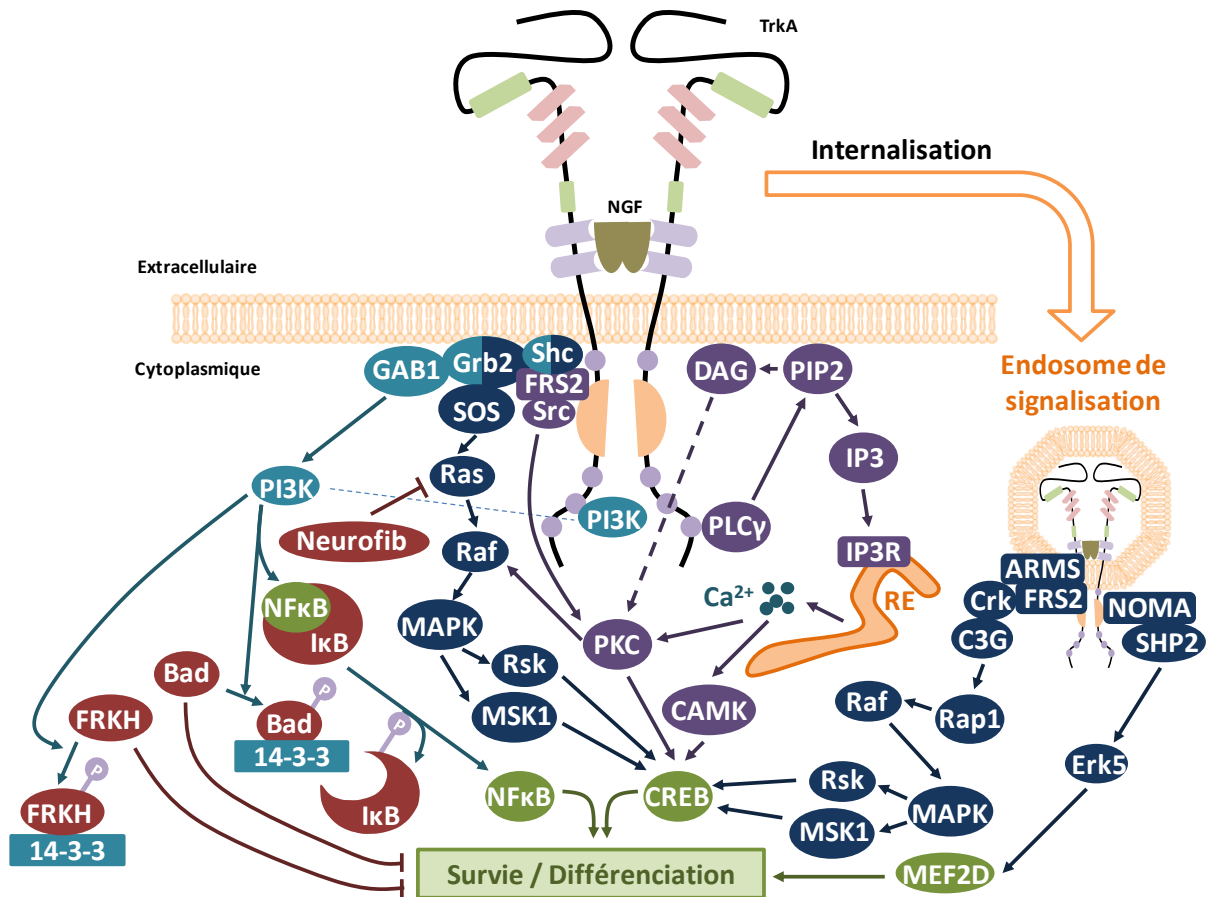


Figure 9 : Signalisations induites par les récepteurs Trk, exemple de TrkA

Le récepteur TrkA est activé par la fixation du NGF ce qui permet la trans-autophosphorylation des tyrosines Y^{670} , Y^{674} et Y^{675} du domaine tyrosine kinase, puis des résidus Y^{490} , Y^{695} , Y^{751} et Y^{785} induisant le recrutement de protéines adaptatrices. Shc et Frs2 se fixent sur Y^{490} , p85-PI3-K sur Y^{751} , et la PLCY sur le résidu Y^{785} . Les voies de signalisation activées vont conduire à la survie, la différenciation et dans certains cas la motilité des cellules. Shc, Src homology-2 containing protein ; FRS2, Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2 ; Src ; PKC, Protein Kinase C ; CREB, Cyclic AMP-Responsive Element Binding Protein ; SOS, Son Of Sevenless ; Ras ; Raf ; MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase ; Rsk, Ribosomal protein s6 kinase ; MSK1, Mitogen and Stress activated protein Kinase 1 ; NFkB, Nuclear Factor kappa B ; Neurofib ; Grb2, Growth factor receptor-bound protein 2 ; Gab1, Grb2-associated-binding protein 1 ; PI3-K, PhosphoInositide 3-Kinase ; IkB, Inhibitor of kappa B ; Bad, Bcl2-antagonist of cell death ; FRKH, Forkhead ; 14-3-3 ; PLCY, PhosphoLipase C gamma ; DAG, DiAcylGlycerol ; PIP2, PosphatidylInositol 4,5 bisPosphate ; IP3, Inositol 1,4,5 triPhosphate ; IP3R, Inositol 1,4,5 triPhosphate receptor ; CAMK, Calcium/Calmodulin-regulated protein kinase ; ARMS, Ankyrin repeat-Rich Membrane Spanning protein ; Crk ; C3G, Rap guanine nucleotide exchange factor 1 ; Rap1, Ras-related protein 1 ; NOMA, Neurite Outgrowth MultiAdaptator ; SHP2, Src-Homology-2 containing tyrosine-protein Phosphatase ; Erk5, Extracellular signal-regulated kinase 5 ; MEF2D, Myocyte-specific Enhancer Factor 2.

INTRODUCTION

3. La sortiline

a. Découverte

La **sortiline** est un récepteur qui est commun à toutes les proneurotrophines. Elle a été découverte simultanément par plusieurs équipes en 1997-1998 (Lin *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 1997; Mazella *et al.*, 1998). C'est pour cela qu'elle porte également le nom de **gp110** (**glycoprotein 110**) et **NTR3** (**NeuroTensin Receptor 3**). Ainsi, la sortiline a été identifiée alors que l'équipe de Petersen essayait de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'adressage des récepteurs de la famille des **LDLR** (**Low Density Lipoprotein Receptor**). Mazella et ses collaborateurs tentaient, quant à eux, d'identifier les récepteurs de la neurotensine lorsqu'ils ont découvert la sortiline (appelée alors NTR3) par chromatographie. Enfin c'est en travaillant sur la régulation du taux de glucose plasmatique que le groupe de Lin a mis en évidence une glycoprotéine de 110kDa (gp110) qui, après séquençage s'est avérée être la sortiline.

b. Structure

✓ Gène

La sortiline est codée par le gène SORT1 situé sur le chromosome 1 (p21.3-p13.1). Ce gène est composé de 20 exons répartis sur 50 kb (Hampe *et al.*, 2001). Ce gène est la cible de facteurs de transcription comme **MITF** (**M**icrophthalmia-**A**ssociated **T**ranscription **F**actor) ou encore **NeuroD6** (**N**eurogenic **D**ifferentiation factor **6**) (Li *et al.*, 2007; Hoek *et al.*, 2008). Sans être complètement ubiquitaire, son ARNm est retrouvé dans de nombreux tissus tels que le cerveau, la moelle épinière, le cœur, les muscles striés squelettiques, la thyroïde, les testicules ou encore le sein (Mazella 2001; Somai *et al.*, 2002).

Nom (protéine)	Gène / ARNm			Protéine	
	N° NCBI	Localisation	Taille	N° Uniprot	Taille
sortiline	NM_002959.4	1p21.3-p13.1	7018	Q99023	831

Tableau 4 : La sortiline humaine

La sortiline, la localisation chromosomique de son gène et la taille de l'ARNm correspondant en paire de base. Le numéro d'accèsion NCBI correspond au transcrit majoritaire. Le numéro d'accèsion Uniprot et la taille de la protéine en acide aminé correspondent à la forme complète du récepteur.

INTRODUCTION

✓ Protéine

Une fois synthétisée, la protéine se présente sous la forme d'une pré-pro-sortiline de 832 acides aminés. Le peptide signal de 33 acides aminés est éliminé pour donner un récepteur transmembranaire de type I. Le propeptide (44 acides aminés) peut, quant à lui, être à son tour clivé par la furine rendant ainsi le récepteur accessible aux ligands (Munck Petersen *et al.*, 1999). La protéine mature, de 753 acides aminés, est composée d'une grande région extracellulaire de 678 acides aminés (S¹ à N⁶⁷⁸), d'un domaine transmembranaire de 23 acides aminés (S⁶⁷⁹ à V⁷⁰¹) et d'une petite région cytoplasmique de 53 acides aminés (K⁷⁰² à E⁷⁵⁴) (Figure 10).

Domaine extracellulaire

La partie extracellulaire est principalement constituée de la structure **Vps10p** (Vacuolar protein sorting 10 protein). Cette structure d'environ 670 acides aminés contient un domaine β -propeller formé de 10 hélices β (S¹ à E⁵³²) et d'un module de 10 cystéines conservées appelé 10CC (R⁵³³ à K⁶⁷²) formant 5 ponts disulfures (Westergaard *et al.*, 2004; Quistgaard *et al.*, 2009). Cette région est également glycosylée, portant le récepteur de 95 à 100 kDa. Chez l'Homme, seules 5 protéines possèdent un domaine Vps10p. Il s'agit de **SORLA** (SORtilin-related Receptor L(DRL class) A), **SORCS1** (SORtilin-related receptor CNS expressed 1), **SORCS2**, **SORCS3** et de la **sortiline**. L'étude du domaine Vps10p montre que les deux régions (β -propeller et 10CC) semblent être impliquées dans la liaison de la sortiline avec ses ligands (Westergaard *et al.*, 2004; Paiardini *et al.*, 2008).

Domaine transmembranaire et intracellulaire

Le domaine transmembranaire est composé d'une seule hélice hydrophobe insérant le récepteur dans la membrane plasmique. Il est suivi par un domaine cytoplasmique court abritant 3 motifs d'interaction différents, également retrouvé dans le récepteur **CI-M6P/IGF-2R** (Cation Independant-Mannose 6-Phosphate / Insulin Growth Factor Receptor), protéine impliquée dans la régulation du trafic intracellulaire (Puertollano *et al.*, 2001). Le premier motif, Y⁷¹⁵SVL⁷¹⁸, joue un rôle dans l'endocytose du récepteur. Le second, D⁷⁴⁷SDED⁷⁵¹, est un cluster acide phosphorylable probablement impliqué dans le recyclage de ce dernier. Enfin, le motif dileucine (L⁷⁵²L⁷⁵³) est impliqué dans la régulation du trafic intracellulaire de protéines cytoplasmiques par la sortiline.

INTRODUCTION

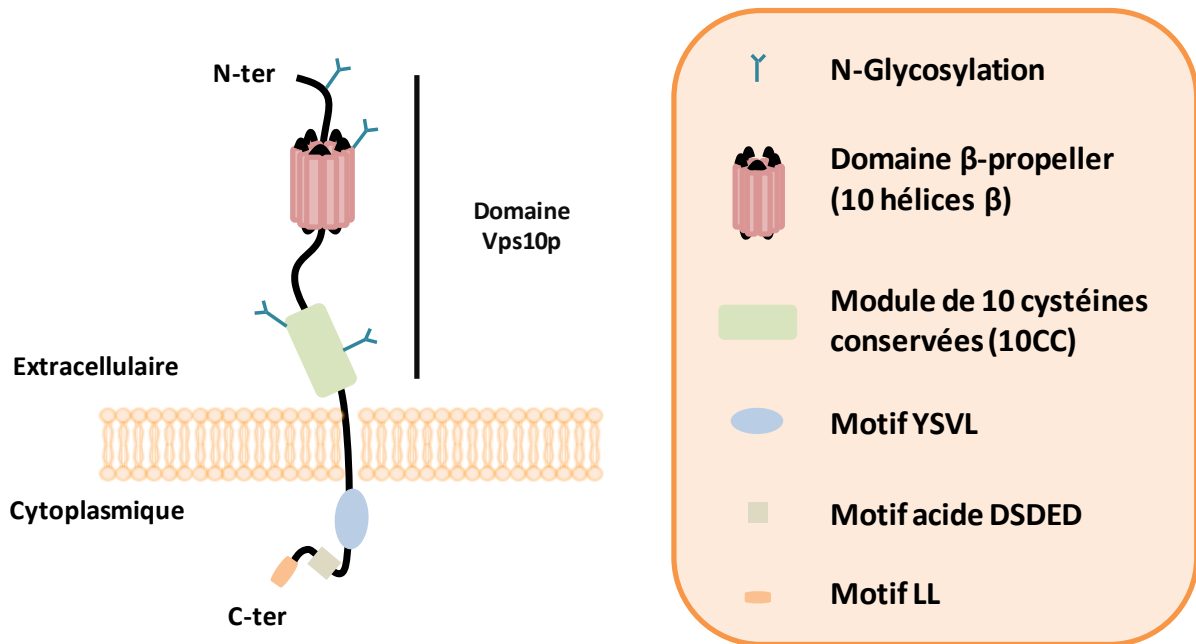


Figure 10 : Représentation schématique de la sortiline

La sortiline est composée d'un domaine extracellulaire qui comporte un domaine β -propeller (rouge), un domaine riche en cystéines (vert), et plusieurs sites de glycosylation (Y). Il est suivi d'un domaine transmembranaire, puis d'un domaine cytoplasmique qui comprend un motif d'interaction YSVL (bleu), un motif acide DSDED (vert foncé) et un motif dileucines LL (orange).

c. Interaction avec les ligands

La **sortiline** possède de nombreux ligands. Parmi eux, la neurotensine, **RAP** (Receptor Associated Protein), **LpL** (Lipoprotein Lipase), les proneurotrophines, ou encore **apoA-V** (apolipoprotein A-V) (Mazella *et al.*, 1998; Tauris *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1999; Nykjaer *et al.*, 2004; Nilsson *et al.*, 2008).

L'interaction de la sortiline avec ses ligands dépend exclusivement du domaine **Vps10p**. Afin de déterminer quelle partie du domaine (β -propeller ou 10CC) est requise pour la fixation des ligands, une équipe a remplacé le module 10CC de la sortiline par le module 10CC de SORLA, un autre récepteur de la même famille (Westergaard *et al.*, 2004). Ces travaux ont montré que la protéine chimérique n'interagissait plus avec les ligands de la sortiline mais avec les ligands de SORLA. Le module 10CC est donc essentiel à la spécificité de la liaison ligand-récepteur. D'autres études ont néanmoins souligné le rôle de la partie β -propeller dans ces interactions. Une modélisation informatique et une comparaison avec d'autres récepteurs possédant une partie β -propeller similaire ont permis d'émettre l'hypothèse que les ligands se fixaient directement sur cette partie (Paiardini *et al.*, 2008).

INTRODUCTION

Cette hypothèse a été confirmée par les travaux de Quistgaard et de ses collaborateurs qui, par cristallographie, ont montré que la neurotensine se fixait à l'intérieur du tonneau formé par les hélices β du β -propeller (Quistgaard *et al.*, 2009). L'étude souligne néanmoins que les sites d'interactions sur le récepteur sont différents selon les ligands, même si un phénomène de compétition existe (Munck Petersen *et al.*, 1999; Nykjaer *et al.*, 2004). Enfin, des travaux plus récents ont permis d'identifier une séquence linéaire de 12 acides aminés R¹¹⁹IFRSSDFAKNF¹³⁰ responsable de la fixation des proneurotrophines (Serup Andersen *et al.*, 2010).

d. Voies de signalisation induites

La sortiline pouvant interagir avec de nombreux partenaires, elle est donc impliquée dans divers processus biologiques. Par exemple, du fait de son homologie avec les protéines de type **MPR** (**M**annose-**6-P**hosphate **R**eceptors), elle est impliquée dans le trafic intracellulaire. De plus, même si elle est majoritairement retrouvée dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, on en retrouve environ 10% à la membrane plasmique (Canuel *et al.*, 2009). Elle endosse alors le rôle de (co)récepteur (Nykjaer *et al.*, 2012) (Figure 11).

✓ Rôle dans le trafic intracellulaire

La partie cytoplasmique de la sortiline est homologue à celle de CI-M6P/IGF-2R, une protéine connue pour reconnaître le mannose-6-phosphate des enzymes lysosomiales et les diriger de l'appareil de Golgi jusqu'aux lysosomes. L'homologie est telle que le remplacement de la partie cytoplasmique de CI-M6P/IGF-2R par celle de la sortiline n'altère pas la fonction du CI-M6P/IGF-2R (Nielsen *et al.*, 2001). Ceci implique que la partie cytoplasmique de la sortiline est capable de recruter des protéines adaptatrices similaires au récepteur CI-M6P/IGF-2R.

La régulation du transport antérograde (appareil de Golgi vers endosomes) par la sortiline se fait donc après recrutement de **GGA2** (**G**olgi-localizing **G**amma-adaptin ear factor homology domain, **A**DP-ribosylation factor-binding protein **2**) sur le motif YSVL et LL du récepteur (Nielsen *et al.*, 2001). **GGA2** permet ainsi l'ancrage au cytosquelette et participe à la reconnaissance des cargos trans-golgiens (Lohi *et al.*, 2002). Plus récemment, il a été décrit que le complexe **AP-1** (**A**daptator **P**rotein **1**) joue également un rôle dans ce transport en se fixant sur une séquence de 10 acides aminés (V⁷⁴⁵-A⁷⁵⁵) contenant le motif acide DSDED (Canuel *et al.*, 2008).

INTRODUCTION

La régulation du transport rétrograde (endosomes vers appareil de Golgi) est assurée après recrutement de rétromères par la sortiline. Ainsi, les protéines **VPS (Vacuolar Protein Sorting) 26 et 35** interagissent avec le motif YSVL de la sortiline entraînant le transport des protéines des endosomes vers l'appareil de Golgi (Canuel *et al.*, 2008). Le motif DSDED semblerait également jouer un rôle dans ce transport en permettant l'interaction avec la protéine **PACS1 (Phosphofurin Acidic Cluster Sorting protein 1)** conduisant au recyclage du récepteur (Willnow *et al.*, 2008).

Enfin, la sortiline peut également internaliser ses ligands extracellulaires (comme la neurotensine) *via* un mécanisme d'endocytose dépendant de la **clathrine**. Cette dernière serait recrutée par la sortiline avec comme intermédiaire la protéine adaptatrice **AP2 (Adaptator Protein 2)** (Morinville *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2007; Willnow *et al.*, 2008).

✓ *Rôle pro-apoptotique*

En plus de son rôle dans le trafic intracellulaire, la sortiline est nécessaire à l'apoptose des cellules neuronales induite par les proneurotrophines. En effet, la sortiline agit comme un co-récepteur de p75^{NTR} (Nykjaer *et al.*, 2004). Sous l'effet de la proneurotrophine, un complexe ternaire se forme, le prodomaine de cette dernière se fixant sur la sortiline et la partie mature sur p75^{NTR}. La signalisation alors induite passe par l'activation de la protéine JNK et des caspases 3 et 6 (Volosin *et al.*, 2006). D'autres études soulignent le fait que, tout comme p75^{NTR}, la sortiline peut être clivée par ADAM17/TACE et le complexe γ -sécrétase, supposant ainsi que le domaine intracellulaire de la sortiline peut être transloqué dans le noyau pour y induire une signalisation particulière. Enfin, NRH2, largement impliqué dans la signalisation pro-apoptotique de p75^{NTR}, est également engagé dans la formation de ce complexe ternaire proneurotrophine / sortiline / p75^{NTR} puisqu'il induit la relocalisation de la sortiline à la membrane. De plus, cette protéine favorise directement l'interaction des co-récepteurs en se liant physiquement avec ceux-ci (Kim *et al.*, 2009).

✓ *Rôle dans la migration cellulaire*

Dans les cellules non neuronales, la sortiline peut favoriser la migration cellulaire. En effet, après stimulation par la neurotensine de cellules microgliales, il a été démontré que les voies PI3-K et MAPK sont activées, conduisant à une réorganisation de l'actine F et la projection de filopodes nécessaires à la migration cellulaire (Martin *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005). Cet effet peut, par ailleurs, être inhibé par le propeptide de la sortiline, connu pour interagir avec la forme mature du récepteur et empêcher ses interactions avec les ligands. Ce

INTRODUCTION

phénomène, associé à l'absence de NTSR1 et NTSR2 dans les cellules microgliales souligne donc l'importance de la sortiline dans cette migration induite par la neurotensine.

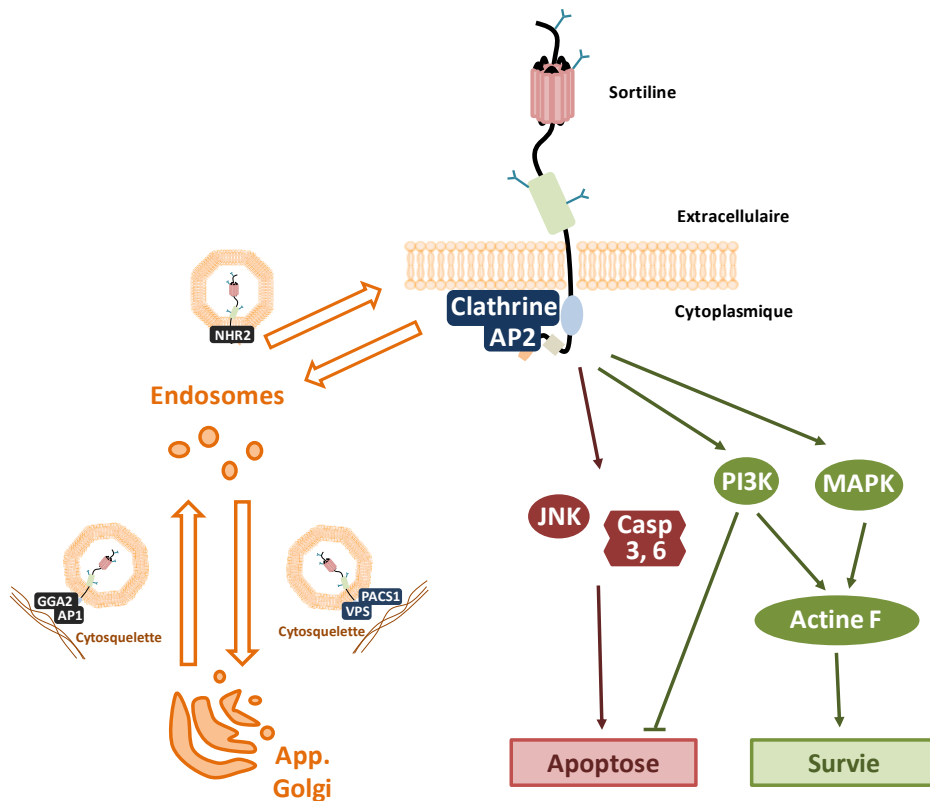


Figure 11 : Signalisations induites par la sortiline

La sortiline est responsable du trafic entre l'appareil de Golgi et les endosomes. Elle peut également induire une signalisation dépendante des proneurotrophines à travers le recrutement de protéines adaptatrices. Elle participe aussi à l'internalisation des récepteurs et dans certains cas, à leur recyclage / adressage membranaire. Les voies de signalisation activées peuvent conduire à l'apoptose ou à la survie, suivant le contexte cellulaire. AP2, Adaptator Protein 2 ; PI3-K, PhosphoInositide 3-Kinase ; MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase ; JNK, c-Jun N-terminal Kinase ; Casp, Caspase 2 ; GGA2, AP1, Adaptator Protein 1 ; VPS, Vacuolar Protein Sorting ; PACS1, Phosphofurin Acidic Cluster Sorting protein 1, NRH2, Neurotrophin Receptor Homologue 2.

4. Interaction entre les récepteurs

La signalisation des neurotrophines et de leurs précurseurs est non seulement dépendante de l'expression des trois récepteurs ($p75^{\text{NTR}}$, Trk, sortiline) mais elle est également dépendante des interactions entre eux-ci (Figure 12).

INTRODUCTION

a. Interaction Trk/p75^{NTR}

Bien que présentant les mêmes ligands (les neurotrophines), les récepteurs Trks semblent induire une signalisation antagoniste (survie cellulaire) à celle induite par p75^{NTR} (apoptose). Cependant, l'expression de ces récepteurs n'est pas systématiquement anti-corrélée, posant donc la question des signalisations induites en cas de co-expression de ces récepteurs. Bien que considéré comme un récepteur de haute affinité, le récepteur TrkA fixe de la même manière le NGF que p75^{NTR} ($K_d \approx 10^{-9}$ M) lorsque ces deux récepteurs ne sont pas exprimés simultanément dans la cellule. Cette affinité de TrkA pour le NGF est cependant augmentée lorsque p75^{NTR} est co-exprimé dans la cellule ($K_d \approx 10^{-11}$ M) (Hempstead *et al.*, 1991; Mahadeo *et al.*, 1994). De plus, la présence de p75^{NTR} permet d'augmenter la spécificité de la liaison TrkA / NGF tout en inhibant l'interaction entre TrkA et NT-3 (Clary *et al.*, 1994). Par ailleurs, la stimulation au NGF des neurones sympathiques entraîne une augmentation de l'expression de p75^{NTR}, favorisant ainsi la signalisation du NGF aux dépens de NT-3 (Brennan *et al.*, 1999; Kuruvilla *et al.*, 2004). Ensemble, ces résultats montrent que la coopération de p75^{NTR} avec TrkA permet la création d'un site de haute affinité au NGF potentialisant ainsi les effets de ce dernier. Alors que les interactions entre TrkA et p75^{NTR} sont dépendantes des régions intracellulaire et transmembranaire (Esposito *et al.*, 2001), les interactions entre la neurotrophine et ses récepteurs semblent également jouer un rôle dans cette coopération (Barker *et al.*, 1994; Lachance *et al.*, 1997). En effet, l'inhibition de la liaison NGF / p75^{NTR} aboutit à une diminution de l'affinité entre le NGF et TrkA (Ryden *et al.*, 1997). Ces résultats, suggérant une interaction directe entre les deux récepteurs sous l'effet du NGF, sont en adéquation avec les co-immunoprécipitations des récepteurs réalisées (Huber *et al.*, 1995; Gargano *et al.*, 1997; Bibel *et al.*, 1999; Lad *et al.*, 2003). D'autres études ont, par la suite, confirmé l'interaction directe entre les deux récepteurs. La stœchiométrie du complexe NGF / p75^{NTR} / TrkA serait de 4:2:2, c'est-à-dire que 2 dimères de NGF formés au préalable vont interagir avec deux molécules de p75^{NTR} et deux de TrkA (Covaceuszach *et al.*, 2015). Outre le fait que p75^{NTR} augmente l'affinité et la spécificité de liaison NGF / TrkA, certaines études tendent à démontrer que les voies de signalisations induites par le complexe seraient différentes des signalisations NGF / TrkA ou NGF / p75^{NTR} précédemment décrites (Chao 2003; Barker 2007). Par exemple, dans les oligodendrocytes, en l'absence de TrkA, le NGF permet l'activation de la voie JNK *via* p75^{NTR} (Casaccia-Bonfil *et al.*, 1996). Cependant, l'expression de TrkA dans ces cellules modifie les effets biologiques du NGF (Yoon *et al.*, 1998). En effet, l'activation de TrkA favorise une signalisation stimulant la

INTRODUCTION

survie cellulaire (PKC, PI3-K, MAPK) mais inhibe également la voie JNK activée par p75^{NTR} (Mazzoni *et al.*, 1999; Bilderback *et al.*, 2001; Plo *et al.*, 2004) (Figure 12). D'autres études ont montré que certaines protéines, communes aux signalisations des deux récepteurs, permettent une signalisation renforcée lorsque le complexe NGF / p75^{NTR} / TrkA se forme. La cavéoline, par exemple, est nécessaire pour l'internalisation de TrkA après stimulation au NGF. Elle participe également à la formation des céramides dans le cadre de la signalisation NGF / p75^{NTR} (Bilderback *et al.*, 1997). Lorsqu'un complexe NGF / p75^{NTR} / TrkA se forme, la cavéoline bloque la phosphorylation de TrkA, inhibant ainsi une partie de sa signalisation (Bilderback *et al.*, 1999). Comme cette signalisation, et notamment l'activation de la voie PI3-K, peut conduire à l'inhibition de la production de céramides, la cavéoline potentialise la production de ces derniers conduisant à des effets pro-apoptotiques (Bilderback *et al.*, 2001) (Figure 12).

b. Interaction p75^{NTR}/sortiline

Alors que l'interaction entre p75^{NTR} et Trk concerne les signalisations induites par les neurotrophines, les interactions entre p75^{NTR} et la sortiline se sont révélées essentielles à la signalisation induite par leurs précurseurs. La mise en évidence du rôle de la sortiline dans les effets biologiques induits par les proneurotrophines a permis de répondre à de nombreuses interrogations. En effet, les proneurotrophines ont largement été décrites comme ayant des effets pro-apoptotiques (Lee *et al.*, 2001). Ces effets sont la conséquence de l'activation de p75^{NTR} (Beattie *et al.*, 2002). Cela suggère donc que les proneurotrophines se lient préférentiellement à p75^{NTR}. Cependant, des études d'affinités ont montré que le proNGF, précurseur du NGF, possède la même affinité pour p75^{NTR} et TrkA ($K_d \approx 15.10^{-9}$ M) (Nykjaer *et al.*, 2004). En réalité, l'affinité du proNGF pour p75^{NTR} résulte de l'interaction entre p75^{NTR} et la sortiline. En effet, la présence de la sortiline permet la formation d'un site de haute affinité favorisant la fixation du proNGF sur p75^{NTR} ($K_d \approx 1,6.10^{-10}$ M) (Feng *et al.*, 2010). Le prodomaine du proNGF se fixe alors sur la sortiline (probablement le motif 10CC), et la partie mature sur p75^{NTR} (séquence juxtamembranaire de 23 acides aminés) conduisant à une signalisation pro-apoptotique (Skeldal *et al.*, 2012). La formation de ce complexe a également été décrite pour le proBDNF et le proNT-3 et conduit aux mêmes effets (Teng *et al.*, 2005; Yano *et al.*, 2009). En dehors de son rôle pour l'affinité proneurotrophines / p75^{NTR}, l'implication directe de la sortiline dans la signalisation pro-apoptotique reste mal connue (Kim *et al.*, 2009; Skeldal *et al.*, 2011). Il semblerait néanmoins que la sortiline favorise le

INTRODUCTION

clivage de p75^{NTR} et donc la production de p75^{NTR}-ICD menant à la mort cellulaire (Skeldal *et al.*, 2012).

c. Interaction Trk/sortiline

Plus récemment c'est l'interaction entre la sortiline et TrkA qui a été décrite. En utilisant du proNGF non clivable, et donc incapable de générer du NGF mature, certains travaux ont montré que le proNGF peut induire la phosphorylation TrkA et activer la voie des MAPK (Clewes *et al.*, 2008; Armugam *et al.*, 2012). En accord avec ces résultats, des expériences d'immunoprécipitations ont permis d'identifier l'interaction entre le proNGF et TrkA (Fahnestock *et al.*, 2004). Le rôle de la sortiline dans cette signalisation n'est pas clair. Il semblerait qu'elle interagisse avec les récepteurs Trk pour les conduire à la membrane plasmique. Ces interactions, dépendantes des domaines extracellulaires des deux récepteurs, permettrait également une fixation des proneurotrophines, formant ainsi un complexe ternaire (Vaegter *et al.*, 2011). Notre laboratoire a, par ailleurs, décrit une signalisation du proNGF dans les cellules cancéreuses de sein capable de stimuler l'invasion cellulaire par la coopération entre la sortiline et TrkA en activant les voies PI3-K / Akt et Src (Demont *et al.*, 2012). Cette étude a également montré que cette signalisation est complètement indépendante de p75^{NTR}. Ensemble, ces résultats suggèrent fortement une signalisation initiée par un complexe proNGF / sortiline / TrkA.

INTRODUCTION

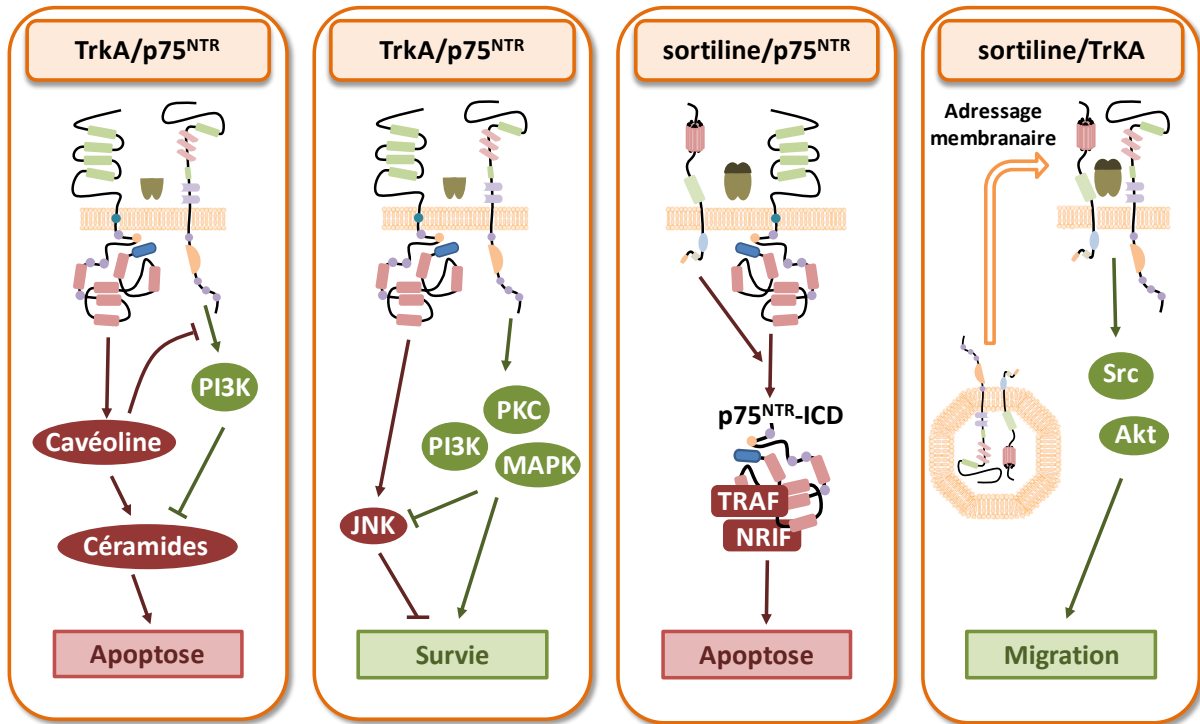


Figure 12 : Exemples d'interactions entre les récepteurs aux (pro)neurotrophines

La coopération entre TrkA et p75^{NTR} permet la formation d'un site de haute affinité pour le NGF. Ces coopérations peuvent induire, suivant le contexte cellulaire, la mort ou la survie cellulaire. p75^{NTR} peut également coopérer avec la sortiline suite à une stimulation par les proneurotrophines, pour induire une signalisation pro-apoptotique. La coopération de TrkA avec la sortiline sous l'effet du proNGF peut induire la motilité des cellules cancéreuses (Lu *et al.*, 2005).

III. (pro)NGF et cancers

Les facteurs de croissance et leurs récepteurs sont largement impliqués dans la carcinogénèse (Weinstein 1987; Hanahan *et al.*, 2000; Hanahan *et al.*, 2011). Les neurotrophines ainsi que leurs récepteurs n'échappent pas à cette règle. L'histoire même de l'identification du NGF et de son récepteur TrkA est associée au cancer. En effet, ce sont des travaux sur les facteurs neurotrophiques sécrétés par un sarcome chez le poulet qui ont permis la caractérisation de la neurotrophine (Levi-Montalcini *et al.*, 1951). Son récepteur, quant à lui, a été identifié à partir d'une protéine chimérique oncogénique extraite d'un cancer colorectal (Martin-Zanca *et al.*, 1986). Bien qu'encore mal compris, le rôle des neurotrophines dans la carcinogénèse est décrit dans un nombre croissant de cancers.

INTRODUCTION

1. Neurotrophines, Trks et cancers

a. Cancer colorectal

C'est en 1986 que TrkA a été pour la première fois identifié, sous la forme d'une protéine chimérique, extraite de cellules de cancer colorectal. Cette fusion associait le gène de la tropomyosine (**TPM3**) au domaine kinase de TrkA (Martin-Zanca *et al.*, 1986). Elle résulte d'un réarrangement intrachromosomal (1q22-23) (Creancier *et al.*, 2015). La transfection de cette protéine de fusion dans les cellules NIH/3T3 (fibroblastes immortalisés de souris) avait permis la transformation de ces dernières, les rendant ainsi tumorales. Même si la fréquence de ce réarrangement est assez rare (1 cas sur 70), une approche thérapeutique ciblant l'activité tyrosine kinase de TrkA semble être prometteuse (Ardini *et al.*, 2014).

b. Cancer de la thyroïde

Le rôle neurotrophines / récepteurs dans le cancer de la thyroïde est assez similaire à celui joué dans le cancer colorectal. En effet, dans les carcinomes thyroïdiens papillaires, le gène codant TrkA (NTRK1) est fréquemment réarrangé avec d'autres gènes pour coder des protéines chimériques oncogéniques (Pierotti *et al.*, 2006). Ces protéines sont constituées du domaine intracellulaire de TrkA fusionné avec différentes protéines permettant une activation constitutive du domaine tyrosine kinase du récepteur. Parmi ces chimères, la fusion **NTRK1** avec **TPR** (**T**ranslocated **P**romoter **R**egion) génère l'oncogène **Trk-T1** qui contribue à la transformation de l'épithélium thyroïdien (Russell *et al.*, 2000). La fusion NTRK1 / TPM3 permet, quant à elle, la génération de Trk, une protéine oncogénique retrouvée dans environ 10% des carcinomes papillaires de la thyroïde (Butti *et al.*, 1995). Ces réarrangements semblent être d'ailleurs de bons marqueurs moléculaires de ces cancers (Kouniavsky *et al.*, 2010). De manière intéressante, dans ce contexte, le NGF semble réduire la capacité de prolifération et d'invasion des cellules cancéreuses en favorisant l'expression de p75^{NTR} (Paez Pereda *et al.*, 2000). Dans les carcinomes thyroïdiens médullaires, ce sont des mutations de NTRK1 et non des translocations qui sont fréquemment retrouvées (Pierotti *et al.*, 2006). Par ailleurs, le NGF stimule la prolifération de ces cellules cancéreuses (Goretzki *et al.*, 1987). Ceci souligne qu'au sein d'un même organe, le rôle oncogénique des neurotrophines peut être très différent.

INTRODUCTION

c. Cancer du poumon

Dans les adénocarcinomes pulmonaires, c'est également la fusion du gène NTRK1 avec d'autres protéines qui a été décrite. En effet, La fusion du gène **MRIP** (**M**YOSIN phosphatase–**R**HO-**I**nteracting **P**rotein) et NTRK1 forme la protéine chimérique appelé **RIP-TRKA** (Vaishnavi *et al.*, 2013). Cette protéine, lorsqu'elle est exprimée dans des lignées cancéreuses *in vitro*, stimule la prolifération cellulaire. Une autre fusion a également été décrite. Il s'agit de la fusion de NTRK1 avec CD74. Ce gène code pour la chaîne invariante du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. La protéine CD74 est notamment retrouvée dans le cancer du poumon sous la forme d'une autre protéine chimérique oncogénique CD74-ROS1 conduisant à une activation constitutive de ROS1 (Matsuura *et al.*, 2013). La fusion avec NTRK1 permet donc l'activation constitutive de TrkA et présente donc également des propriétés oncogéniques.

d. Cancer du pancréas

Dans les cancers du pancréas, de la même manière que dans les tissus neuronaux, l'expression de TrkA et de p75^{NTR} mène à des effets différents. Alors que l'expression de p75^{NTR} dans ces cancers est associée à un bon pronostic (Dang *et al.*, 2006), un taux de TrkA élevé est corrélé à une invasion périneurale et à une augmentation de la prolifération cellulaire (Miknyoczki *et al.*, 1996). TrkA est donc considéré comme un marqueur de tumorigénicité (Sakamoto *et al.*, 2001). A expression égale, le NGF induit une croissance tumorale par la voie des MAPK, rappelant ainsi la signalisation décrite dans le chapitre précédent (Figure 12) (Zhu *et al.*, 2001). L'activation de cette voie permet notamment une augmentation de l'expression de la métalloprotéase MMP-2 menant à un pouvoir invasif plus conséquent (Okada *et al.*, 2004). Enfin, dans des modèles de xéno greffes en souris immunodéprimées, l'inhibition de cette signalisation par un anticorps neutralisant anti-NGF ou par un inhibiteur de TrkA (*CEP-701*, inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du récepteur) permet une forte diminution de la croissance tumorale et de la formation de métastases (Miknyoczki *et al.*, 2002).

e. Cancer de la prostate

Tout comme les cancers pancréatiques, TrkA et p75^{NTR} sont retrouvés dans les cancers de la prostate. De même, dans ces cellules cancéreuses, TrkA induit des effets pro-tumoraux alors que p75^{NTR} est considéré comme un suppresseur de tumeur (Arrighi *et al.*, 2010). Au cours de la progression tumorale, TrkA est de plus en plus exprimé par rapport à p75^{NTR} ce

INTRODUCTION

qui permet d'induire des signalisations favorisant la croissance tumorale et la migration des cellules prostatiques (Sortino *et al.*, 2000; Festuccia *et al.*, 2007; Papatsoris *et al.*, 2007). Lorsque l'on ré-exprime fortement p75^{NTR} dans ces cellules, on induit l'apoptose et on diminue la migration cellulaire (Allen *et al.*, 2005; Khwaja *et al.*, 2006; Nalbandian *et al.*, 2006; Wynne *et al.*, 2010). C'est donc la balance entre l'expression de TrkA et de p75^{NTR} qui détermine l'effet du NGF dans ces cancers. *In vivo*, l'utilisation de modèles murins de xénogreffes a permis de démontrer que l'inhibition des voies induites par le NGF (anticorps neutralisants ou petites molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase de TrkA) réduit fortement la taille des tumeurs et leurs capacités à former des métastases (Weeraratna *et al.*, 2001; Miknyoczki *et al.*, 2002). Une autre étude a enfin souligné l'effet inhibiteur des endocannabinoïdes sur TrkA, ce qui permet une diminution de la croissance tumorale (Melck *et al.*, 2000).

f. Neuroblastome

Dans les neuroblastomes, carcinome pédiatrique issu de cellules embryonnaires formant le système nerveux sympathique, deux types de tumeurs, aux pronostics très différents, se dégagent. Le premier type, de bon pronostic, peut régresser spontanément. Le second, de mauvais pronostic, est constitué de cellules agressives dans lesquelles MYCN est souvent surexprimé. Le rôle des neurotrophines et de leurs récepteurs est ici très différent de celui décrit pour les cancers de la prostate et du pancréas. En effet, l'expression du récepteur TrkA est plutôt de bon pronostic (Nakagawara *et al.*, 1992; Kogner *et al.*, 1993; Nakagawara *et al.*, 1993). Sous l'effet du NGF, celui-ci induit la différenciation des cellules cancéreuses, diminuant de fait, leur caractère tumoral (Nakagawara *et al.*, 1997). Par ailleurs, une isoforme peu commune de TrkA, TrkA-III, est également retrouvée dans ces cancers (Tacconelli *et al.*, 2004; Tacconelli *et al.*, 2005). Elle est capable de s'auto-activer, favorisant alors la tumorigénèse et l'angiogénèse. Cette isoforme semble d'ailleurs être un bon marqueur des phases précoces de ce cancer (Tacconelli *et al.*, 2005). De manière intéressante, le BDNF et son récepteur, TrkB, sont plutôt exprimés dans les neuroblastomes de mauvais pronostic, supposant des effets biologiques différents de l'axe NGF / TrkA (Nakagawara *et al.*, 1994).

g. Cancer de l'ovaire

Dans le cancer de l'ovaire, c'est l'activation du récepteur TrkA qui est corrélée à un mauvais pronostic (Odegaard *et al.*, 2007). De plus, les cellules cancéreuses expriment davantage de NGF que les cellules saines. Une corrélation d'expression entre le NGF, TrkA et

INTRODUCTION

des molécules angiogéniques semble démontrer l'importance de l'axe NGF / TrkA dans l'angiogénèse tumorale (Davidson *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2007). Par ailleurs, le NGF pourrait intervenir de manière indirecte dans la carcinogénèse ovarienne en participant au cycle ovarien. En effet, la neurotrophine induit l'expression de FSHR, stimule la sécrétion d'œstrogènes et inhibe l'expression de progestérone (Bose 2005; Salas *et al.*, 2006).

h. Cancer du sein

Les neurotrophines ont également un effet sur le cancer du sein. Ainsi, NGF, BDNF et NT-4/5 sont exprimés et sécrétés par les cellules cancéreuses mammaires et entretiennent une boucle autocrine menant à des effets oncogéniques (prolifération, survie, invasion, angiogénèse) (Descamps *et al.*, 2001; Dolle *et al.*, 2003; Vanhecke *et al.*, 2011). Par ailleurs, ces neurotrophines ne semblent pas affecter les cellules épithéliales mammaires normales, même si celles-ci expriment les récepteurs TrkA et p75^{NTR} (Descamps *et al.*, 1998; Dolle *et al.*, 2003).

Bien que la signalisation induite par cette famille de facteur de croissance reste à éclaircir, il semblerait que le NGF, par l'activité kinase de TrkA, soit capable d'activer la voie des MAPKs et de PI3-K (Descamps *et al.*, 2001; Lagadec *et al.*, 2009), mais aussi des voies atypiques passant par Ku70 et Ku86 qui favorisent respectivement la survie et l'invasion cellulaires (Com *et al.*, 2007; Lagadec *et al.*, 2010). Le rôle de l'axe NGF / TrkA dans ces cancers a également été démontré *in vivo*, par l'utilisation d'inhibiteurs de TrkA, d'anticorps neutralisants anti-NGF ou encore par ARN interférence (Adriaenssens *et al.*, 2008). Ainsi, l'utilisation de ces traitements mène à une diminution de la taille de tumeurs mammaires issues de xéno greffes en souris SCID.

Le récepteur p75^{NTR} semble être également impliqué dans la signalisation pro-tumorale initiée par les neurotrophines. Il permet le recrutement de la protéine **TRADD** (TNF Receptor type 1-Associated Death Domain protein) menant ainsi à l'activation de la voie NFκB et donc la survie cellulaire (El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003). Sa surexpression permet également une protection contre la mort cellulaire à travers l'activité de la protéine p21^{WAF1} (Verbeke *et al.*, 2010). Au contraire, une inhibition de p75^{NTR} entraîne l'apoptose des cellules cancéreuses.

i. Cancer des voies aéro-digestives supérieures (VADS)

Bien que les mécanismes moléculaires mis en jeu ne soient pas encore complètement élucidés, les neurotrophines semblent être impliquées dans l'invasion péri-neurale des cancers épidermoïdes oraux (Kolokythas *et al.*, 2010). L'invasion péri-neurale est un mécanisme de

INTRODUCTION

dissémination des cellules cancéreuses (Marchesi *et al.*, 2010). Ainsi, dans les cancers des VADS, l'invasion péri-neurale notamment induite par le NGF est corrélée à un mauvais pronostic (Shen *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014). De plus, l'utilisation d'anticorps anti-NGF pour le traitement de tumeurs de la langue xéno greffées en souris *nude* montre des résultats prometteurs. En effet, l'inhibition de NGF dans ce modèle permet de diminuer la prolifération des cellules cancéreuses, d'atténuer la douleur provoquée par la tumeur mais également de prévenir la perte de poids induite par le cancer (Ye *et al.*, 2011).

Il est cependant important de souligner que les anticorps anti-NGF utilisés dans ces études ne permettent pas de distinguer le NGF de son précurseur. Les corrélations et les effets biologiques observés pourraient donc également être dus au proNGF lui-même.

2. proneurotrophines et cancers

Du fait de la découverte récente de l'activité biologique initiée par les proneurotrophines sécrétées, il n'existe que peu de travaux s'intéressant aux effets de ces dernières dans les cancers. Certaines études ont toutefois mis en lumière un rôle oncogénique de ces précurseurs dans les cancers du pancréas, de la prostate, du foie, mais aussi dans les mélanomes ou, plus récemment, dans le cancer du sein.

a. Cancer du pancréas

C'est en évaluant les effets du NGF dans les cancers pancréatiques que l'équipe de Zhu accumula les premières preuves de l'implication du proNGF dans ces cancers (Zhu *et al.*, 2001). En effet, en surexprimant le gène codant pour le (pro)NGF dans les cellules cancéreuses, cette équipe isola deux clones sécrétant du proNGF. Ils ont ensuite pu déterminer que ces clones étaient plus prolifératifs, capables de croître en agar mou mais également plus tumorigéniques en souris *nude*. Néanmoins, ces travaux ne permettent pas de distinguer clairement les effets du proNGF et de sa forme mature. Une autre étude a démontré l'implication de la sortiline dans les capacités migratoires des cellules pancréatiques cancéreuses (Mijatovic *et al.*, 2007). Ensemble, ces résultats convergent vers un rôle oncogénique du précurseur du NGF dans les cancers pancréatiques.

b. Cancer de la prostate

En étudiant le sécrétome de cellules prostatiques saines, Djakiew et ses collaborateurs ont mis en évidence une protéine reconnue par un anticorps anti-NGF mais d'un poids moléculaire très supérieur à celui attendu pour du NGF (Djakiew 1992). Des études supplémentaires ont révélé que la protéine sécrétée était en fait son précurseur, le proNGF

INTRODUCTION

(Delsite *et al.*, 1999). En s'intéressant aux effets du sécrétome de ces cellules saines sur les cellules prostatiques tumorales, les auteurs ont observé un effet pro-migratoire du milieu conditionné, et cet effet est diminué par l'ajout d'un anticorps neutralisant dirigé contre le (pro)NGF (Djakiew *et al.*, 1993). Tout comme le cancer du pancréas, les arguments tendent à montrer un rôle oncogénique du proNGF, bien qu'aucune expérience n'ait pu distinguer de manière formelle l'effet du NGF de celui de son précurseur.

c. Cancer du foie

C'est également une étude sans *a priori* qui a permis de mettre en évidence le rôle d'une proneurotrophine dans la carcinogénèse hépatique. En effet, l'étude des protéines sériques révéla une augmentation du taux sérique d'une protéine de 27 kDa chez les patients atteints d'un carcinome hépatique, diminuant en période de rémission et ré-augmentant en cas de rechute (Yang *et al.*, 2005). L'identification de cette protéine par spectrométrie de masse révéla qu'il s'agissait du proBDNF. En plus de la détection sérique de cette proneurotrophine, il a été démontré une augmentation du taux d'ARNm du proBDNF dans les biopsies cancéreuses comparé aux biopsies normales. Malgré le fait qu'il s'agisse d'un marqueur potentiel de ce cancer, le rôle de cette proneurotrophine dans la carcinogénèse hépatique reste encore à démontrer.

d. Mélanome

Le mélanome fait également partie des cancers dans lesquels le rôle des proneurotrophines a été étudié. Il a ainsi été montré que le proNGF était capable d'avoir des effets pro-migratoires sur les cellules de mélanomes (Shonukan *et al.*, 2003; Truzzi *et al.*, 2008). Par ailleurs, ces effets sont directement corrélés avec le taux d'expression de la sortiline dans ces cellules, c'est-à-dire que les cellules répondent mieux à la stimulation par le proNGF si elles expriment fortement ce récepteur. Bien que la signalisation sous-jacente ne soit pas formellement connue, ces travaux soulignent, une fois encore, le rôle des proneurotrophines dans les cancers.

e. Cancer du sein

Plus récemment, notre laboratoire a démontré les effets du proNGF dans le cancer du sein. Ainsi, l'analyse du milieu conditionné par des cellules cancéreuses de sein a permis de mettre en évidence une production et une sécrétion de proNGF, non clivé, par ces dernières (Demont *et al.*, 2012). Avec l'utilisation d'un proNGF mutant non clivable le laboratoire a, par ailleurs, montré un rôle pro-invasif du proNGF dans ces cellules. L'utilisation d'inhibiteurs, d'ARN

INTRODUCTION

interférents et de récepteurs mutants a conduit au décryptage de la signalisation sous-jacente au proNGF. Alors que p75^{NTR} ne semble pas intervenir dans la signalisation, TrkA et la sortiline sont nécessaires pour induire l'invasion dépendante du proNGF. Cette invasion requiert l'activation des voies Src et Akt. Enfin, des analyses immunohistochimiques ont démontré une corrélation entre l'expression du proNGF par les cellules cancéreuses et l'envahissement ganglionnaire.

3. Thérapies anti-cancéreuses basées sur l'axe neurotrophine/Trk

Avec le nombre croissant d'études décrivant le rôle oncogénique des neurotrophines et de leurs récepteurs, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été envisagées (Molloy *et al.*, 2011). Deux grandes approches ont ainsi été développées. La première consiste à cibler directement les récepteurs, Trk, *via* l'utilisation d'inhibiteurs de kinase dérivés de la staurosporine. La seconde approche consiste à inhiber l'effet de la neurotrophine par des anticorps bloquants ou l'utilisation de peptides mimétiques antagonistes (Eibl *et al.*, 2012; McCarthy *et al.*, 2014).

Parmi ces inhibiteurs, les dérivés de la staurosporine ont été testés dans le cancer de la prostate. Ces inhibiteurs des récepteurs Trks ont d'abord montré leur efficacité *in vitro* où, par exemple, le K252a est capable d'inhiber la prolifération de lignées cancéreuses prostatiques (Delsite *et al.*, 1996; Sortino *et al.*, 2000). Dans des modèles de xéno greffes murins, l'utilisation de 2 analogues du K252a, le CEP-751 et le CEP-701 (appelé également Lestaurtinib), a permis une diminution significative de la formation de métastases associée à une augmentation de l'apoptose induite dans la tumeur primaire (Dionne *et al.*, 1998; George *et al.*, 1999; Weeraratna *et al.*, 2001). Le rôle du CEP-701 dans l'inhibition de l'invasion cellulaire a ensuite été démontré, et des essais cliniques de phase II sont en cours dans ce cancer (NCT00081601). En parallèle de ces travaux, d'autres études ont démontré l'efficacité d'anticorps bloquants dirigés contre le NGF dans l'inhibition du pouvoir invasif de lignées prostatiques cancéreuses (Warrington *et al.*, 2011).

Des recherches sur ce type de thérapies concernant le cancer du pancréas ont également été menées. L'utilisation du CEP-701 et d'anticorps neutralisants dirigés contre le NGF sur des xéno greffes en souris immunodéprimées a permis de démontrer une efficacité anti-tumorale significative (Miknyoczki *et al.*, 1999; Miknyoczki *et al.*, 2002). Ces effets ont également été observés dans des modèles de cancer du sein (Adriaenssens *et al.*, 2008).

D'autres inhibiteurs ont également été testés. Ainsi, le NMS-P626, l'ARRY-470 ou encore l'AZD7451, également des inhibiteurs de TrkA, semblent avoir des propriétés anti-

INTRODUCTION

tumorales intéressantes dans les cancers du poumon et du colon présentant un réarrangement du gène NTRK1 (TrkA) (Vaishnavi *et al.*, 2013; Ardini *et al.*, 2014; Tatematsu *et al.*, 2014).

Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs plus spécifiques à TrkA, comme l'AZ-23, le PHA-848125AC et le GNF-5837 ont été testés avec succès dans plusieurs modèles de tumeurs solides, avec pour objectif de cibler plus spécifiquement la signalisation oncogénique et préserver les cellules saines (Thress *et al.*, 2009; Albaugh *et al.*, 2012; Weiss *et al.*, 2012).

L'inhibition de l'axe neurotrophine / Trk n'a pas pour unique vocation l'élimination des cellules cancéreuses. En effet, des études récentes ont montré l'implication de cet axe dans la douleur causée par le cancer (Wang *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2012; Lozano-Ondoua *et al.*, 2013; McKelvey *et al.*, 2013), notamment dans le cadre des métastases osseuses issues d'un cancer du sein. Ainsi, l'utilisation d'un anticorps bloquant, le MAB-911, inhibe l'activation de TrkA et empêche la mise en place de l'innervation tumorale. Par ailleurs, un autre anticorps bloquant cet axe, le Tanezumab, est en phase II d'une étude clinique visant à diminuer les douleurs osseuses de patientes atteintes d'un cancer du sein métastasé (NCT00545129). D'autres types d'inhibiteurs, comme des peptides mimétiques antagonistes de TrkA ou des inhibiteurs de kinases comme ARRY-470 sont également à l'étude pour les mêmes effets (Ghilardi *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2010).

Toutes ces données montrent bien l'importance des (pro)neurotrophines et de leurs récepteurs dans les cancers. Même si certains traitements visant cet axe sont prometteurs, la complexité de la signalisation dépendante de ces (pro)neurotrophines nécessite des études approfondies. Comprendre de manière détaillée le fonctionnement de ces facteurs de croissance permettrait le développement de stratégies thérapeutiques plus efficaces en prévenant notamment le risque de résistance.

INTRODUCTION

B. Modèles d'études

Le rôle des neurotrophines est décrit dans un nombre croissant de cancers. Le caractère pionnier de notre laboratoire dans les études évaluant l'effet des neurotrophines, et plus particulièrement du NGF, dans les cancers du sein a permis le développement de nombreuses compétences. Mes travaux sur le NGF ont donc naturellement été réalisés sur ce modèle de cancer du sein. La découverte de l'implication du proNGF dans la phosphorylation d'EGFR nous a conduit à évaluer les effets du proNGF dans des cancers disposant déjà de thérapies anti-EGFR mais dont l'efficacité reste limitée. La forte incidence régionale des cancers des voies aéro-digestives supérieures et le manque de recherche académique sur ces cancers ont mené à l'élargissement des nos travaux sur ce modèle de cancer épidermoïde.

I. La glande mammaire

1. Généralités

a. Anatomie

La glande mammaire est une glande exocrine retrouvée chez tous les mammifères. Chez la femme, elle est responsable de la production et de la sécrétion du lait tandis que chez l'homme elle reste immature et non fonctionnelle. Sa fonction est fortement liée aux hormones sexuelles, son aspect morphologique évolue donc au cours du temps.

Le sein est une glande de type tubulo-alvéolaire entourée d'un tissu adipeux. Cette glande est maintenue sur les muscles pectoraux et sur le derme par des crêtes fibroglandulaires (crêtes de Duret) et des bandes de tissu conjonctif (ligaments de Cooper) (Figure 13). La glande mammaire est un organe regroupant 10 à 20 lobes qui eux-mêmes contiennent 20 à 40 lobules. Ces lobules sont des structures regroupant entre 10 et 100 *acini* responsables de la production du lait. Chaque lobe dispose d'un canal galactophore, ramifié en canaux terminaux, qui draine le lait excrété par les lobules jusqu'au mamelon. Avant d'être éjecté par le mamelon, une réserve se forme dans des renflements des canaux galactophores appelés sinus lactifères. La peau entourant le mamelon, l'aréole, est pigmentée et contient des glandes sébacées (glande de Morgani). Ces glandes s'hypertrophient lors de la grossesse pour former les tubercules de Montgomery dont la sécrétion participe à la protection du mamelon et de l'aréole durant l'allaitement.

INTRODUCTION

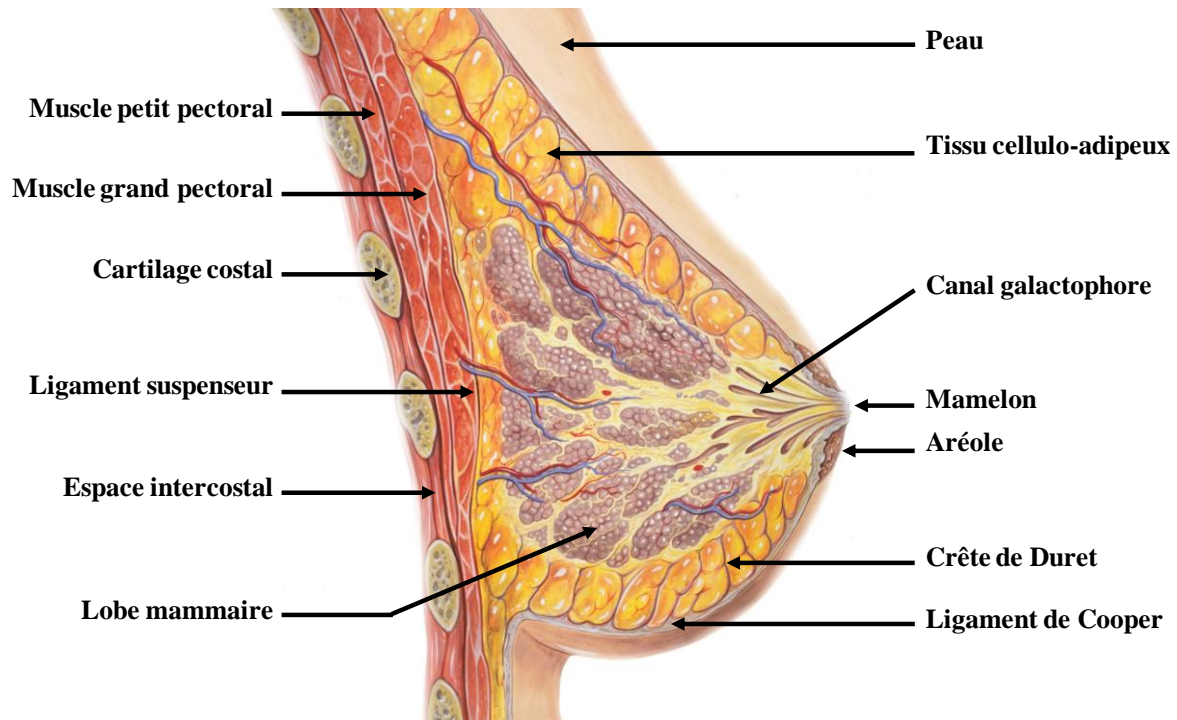


Figure 13 : Anatomie de la glande mammaire

Représentation schématique d'une coupe sagittale de glande mammaire. Le sein est un tissu glandulaire de forme circulaire situé sur la face antérieure des muscles pectoraux. La glande mammaire est constituée de 10 à 20 lobes qui regroupent eux-mêmes 20 à 40 lobules. Le lait produit est acheminé par des canaux galactophores jusqu'au mamelon. La face antérieure du sein est constituée d'un tissu cellulo-adipeux qui présente des lamelles conjonctives appelées ligaments de Cooper. Ces ligaments ancrent, via les crêtes de Duret, la glande mammaire au derme. La face postérieure du sein est constituée d'un autre tissu cellulo-adipeux formant le ligament suspenseur du sein. Adapté de Medical Illustration by Patrick J. Lynch.

L'unité de production du lait est appelée **Unité Terminale Ducto-Lobulaire (UTDL)**. Elle est constituée d'un lobule associé à un canal terminal (inter et intralobulaire). Chaque lobule est entouré d'un tissu conjonctif assez dense alors qu'à l'intérieur du lobule, le canal intralobulaire repose sur un tissu conjonctif plus lâche mais également plus vascularisé. Cette **UTDL** est très sensible aux variations hormonales (puberté, cycle menstruel, grossesse) et semble être le siège de la plupart des lésions mammaires (mastoses et cancers).

INTRODUCTION

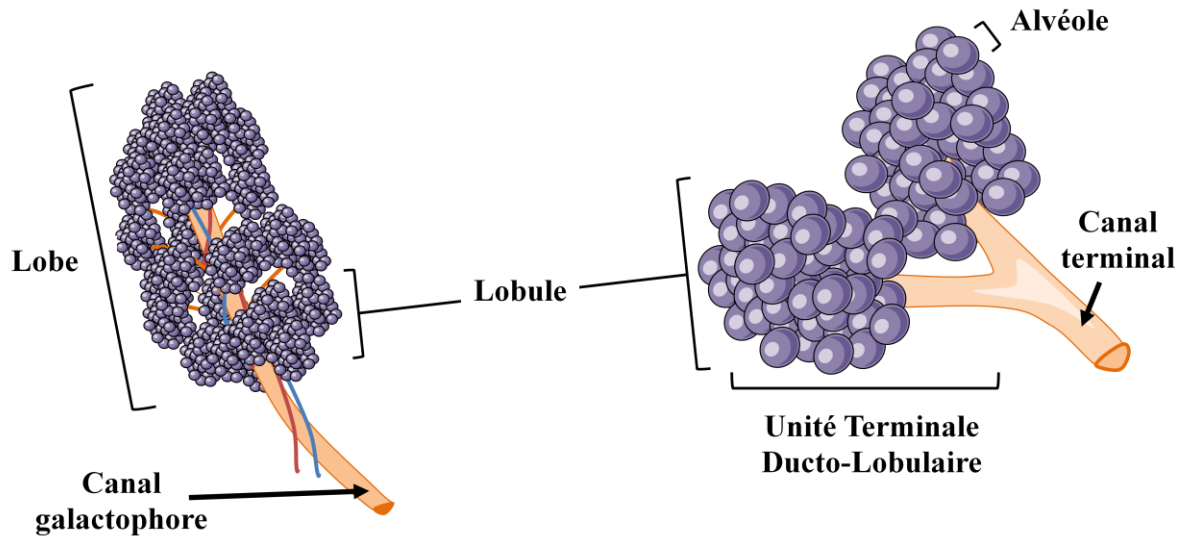


Figure 14 : Représentation schématique de la structure d'un lobe mammaire

Un lobe mammaire compte 20 à 40 lobules constitués de 10 à 100 alvéoles qui forment, avec les canaux associés, les unités terminales ducto-lobulaires. Les lobes sont vascularisés et disposent de canaux galactophores qui conduisent le lait au mamelon lors de la lactation.

Au niveau cellulaire, la glande mammaire est constituée de cellules épithéliales cubiques sécrétrices formant le système alvéolo-lobulo-canalair (Figure 15). Autour de ce système, des cellules myoépithéliales fusiformes contractiles forment une couche discontinue responsable de l'éjection du lait lors de la succion. Ces deux types cellulaires sont encapsulés dans une membrane (ou lame) basale. L'ensemble de la structure est maintenue par le tissu palléal. Celui-ci est composé d'une matrice extracellulaire riche en fibres de collagène, de vaisseaux sanguins, de fibroblastes, de macrophages et d'adipocytes. Ce tissu de soutien permet l'apport des éléments nécessaires au développement de l'épithélium mammaire.

INTRODUCTION

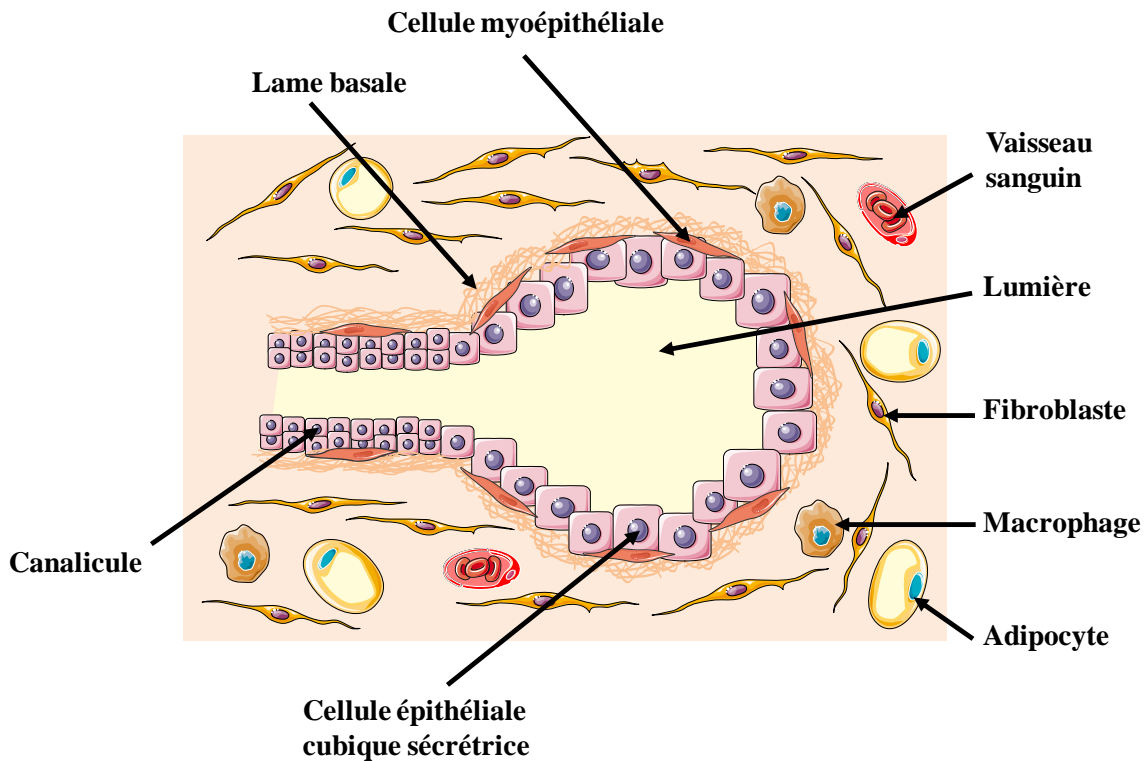


Figure 15 : Représentation schématique d'une alvéole

Les alvéoles sont constituées d'un épithélium qui sécrète le lait dans la lumière. Il est alors expulsé vers les canaux terminaux par des canalicules lors de la contraction de cellules myoépithéliales. Ces cellules reposent sur une capsule de tissu conjonctif appelée lame basale. Le stroma entourant les alvéoles est notamment constitué de vaisseaux sanguins, de fibroblastes, de macrophages et d'adipocytes.

b. Développement

La glande mammaire est un organe dont la morphologie et la fonction sont conditionnées par les hormones, les facteurs de croissance et le microenvironnement palléal (Sternlicht 2006). Elle évolue alors de la vie fœtale à la ménopause avec de grands remaniements durant la puberté et la gestation (Musumeci *et al.*, 2015). Ainsi, au cours de l'embryogénèse, les structures fondamentales de la glande se développent à partir d'un bourgeon de l'ectoderme. Puis, après une longue phase de quiescence, la glande reprend son développement au moment de la puberté. En effet, sous stimulation par les hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone), l'hormone de croissance et des corticostéroïdes, le tissu palléal et les canaux de la glande entrent dans une phase de croissance. Arrivé au stade adulte, le sein arrête son développement, mais reste sous l'influence des œstrogènes et de la progestérone en suivant le cycle menstruel. Lors d'une grossesse, la concentration en

INTRODUCTION

hormones favorisant le développement de la glande mammaire (œstrogènes, progestérone, hormone placentaire) augmente (Macias *et al.*, 2012). Les UTDL se développent alors rapidement, en réduisant, de fait, le volume de tissu adipeux périphérique. Ce développement consiste en une différenciation des acini glandulaires associée à une croissance des canaux galactophores. Le stroma joue un rôle essentiel dans ce développement car, sous l'effet des œstrogènes et de la progestérone, les cellules mésenchymateuses sécrètent des facteurs de croissance comme l'**EGF** (**E**pidermal **G**rowth **F**actor), le **FGF** (**F**ibroblast **G**rowth **F**actor), l'**IGF-1** (**I**nsulin-like **G**rowth **F**actor-**1**), le **MDGF-1** (**M**ammary-**D**erived **G**rowth **F**actor-**1**) ou encore les **TGF α** et **β** (**T**ransforming **G**rowth **F**actor). Par ce moyen, les cellules du stroma induisent la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales mammaires. D'autre part, la croissance des canaux galactophores permettant d'accroître l'arborescence préexistante, nécessite également l'intervention des cellules mésenchymateuses. En effet, ces cellules vont sécréter des protéases extracellulaires, comme les métalloprotéases, qui vont dégrader la matrice extracellulaire et favoriser la migration des cellules épithéliales (Sternlicht 2006). En fin de grossesse, les cellules épithéliales des *acini* se différencient, acquièrent une polarité et deviennent fonctionnelles. Mais ce n'est qu'après l'accouchement et l'élimination du placenta que le taux sérique de progestérone diminue et celui de prolactine augmente, ce qui permet la production de lait par ces cellules (Suzuki *et al.*, 2000). Cet état perdurera tout au long de la lactation. Enfin, une fois la période de lactation terminée, la glande mammaire involue et retourne à un état basal après une apoptose cellulaire massive (Hassiotou *et al.*, 2013). Enfin, durant la ménopause, le système alvéolo-lobulo-canaulaire s'atrophie pour laisser la place à un tissu fibro-adipeux.

2. Les cancers du sein

a. Epidémiologie et étiologie

D'après le dernier rapport de l'**OMS** (**O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté), les cancers du sein représentent à eux seuls 1,67 million de nouveaux cas par an et 522 000 décès dans le monde. Ils concentrent ainsi 11,9% des nouveaux cas de cancers, et 6,4% des décès par cette maladie (Stewart *et al.*, 2014). Comparé au précédent rapport datant de 2008, le taux de nouveaux cas a augmenté de 20% et le nombre de décès de 14%. Ce type de cancer représente donc un défi majeur en termes de santé publique.

En France, on comptabilise 49 000 nouveaux cas et environ 11 000 décès par an (**I**nstitut **N**ational du **C**ancer (**INCa**), 2013). Ces chiffres sont relativement stables depuis

INTRODUCTION

2005 (Tableau 5). En revanche, entre 1990 et 2005, on observe une augmentation importante de l'incidence des cancers du sein en France. Cette augmentation de l'incidence peut être notamment expliquée par l'instauration d'une campagne de dépistage généralisé depuis 2004 par mammographie pour les femmes de 50 à 74 ans. L'évolution plus modérée de la mortalité pourrait, quant à elle, être expliquée par l'amélioration de la prise en charge thérapeutique et par un dépistage plus précoce de la maladie. Enfin, la stabilisation des chiffres observée après 2005 semble être liée à la baisse importante des traitements hormonaux de la ménopause (Daubisse-Marliac *et al.*, 2011).

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

Tableau 5 : Evolution de l'incidence des cancers du sein en France

Incidence, Nombre de cas de cancer du sein diagnostiqués en 1 an en France pour les années 1980, 1990, 2000, 2005, 2010, et 2012. Mortalité, nombre de décès imputables au cancer du sein.

Malgré une forte incidence, les cancers du sein ont un bon pronostic. A l'heure actuelle, on estime un taux de survie à 5 ans de 89% tous stades et types de cancers du sein confondus. Il existe néanmoins une forte hétérogénéité de pronostic, allant de 98,3% de survie à 5 ans pour un diagnostic à un stade local, à 23,3 % si le diagnostic est fait à un stade métastatique. Il est donc important de comprendre l'étiologie de ces cancers, afin d'assurer un dépistage précoce notamment chez les populations à risque.

Les cancers du sein sont des maladies multifactorielles (Lacey *et al.*, 2009). Au cours de sa vie, 1 femme sur 8 risque d'en développer un. Comme la plupart des cancers, l'âge est le premier facteur de risque. En effet, 80 % des cancers du sein sont diagnostiqués après 50 ans, alors que les femmes âgées de moins de 35 ans ne représentent que 10%. Le développement d'un cancer du sein chez des personnes jeunes peut supposer des prédispositions génétiques (mutation des gènes **BRCA (BR**east **C**Ancer) **1** et/ou **2**) associées à des antécédents familiaux de cancers du sein ou de l'ovaire. Ces mutations sont, par ailleurs, souvent retrouvées chez les individus de sexe masculin développant un cancer du sein (1% de l'ensemble des cancers du sein). D'autres facteurs de risques ont été décrits, comme l'exposition prolongée aux œstrogènes endogènes, les traitements hormonaux, les radiations ionisantes, l'alcool ou encore le surpoids (Tableau 6) (Nkondjock *et al.*, 2005).

INTRODUCTION

Facteurs de risque	Âge (> 50 ans)
	Règles précoces (< 12 ans)
	Ménopause tardive (> 55 ans)
	Traitements hormonaux (contraceptif, ...)
	Grande taille à l'âge adulte
	Forte densité mammographique
	Obésité (post-ménopause) ou surpoids (après 18ans)
	Mutations génétiques de BRCA 1/2
	Antécédents familiaux
	Radiations ionisantes
	Alcool (1 boisson ou plus par jour)
Facteurs protecteurs	Activité physique
	Grossesse précoce / Multiparité
	Allaitement (> 25 mois)

Tableau 6 : Facteurs augmentant ou diminuant le risque de cancer du sein.

Résumé des principaux facteurs influençant le développement tumoral mammaire (Nkondjock et al., 2005).

b. Le développement tumoral

✓ *Les différentes étapes du développement tumoral*

Le développement tumoral est un processus long et multi-étapes. A partir du premier évènement, il faut compter 6 à 8 ans pour qu'une cellule génère une tumeur d'environ 1 cm³. Durant cette période, dite infra-clinique, la tumeur est indétectable et asymptomatique. Les différentes altérations génétiques subies par les cellules permettent le passage d'un tissu normal à un tissu hyperplasique puis dysplasique. Après l'immortalisation puis la transformation des cellules, le tissu devient cancéreux. Une fois cancéreuse, la lésion évolue également au cours du temps, passant d'un stade *in situ* à un stade invasif, d'abord local (ganglions lymphatiques), puis métastatique (Hahn *et al.*, 2002).

La grande majorité des cancers du sein (plus de 95% des cas) sont des adénocarcinomes. Ils sont donc issus de l'épithélium glandulaire du sein, soit par la

INTRODUCTION

transformation des cellules des canaux (**Carcinome Canalaire - CC**), soit par celle des lobules (**Carcinome Lobulaire - CL**).

L'initiation de la tumorigénèse passe par des étapes pré-cancéreuses. Ainsi, une cellule altérée va proliférer anormalement pour former une hyperplasie du tissu. Il s'en suit d'une différenciation des cellules conduisant à une désorganisation de l'architecture du tissu, c'est la dysplasie. Cette dysplasie, non cancéreuse, mène ensuite parfois à un carcinome *in situ*.

Les carcinomes *in situ* vont se développer soit dans la lumière des canaux pour les **CC**, on parle alors de **CCIS (Carcinome Canalaire In Situ)**, soit dans la lumière des *acini*, on parle alors de **CLIS (Carcinome Lobulaire In Situ)**. Dans les deux cas, la lame basale n'est pas rompue. Ces cancers sont rares (2 à 3% des cancers du sein diagnostiqués) mais de bon pronostic.

L'étape suivante de la cancérisation est le passage d'un carcinome *in situ* à un carcinome invasif. Ces carcinomes invasifs sont plus fréquemment retrouvés lors du diagnostic (98% des cancers du sein diagnostiqués). Ils sont définis par un envahissement des tissus environnants suite à la rupture de la lame basale. La plupart des carcinomes invasifs (75%) sont de type canalaire (**Carcinome Canalaire Infiltrant - CCI**). Le **Carcinome Lobulaire Infiltrant (CLI)** représente, quant à lui, 4 à 11% des cancers du sein invasifs diagnostiqués. Enfin, il existe des formes plus rares de cancer du sein, comme les carcinomes tubuleux, médullaires, mucineux, apocrines, cribriformes ou encore les carcinomes adénoïdes kystiques (Yerushalmi *et al.*, 2009). Enfin, les cancers invasifs peuvent donner des métastases par dissémination à travers le réseau sanguin et lymphatique. Les premiers ganglions lymphatiques touchés sont les ganglions axillaires puis les ganglions des chaînes mammaires internes et sub-claviculaires. L'étape suivante est le développement de tumeurs secondaires à distance de la tumeur primaire, préférentiellement dans le foie, les poumons et les os (Weigelt *et al.*, 2005). Enfin, dans de rares cas (0,7 à 7% des cas), les carcinomes invasifs sont associés à une maladie de Paget (adénocarcinome de l'aréole).

✓ *Les altérations génétiques*

Les altérations génétiques menant au cancer peuvent être regroupées en deux catégories : l'expression anormale de proto-oncogènes et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (Spandidos *et al.*, 1989).

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes dont l'inactivation favorise le développement tumoral. Cette perte de fonction nécessite la plupart du temps une inactivation des deux allèles du gène (Knudson 1971). Parmi les gènes suppresseurs décrits dans le cancer

INTRODUCTION

du sein, on peut citer les gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire comme RB1 (Bosco *et al.*, 2007), les gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN comme TP53 (Hartmann *et al.*, 1997), BRCA1 (Miki *et al.*, 1994) et BRCA2 (Wooster *et al.*, 1995) ou encore des gènes engagés dans l'interaction avec le microenvironnement comme CDH1 (Bex *et al.*, 2001).

A l'inverse des gènes suppresseurs de tumeurs, les oncogènes sont des gènes dont l'activation favorise la carcinogénèse. Ces sur-activations peuvent être dépendantes d'une augmentation d'expression du gène sauvage, d'une mutation activatrice ou encore de protéines de fusion. Parmi ces gènes certains participent à la signalisation des facteurs de croissance. Dans le cancer du sein, on peut par exemple citer HER2 (Slamon *et al.*, 1987), PIK3CA (Bachman *et al.*, 2004) et Myc (Xu *et al.*, 2010). Ils peuvent également être impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, c'est le cas de CCND1 (Gillett *et al.*, 1994). D'autres favorisent l'angiogénèse, comme le VEGF-C (Kinoshita *et al.*, 2001). Les oncogènes participent aussi à l'inhibition de l'apoptose, c'est le cas de Bcl-2 (Silvestrini *et al.*, 1994). Enfin, certains oncogènes sont impliqués dans la dissémination métastatique, comme par exemple les metalloprotéases (Pellikainen *et al.*, 2004). De manière intéressante, la surexpression de certains de ces oncogènes peut avoir une origine commune, ce qui semble être le cas pour Myc et CDKN1A (Xu *et al.*, 2015). Ceci souligne la nécessité de connaître l'ensemble des acteurs d'une signalisation oncogénique afin d'établir des stratégies thérapeutiques efficaces.

c. Classification

L'hétérogénéité des cancers du sein nécessite une classification bien établie afin de proposer le meilleur traitement aux patientes. Pour cela, différents outils basés sur le degré de différenciation de la tumeur (Grade **SBR** - Scarff-Bloom-Richardson), l'extension anatomique (Stade **TNM** - Tumor Node Metastasis) et le profil moléculaire ont été développés.

✓ *Le grade SBR*

Ce grade a été établi en 1951 sur des caractéristiques histologiques des tumeurs primaires : la différenciation glandulaire, le pléomorphisme nucléaire et l'activité mitotique (Tableau 7) (Bloom *et al.*, 1957). Pour chaque caractéristique, un score est établi, et c'est le score total qui définit le grade de la tumeur et donc son pronostic. Si le score total est compris entre 3 et 4, alors le cancer est considéré comme de bon pronostic, avec une évolution lente et

INTRODUCTION

peu de risque de propagation. Si le score de 6 ou de 7, c'est un pronostic intermédiaire. Enfin, un score de 8 ou 9 signifie que la tumeur est très peu différenciée et risque d'évoluer rapidement sans traitement, elle est donc de mauvais pronostic.

Caractéristique	Score = 1	Score =2	Score = 3
Différenciation glandulaire (présence de canaux)	Uniquement des structures tubulaires	Quelques structures tubulaires	Aucune structure tubulaire
Pléomorphisme nucléaire	Noyaux réguliers et monomorphes	Atypies cyto-nucléaires modérées	Noyaux pléomorphes avec atypies marquées
Activité mitotique (sur 20 champs, en périphérie de tumeur)	0 – 1 mitose	2 à 3 mitoses	3 mitoses ou plus

Tableau 7 : Critères histologiques de la classification SBR

Récapitulatif des critères histopathologiques utilisés en clinique pour évaluer le grade Scarff-Bloom-Richardson d'une tumeur cancéreuse mammaire avec : un Score 3-5 correspondant au Grade I, un Score 6-7 au Grade II et le Score 8-9 au Grade III.

✓ *Le stade TNM*

Une autre classification a été développée par Pierre Denoix entre 1943 et 1952 (Harmer 1958). Elle est basée sur la taille (**Tumor**) de la tumeur associée à la dissémination ganglionnaire (**Node**) et métastatique (**Metastasis**).

Concernant la taille de la tumeur primaire, une gradation de 0 à 4 est effectuée, avec T0 équivalent à une tumeur non palpable, T1 pour une tumeur de moins de 2 cm dans sa plus grande dimension, T2 pour celles comprises entre 2 et 5 cm, T3 pour celles de plus de 5cm. Enfin, T4 concerne les tumeurs avec une extension directe avec la peau ou la paroi thoracique.

L'envahissement ganglionnaire est également évalué, avec N0 en cas d'absence d'envahissement ganglionnaire, N1 si présence de cellules tumorales dans 1 à 3 ganglions axillaires et/ou si envahissement des ganglions sentinelles (chaîne mammaire interne), N2 si envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou des ganglions mammaires internes homolatéraux. Enfin, N3 si envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires ou sus-claviculaires homolatéraux.

Enfin concernant les métastases, M0 est attribué en l'absence de métastases et M1 si présence d'une ou plusieurs métastases.

L'ensemble de ces caractéristiques sont ensuite associées afin de déterminer un stade qui a une valeur pronostique (Tableau 8).

INTRODUCTION

Stade	Tumeur (T)	Ganglion (N)	Métastase (M)	Description
0	Tis	N0	M0	Carcinome in situ
I	T1	N0	M0	Tumeur < 2 cm, tumeur localisée
II	T0/1	N1	M0	Tumeur de 2 à 5 cm et/ou atteinte ganglionnaire satellite mineure
	T2	N0/1	M0	
	T3	N0	M0	
III	T0/1/2	N2	M0	Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure
	T4	N0/1/2	M0	
	Tout T	N3	M0	
IV	Tout T	Tout N	M1	Tumeur avancée localement et métastase à distance

Tableau 8 : Classification TNM dans les cancers du sein

Récapitulatif des critères histopathologiques utilisés en clinique pour évaluer le Stade TNM d'une tumeur cancéreuse mammaire avec le Stade I de bon pronostic et le Stade IV de très mauvais pronostic.

Le stade fournit une indication sur le pronostic de la patiente, avec un très bon pronostic pour le stade 0 et un très mauvais pronostic pour le stade IV.

✓ La classification moléculaire

Initialement, la classification moléculaire a été établie par l'expression des récepteurs hormonaux, le récepteur HER2 et l'indice de prolifération Ki67 dans les tumeurs. L'expression de ces marqueurs est évaluée par immunohistochimie et hybridation *in situ*. Toujours utilisée en routine, elle permet, en complément des autres classifications, d'orienter la prise en charge thérapeutique. Malgré cette classification, les réponses aux traitements administrés restent très hétérogènes (Goldhirsch *et al.*, 2011). Cette classification moléculaire a donc été revisitée grâce à des analyses du transcriptome sur un large panel de tumeurs. Ces analyses, réalisées par des biopuces à ADN, ont permis d'identifier 5 sous-types moléculaires différents : Luminal A, Luminal B, HER2 +, « Basal-Like » et « Normal-Like » (Perou *et al.*,

INTRODUCTION

2000; Sorlie *et al.*, 2001; Sorlie *et al.*, 2003; Sotiriou *et al.*, 2003; Sorlie 2004; Hu *et al.*, 2006) (Tableau 9). Les sous-types Luminaux sont dotés des récepteurs hormonaux, le sous-type HER2 + présente une sur-expression de ce co-récepteur. Le sous-type « Basal-like », quant à lui, n'exprime pas les récepteurs hormonaux et ne sur-exprime pas HER2 mais exprime des marqueurs de cellules basales comme CK5/6. Enfin, le sous-type « Normal-like » présente une expression d'un certain nombre de marqueurs de cellules non-épithéliales notamment des adipocytes. Des études complémentaires ont permis de mettre en évidence deux autres sous-types moléculaires, le sous-type « Claudin-low » et « Molecular apocrine » (Farmer *et al.*, 2005; Prat *et al.*, 2010) (Tableau 9). Le sous-type « Claudin-low » est, comme le sous-type « Basal-like » dit triple négatif (ER -, PgR -, HER2 -). Cependant, ce profil a pour caractéristique une diminution de protéines responsables des jonctions entre les cellules (Cadhérine-1 et Claudine), d'où son autre nom : « Mesenchymal-like ». Le second sous-type, « Molecular apocrine » a pour caractéristique principale une expression du récepteur aux androgènes (Androgen Receptor).

A partir de ces catégories, des tests génomiques ont été développés pour une utilisation en routine clinique. Deux de ces tests, MammaPrint® (Agendia, Pays-Bas) et OncotypeDX® (Genomic Health, Etats-Unis), sont commercialisés et font l'objet d'une analyse prospective dans des essais clinique de phase III (MINDACT pour MammaPrint® et TAILORx pour OncotypeDX®) afin d'évaluer leur pouvoir pronostic (Harris *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2008; Sotiriou *et al.*, 2009; Colombo *et al.*, 2011; Wesolowski *et al.*, 2011; McVeigh *et al.*, 2014; Viale *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015).

Récemment, des analyses approfondies menées sur plus de 2000 tumeurs ont permis de distinguer 10 nouveaux groupes issus des sous-types précédemment décrits (Curtis *et al.*, 2012). Ces nouveaux groupes, présentant un pronostic différent, ont permis de mettre en évidence de nouvelles anomalies génétiques conductrices des cancers du sein (Dawson *et al.*, 2013).

INTRODUCTION

Sous-type moléculaire	Proportion	ER α , PgR, HER2	CK5/6, EGFR	Autres marqueurs	Grade histologique	Pronostic
Luminal A	50-60 %	ER α + PgR + HER2 -	-	-	Grade I ou II	Favorable
Luminal B	10-20 %	ER α +/- PgR +/- HER2 +/-	-	-	Grade II ou III	Intermédiaire
HER2+	10-20 %	ER α - PgR - HER2 +	+/-	-	Grade III	Défavorable
Basal-Like	5-15 %	ER α - PgR - HER2 -	+	-	Grade III	Très défavorable
Normal-Like	5-10 %	ER α +/- PgR ? HER2 -	+	-	Grade I	Intermédiaire
« Molecular apocrine »	8-14 %	ER α - PgR - HER2 +/-	+/-	AR +	Grade II ou III	Intermédiaire
« Claudin-low »	12-14 %	ER α - PgR - HER2 -	+/-	Cadhérine bas/- Claudine bas/-	Grade III	Défavorable

Tableau 9 : Classification moléculaire dans les cancers du sein

Récapitulatif des critères moléculaires utilisés en clinique pour déterminer le sous-type moléculaire d'un carcinome mammaire avec 7 groupes : Luminal A, Luminal B, HER2+, Basal-like, Normal-like, Molecular apocrine et Claudin-low.

L'ensemble de ces études visant à mieux caractériser les cancers du sein ont permis également d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, avec le développement des classifications moléculaires, le concept de thérapie personnalisée a émergé. Le cancer du sein illustre particulièrement bien cette situation, avec des thérapies très différentes suivant le sous-type de cancer à traiter.

INTRODUCTION

d. Prise en charge thérapeutique

✓ *Les thérapies conventionnelles*

A l'heure actuelle, cinq grandes approches thérapeutiques sont à disposition des praticiens. Il s'agit de la chirurgie, de la radiothérapie, des chimiothérapies, l'hormonothérapie et des thérapies ciblées. Ces approches sont utilisées en combinaison, en fonction de la tumeur (Guide ALD 30 « cancer du sein », **HAS (Haute Autorité de Santé)**).

Carcinomes in situ

Un carcinome *in situ* sera traité le plus souvent par une chirurgie conservatrice (tumorectomie) accompagnée d'une radiothérapie (50 Gy en 25 fractions de 2 Gy, 5 jours/semaine, 5 semaines). Une mastectomie complète peut être également réalisée, suivie ou non de l'exérèse du ganglion sentinelle (et curage axillaire si le ganglion sentinelle est envahi).

Carcinomes invasifs

Les carcinomes mammaires invasifs, hormis les tumeurs volumineuses et les cancers du sein inflammatoires, sont également traités par une chirurgie d'emblée. Les thérapies adjuvantes sont définies après examen anatomopathologique des pièces opératoires permettant de définir le grade histopronostique (SBR), le stade TNM, le niveau d'expression des récepteurs hormonaux et de HER2.

Après une mastectomie partielle, l'irradiation locale se fait selon le schéma indiqué précédemment (25 x 2 Gy), elle peut être suivie par une dose additionnelle de 10 à 16 Gy (en 1 à 2 semaines) en cas de facteurs de récurrence (tumeur de haut grade, atteinte des berges,...). En revanche, après une mastectomie totale, l'irradiation de la paroi thoracique n'est pas systématique. Elle dépend des facteurs de mauvais pronostics associés (grade élevé, âge jeune, envahissement ganglionnaire,...). S'il y a envahissement axillaire, ou présence de facteurs de mauvais pronostic, une irradiation de la région sus-claviculaire peut également être envisagée.

Les carcinomes invasifs peuvent également être traités par une chimiothérapie postopératoire. Dans ce cas, elle sera réalisée avant les séances de radiothérapie. Il existe plusieurs protocoles de chimiothérapie, le plus souvent basés sur un schéma de 4 à 6 cures espacées de 21 jours. Ces cures reposent généralement sur une combinaison de molécules ciblant les cellules en prolifération comme les antimétabolites (5-Fluorouracile), les anthracyclines (Epirubicine), les agents alkylants (Cyclophosphamide), et les taxanes

INTRODUCTION

(Taxotère). Le protocole est défini suivant les facteurs pronostiques, les facteurs prédictifs de réponse aux traitements, et les éventuelles contre-indications. Parmi ces protocoles, on peut citer le protocole FEC 100 (5-Fluorouracile, Epirubicine, Cyclophosphamide) administré en 6 cures si absence d'atteinte ganglionnaire, ou en 3 cures suivies de 3 cures de Taxotère dans le cas contraire.

Concernant les cancers du sein Her2 positif, le protocole standard consiste en 3 cures de FEC 100 suivies de 3 cures de Taxotère associé au Trastuzumab (thérapie ciblée anti-Her2).

Dans le cadre des cancers du sein hormonosensibles, une hormonothérapie est administrée sur 5 ans après les autres éventuels traitements adjuvants. Si la patiente n'est pas ménopausée, un inhibiteur compétitif des œstrogènes (Tamoxifène) est indiqué, alors que pour les patientes ménopausées, des inhibiteurs de l'aromatase (responsable de la synthèse des œstrogènes) peuvent être utilisés.

Cancer du sein métastatique

Le traitement des cancers du sein métastatiques repose sur des traitements systémiques (chimiothérapie, hormonothérapie, thérapie ciblée). Il est défini en fonction des caractéristiques histologiques de la tumeur primaire (Statut Her2, expression des récepteurs hormonaux, ...), des facteurs prédictifs de réponse aux traitements et des traitements antérieurs administrés. Des traitements locorégionaux (chirurgie, radiothérapie) peuvent être envisagés sur la tumeur primaire si la patiente est en rémission de sa maladie métastatique. Enfin, un traitement local des métastases soit à visée antalgique (métastases osseuses), soit à visée curative (métastases hépatiques, cérébrales ou pulmonaires) peut être discutée dans certaines situations.

INTRODUCTION

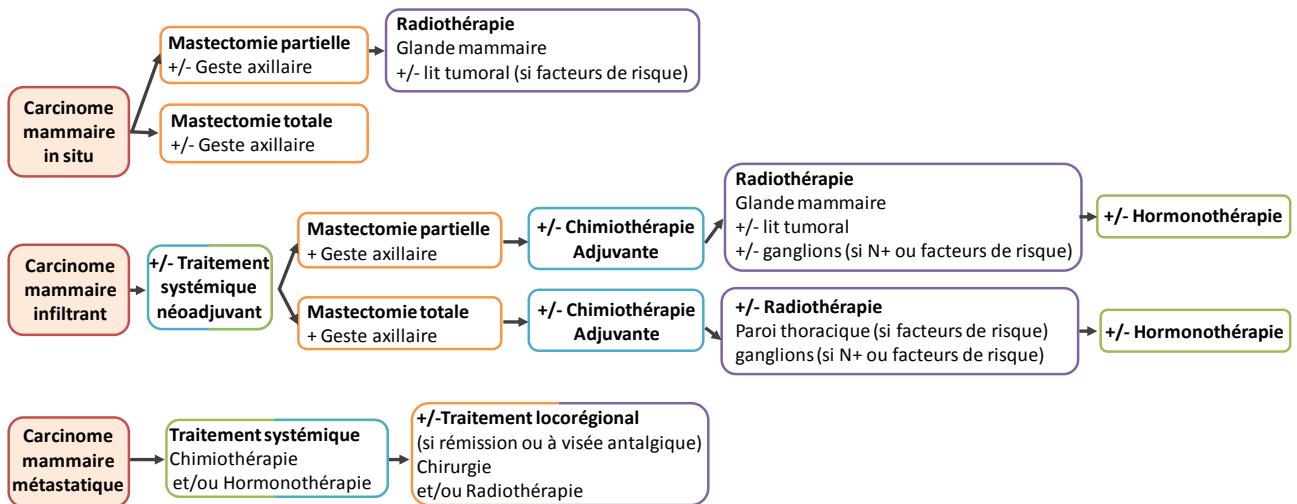


Figure 16 : Principe de la prise en charge thérapeutique dans le cancer du sein

Diagramme de prise en charge thérapeutique en fonction des caractéristiques histologiques de la tumeur cancéreuse mammaire. Adapté de « Guide ALD 30 – Cancer du sein, HAS »

✓ Les thérapies émergentes

Le développement des thérapies ciblées (anticorps bloquants et petites molécules inhibitrices) a permis l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces stratégies sont essentiellement dirigées contre les facteurs de croissance, leurs récepteurs et leurs cascades de signalisation (Figure 17). Les échecs thérapeutiques constatés dans les cancers du sein semblent être en partie imputables à la surexpression / suractivation des récepteurs aux facteurs de croissance (Magne *et al.*, 2010).

Ciblage des facteurs de croissance et de leurs récepteurs

Le premier récepteur ciblé dans le cancer du sein a été HER2. En effet, 10 à 20 % des cancers du sein surexpriment ce récepteur (Tableau 9), et présentent un phénotype très agressif. C'est dans ce contexte que la première thérapie ciblée, le Trastuzumab, a été développée et validée par la **FDA (Food and Drug Administration)** en 1998. Le Trastuzumab est un anticorps monoclonal humanisé dont le mécanisme d'action n'est toujours pas complètement élucidé (Vu *et al.*, 2012). Même si son efficacité est démontrée, des résistances intrinsèques ou acquises en limitent les effets (Vogel *et al.*, 2002; Nahta *et al.*, 2007). Dans ce contexte, un certain nombre de nouveaux inhibiteurs de HER2 ont été développés, avec, pour trois d'entre eux, une autorisation de la FDA pour un usage clinique : le Trastuzumab-DM1, le Pertuzumab et le Lapatinib (Fang *et al.*, 2011; Liedtke *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2013). Le Trastuzumab-DM1 a été imaginé afin d'améliorer l'efficacité du Trastuzumab. C'est une chimère entre le Trastuzumab et une molécule chimiothérapeutique anti-microtubule,

INTRODUCTION

l'Emtansine (ou DM1). Le principe est d'associer les effets du Trastuzumab aux effets cytotoxiques d'une chimiothérapie conventionnelle. Cette thérapie, en ciblant plus spécifiquement les cellules cancéreuses, réduit les effets secondaires associés aux chimiothérapies (Chari 2008; Burris *et al.*, 2011). Depuis 2013, la FDA autorise l'utilisation du Trastuzumab-DM1 en seconde ligne, pour les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+ métastatique en échec thérapeutique après traitement Trastuzumab + Taxotère (Verma *et al.*, 2012; Welslau *et al.*, 2014; Miranda Romero *et al.*, 2015). Alors que le Trastuzumab est dirigé contre le domaine extracellulaire IV de HER2, le Pertuzumab est un anticorps monoclonal qui reconnaît le domaine extracellulaire II du récepteur et qui empêche sa dimérisation (Adams *et al.*, 2006; Harbeck *et al.*, 2013). Il inhibe notamment l'hétérodimérisation HER2 / HER3 qui, *via* la voie **PI3-K / Akt**, semble conduire à la résistance au Trastuzumab. Il est donc autorisé par la FDA pour une utilisation en association avec le Trastuzumab et le Taxotère pour les cancers du sein HER2+ métastatiques (Swain *et al.*, 2015). Il est également autorisé pour une utilisation néo-adjuvante dans ces cancers. Contrairement au Trastuzumab et au Pertuzumab, le Lapatinib n'est pas un anticorps mais un mimétique de l'ATP menant à l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de HER2. Il a été validé par la FDA pour un traitement adjuvant de cancers du sein HER2+ avancés en combinaison avec le Capecitabine (antimétabolite) (Geyer *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2008). Des études sont également menées afin d'évaluer le bénéfice d'une association Trastuzumab / Lapatinib dans les cancers HER2+ réfractaires au traitement Trastuzumab seul (Blackwell *et al.*, 2010; Baselga *et al.*, 2012; Mates *et al.*, 2015).

Alors que les thérapies anti-HER2 ont prouvé leur efficacité, la piste de l'inhibition d'**EGFR** (**E**pidermal **G**rowth **F**actor **R**eceptor), membre de la même famille et co-récepteur d'HER2, dans le cancer du sein a été explorée. Il s'avère que dans les cancers du sein triple négatifs (ER α -, PgR -, HER2 non surexprimant), EGFR est davantage exprimé et activé que dans les autres sous-types (Nielsen *et al.*, 2004; Reis-Filho *et al.*, 2008; Hochgrafe *et al.*, 2010). Sa surexpression est, par ailleurs, de mauvais pronostic dans ce sous-type moléculaire (Viale *et al.*, 2009; Eccles 2011). Tout comme HER2, l'inhibition peut se faire par des anticorps monoclonaux bloquants comme le Cétuximab ou le Panitumumab, ou alors par l'utilisation de petites molécules inhibitrices telles que le Gefitinib ou l'Erlotinib. Cependant, alors que ces inhibiteurs ont été validés pour une utilisation clinique dans le traitement d'autres cancers (poumon, colon, ...), ces derniers peinent à prouver leur efficacité dans le cancer du sein, malgré un nombre conséquent d'études précliniques et d'essais cliniques

INTRODUCTION

précoces (Corkery *et al.*, 2009; Carey *et al.*, 2012; Crown *et al.*, 2012; Duffy *et al.*, 2012; Baselga *et al.*, 2013).

D'autres inhibiteurs, ciblant cette fois-ci le VEGF et son récepteur ont également été développés pour traiter les cancers du sein triple négatifs (Linderholm *et al.*, 2009). Parmi ces anti-angiogéniques, l'anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF Bevacizumab a été autorisé par la FDA pour le traitement des cancers non HER2+, en combinaison avec le paclitaxel, dans le cadre d'un cancer métastatique n'ayant pas été traité par chimiothérapie au préalable (Robert *et al.*, 2011). Cependant, cet anti-angiogénique a une efficacité très controversée, ce qui a poussé la FDA à le retirer du marché en 2011 (Sasich *et al.*, 2012). En Europe, le Bevacizumab peut toujours être utilisé dans le traitement de cancers du sein métastatiques. Dans ce cadre de controverse, de nouvelles études cliniques ont démarré, afin de mieux appréhender le rapport bénéfice / risque de cette thérapie (Shastri *et al.*, 2013). De plus, d'autres anticorps monoclonaux sont en cours de développement. C'est le cas du Ramucirumab qui cible le récepteur VEGFR2. Il est actuellement en essai clinique de phase III dans le cadre d'un co-traitement avec le Doxetaxel pour les cancers du sein métastatiques HER2 non surexprimant (Mackey *et al.*, 2009). L'utilisation d'inhibiteurs de kinases tels que le Sunitinib ou le Sorafenib sont également en cours d'évaluation (Bachelot *et al.*, 2014; Bazzola *et al.*, 2015). En plus de cibler VEGFR2, le Sunitinib inhibe **FLT-3** (**Fms-Like Tyrosine kinase 3**), **RET** (**RE**arranged during **T**ransfection) et **PDGFR-β** (**P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor **R**eceptor-**B**eta). Ce spectre large d'inhibition peut entraîner des toxicités fortes, notamment lors d'une combinaison avec un agent chimiothérapeutique (Crown *et al.*, 2013). Le Sorafenib a également un spectre d'inhibition assez large. L'inhibition de VEGFR1, 2 et 3 mise à part, il bloque l'activité kinasique de PDGFR- β, FLT-3, Raf-1 et c-kit. Cet inhibiteur présente donc également une toxicité importante (Chen *et al.*, 2014), mais un essai clinique de phase II, portant sur l'association du Sorafenib avec de la Capécitabine, semble montrer un bénéfice intéressant pour le patient. L'utilisation de ce traitement à une dose moins toxique dans un essai clinique de phase III a, par ailleurs, démarré en 2013 (Baselga *et al.*, 2013).

Ciblage des cascades de signalisation induites

Le ciblage des facteurs de croissance et de leurs récepteurs n'est pas la seule stratégie de thérapies ciblées actuellement développée. En effet, l'inhibition des voies de signalisation sous-jacentes est également envisagée. Durant le traitement des cancers HER2+ par le

INTRODUCTION

Trastuzumab, de nombreux cas de résistance sont observés. Ces résistances peuvent être la conséquence d'une suractivation de la voie PI3-K / Akt / **mTOR** (**mammalian Target Of Rapamycin**) (Berns *et al.*, 2007; Garrett *et al.*, 2011). Par conséquent, des inhibiteurs de PI3-K comme LY294002 ou la Wortmannine ont été étudiés, cependant leur forte toxicité, leur faible solubilité et leur instabilité ne permettent pas d'envisager une utilisation clinique (Walker *et al.*, 2000; Stein 2001). Plus récemment, l'étude d'autres inhibiteurs de PI3-K tels que GDC-0941 ou XL147 ont démontré des propriétés plus intéressantes pour des applications médicales (Marone *et al.*, 2008; Junttila *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2014). Le GSK690693, qui inhibe l'activité d'Akt, est également à l'étude (Rhodes *et al.*, 2008; Engelman 2009). Enfin, plus en aval dans la signalisation, mTOR est également une cible d'intérêt. Les dérivés de la Rapamycine comme l'Évérolimus et le Temozolomide ont été développés pour inhiber cette protéine. Ils sont par ailleurs en essai clinique de phase II et III pour une utilisation dans les cancers du sein HER2+ en combinaison avec le Trastuzumab (Nahta *et al.*, 2010; Lauring *et al.*, 2013). La voie PI3-K / Akt / MTOR étant également suractivée dans les cancers luminaux réfractaires à l'hormonothérapie (Stemke-Hale *et al.*, 2008), l'utilisation de l'Évérolimus en combinaison avec un inhibiteur de l'aromatase (Exémestane) dans les cancers ER+ résistants a été, par ailleurs, approuvée par la FDA (Baselga *et al.*, 2012; Lauring *et al.*, 2013). Enfin, ces composés sont en cours d'évaluation dans le cadre des cancers du sein triple négatifs, mais ils peinent à prouver leur efficacité (Gonzalez-Angulo *et al.*, 2014).

L'inhibition de l'oncoprotéine Src est également une stratégie intéressante dans le traitement du cancer du sein (Hochgrafe *et al.*, 2010; Mayer *et al.*, 2010). Le Dasatinib et le Bosutinib, de petites molécules inhibitrices ciblant Src mais également PDGFR et c-Kit sont actuellement en phase I et II d'essai clinique pour le traitement des cancers du sein triple négatifs (Finn *et al.*, 2011; Fornier *et al.*, 2011; Campone *et al.*, 2012).

Une voie associée à l'activation de Src, la voie des MAPK (Ras / Raf / MEK / ERK), est également suractivée dans les cancers du sein. Elle est impliquée dans de nombreux processus oncogéniques comme la prolifération cellulaire, l'angiogénèse et la dissémination métastatique (Whyte *et al.*, 2009). De plus, l'activation de cette voie est considérée comme de mauvais pronostic dans les cancers du sein triple négatifs (Bartholomeusz *et al.*, 2012). C'est dans ce cadre qu'ont été développés le Tipifarnib et le Lonafarnib (inhibiteurs de farnésyl transférase) qui empêchent l'ancrage membranaire de Ras (Head *et al.*, 2004), mais aussi le Sorafenib qui inhibe Raf (Moreno-Aspitia 2010) et le Selumetinib qui inhibe MEK1/2

INTRODUCTION

(Akinleye *et al.*, 2013). Cependant, même si leur efficacité a été démontrée dans d'autres cancers comme le cancer du pancréas ou le mélanome, des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer leur efficacité dans les cancers du sein (Normanno *et al.*, 2009; Sparano *et al.*, 2009; De Luca *et al.*, 2012; McCubrey *et al.*, 2012; Zardavas *et al.*, 2013).

Très en aval des signalisations induites par les facteurs de croissance, CDK4 et 6 sont également des cibles envisagées. En effet, ces protéines kinases régulant la transition G1/S du cycle cellulaire sont impliquées dans les mécanismes de résistances aux hormonothérapies dans les cancers luminaux (Lange *et al.*, 2011). Ainsi, le Palbociclib, petite molécule inhibitrice de l'activité de ces deux protéines est actuellement en essai clinique de phase III dans le cadre d'une utilisation en combinaison avec le Letrozole (anti-aromatase) pour le traitement des cancers du sein luminaux ER+ et HER2 non surexprimant chez les patientes ménopausées (Rocca *et al.*, 2014).

Enfin, HSP90 (Heat Shock Protein 90), est une protéine engagée dans la maturation et la stabilisation de nombreux oncogènes (dont HER2, EGFR, PDGFR, CDK4 et 6, Src, Akt,...) impliqués dans le développement tumoral mammaire. Dans la perspective d'un traitement ciblant plusieurs voies oncogéniques simultanément (Li *et al.*, 2009), des inhibiteurs d'HSP90 comme la Tanespimycine et l'Alvespimycine ont été développés et sont actuellement en phase d'essai clinique dans le traitement de divers sous-types moléculaires de cancers du sein (Modi *et al.*, 2011; Zagouri *et al.*, 2013).

INTRODUCTION

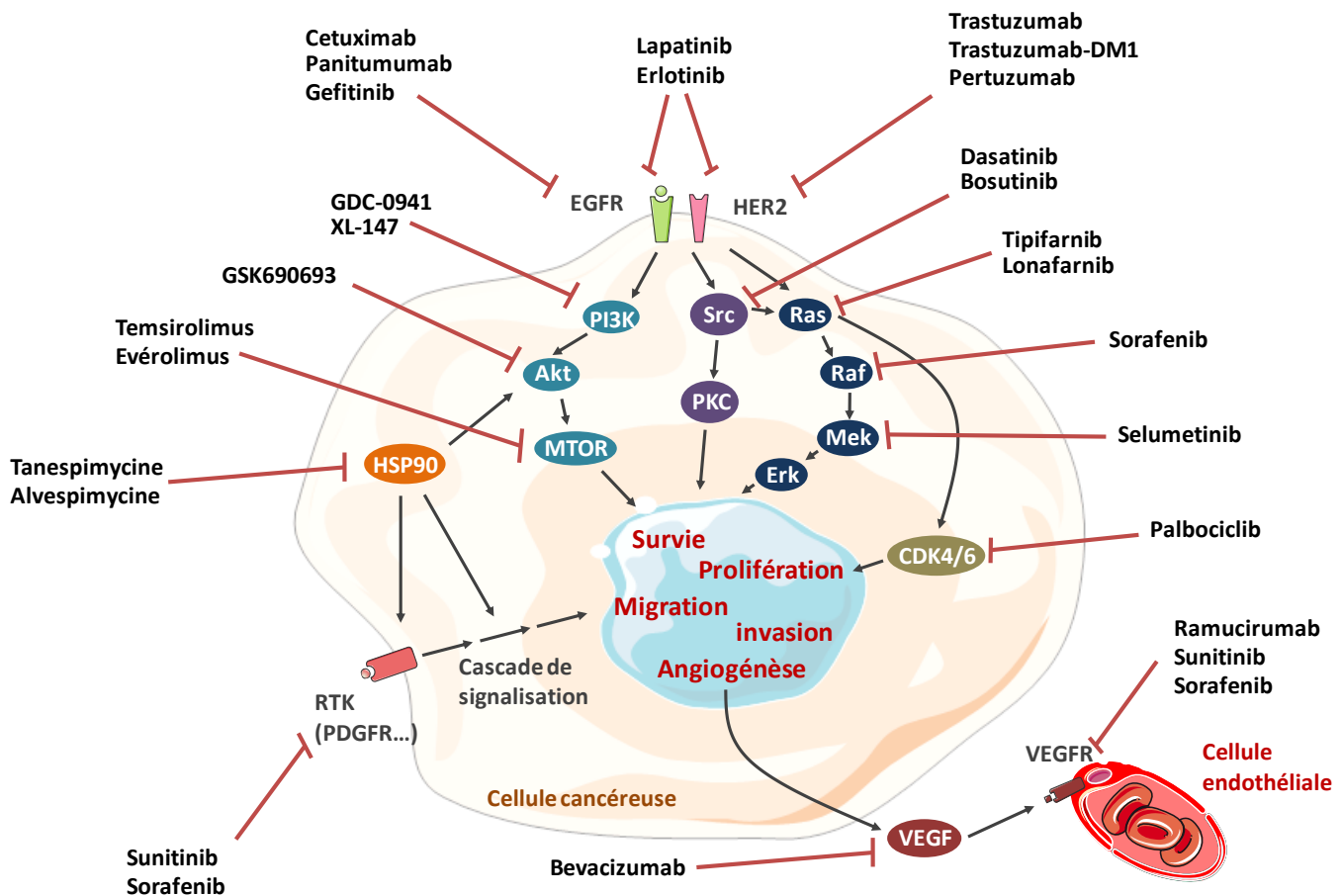


Figure 17 : Les thérapies ciblées émergentes dans le cancer du sein

Illustration des principales thérapies ciblées actuellement en cours de développement préclinique ou clinique dans les cancers du sein. Les seules molécules ayant, à ce jour, obtenues une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) sont le Trastuzumab, le Lapatinib, le Pertuzumab, le Trastuzuma-DM1 et le Bevacizumab (Normanno et al., 2009; Zardavas et al., 2013; Zardavas et al., 2015).

D'après la description ci-dessus des thérapies ciblées imaginées dans le traitement du cancer du sein, on peut dire que la plupart des essais cliniques visent soit à fournir de nouvelles options thérapeutiques pour les cancers triple négatifs, soit à contrecarrer les résistances observées dans un certain nombre de cas après l'hormonothérapie ou les thérapies anti-HER2. Dans ce cadre, le ciblage des facteurs de croissances et de leurs récepteurs est donc une approche thérapeutique intéressante mais nécessite une compréhension large des voies de signalisation, parfois atypiques, retrouvées dans les cancers. La communication croisée entre les récepteurs est notamment un facteur très important, qui, s'il n'est pas suffisamment pris en compte, pourrait mettre en échec les thérapies développées à l'heure actuelle.

INTRODUCTION

e. Importance de CD44 dans les cancers du sein

Parmi les récepteurs bien décrits pour induire des communications croisées, on peut citer CD44. En effet, cette glycoprotéine est non seulement le récepteur de haute affinité à l'acide hyaluronique, mais elle est également impliquée dans de nombreuses co-activations de récepteurs, notamment dans le cancer du sein.

CD44 a été découvert en 1983 comme étant un récepteur participant à l'adressage des lymphocytes (Gallatin *et al.*, 1983). Il est codé par un gène d'environ 50 kb situé sur le chromosome 11 (11p13) (Tableau 10). A partir de ce gène est produit un ARNm de 20 exons dont 10 peuvent être soumis à un épissage alternatif (Screaton *et al.*, 1992). Ainsi, une grande variété d'isoformes peut être produite.

Nom (protéine)	Gène / ARNm			Protéine	
	N° NCBI	Localisation	Taille	N° Uniprot	Taille
CD44 (pleine longueur)	NM_000610.3	11p13	5748	P16070-1	742

Tableau 10 : Le récepteur CD44 humain

Le récepteur CD44, la localisation chromosomique de son gène et la taille de l'ARNm correspondant en paire de base. Le numéro d'accension NCBI correspond au transcrit pleine longueur. Le numéro d'accension Uniprot et la taille de la protéine en acide aminé correspondent à la forme complète du récepteur, incluant la région hypervariable.

Au niveau protéique, le récepteur est constitué d'un peptide signal de 20 acides aminés suivi d'une grande région extracellulaire de 672 acides aminés (pour la forme complète), d'un seul domaine transmembranaire de 21 acides aminés et d'une petite région cytoplasmique de 72 acides aminés (Figure 18). La région extracellulaire forme une structure globulaire maintenue par 3 ponts disulfures. Elle présente de nombreux sites de glycosylation dont certains sont localisés dans la région hypervariable du récepteur. Cette région hypervariable, située au niveau juxtamembranaire, abrite également deux sites de liaison aux glycosaminoglycanes.

INTRODUCTION

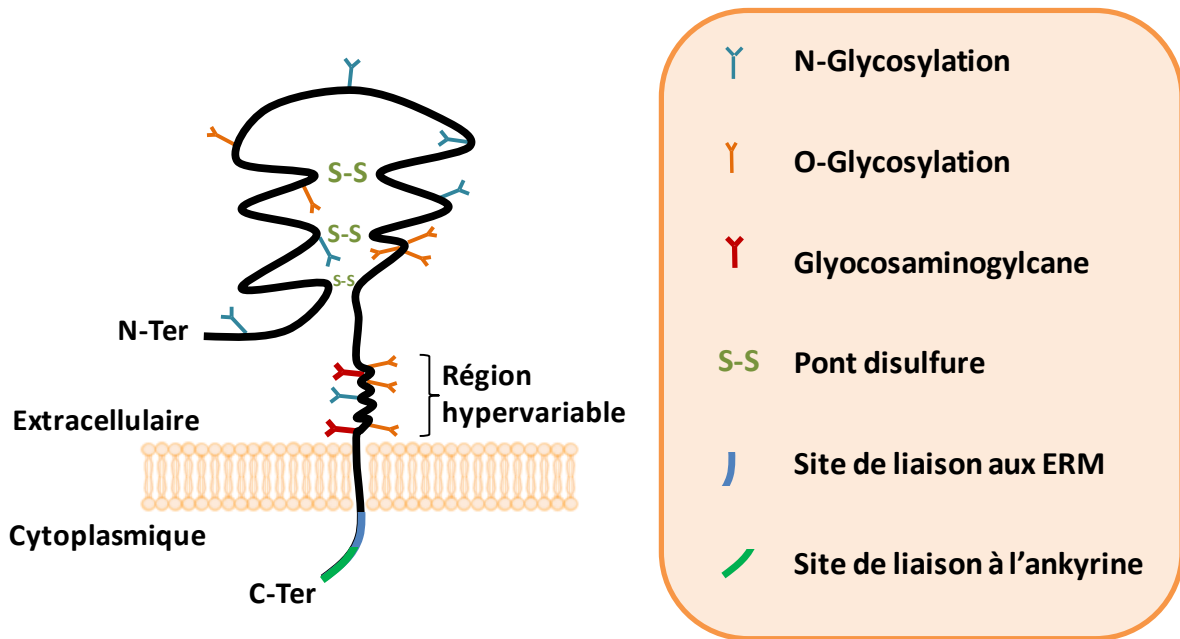


Figure 18 : Représentation schématique de CD44

Le récepteur CD44 est composé d'une longue région extracellulaire globulaire maintenue par des ponts disulfures (vert) avec plusieurs sites de glycosylation (Y) et comprenant ou non une région hypervariable d'un maximum de 385 acides aminés. Cette région est suivie d'un domaine transmembranaire et d'une région cytoplasmique constituée d'un site de liaison aux ERM (bleu) et d'un domaine d'interaction avec l'ankyrine (vert) (Zoller 2011).

Alors que CD44s (forme dépourvue de la région variable) est largement retrouvée dans les cellules normales (Naor *et al.*, 2008), les isoformes de CD44 contenant des variants (CD44v) ne sont exprimées que dans certains types cellulaires (cellules épithéliales, lymphocytes, ...), à des moments particuliers (développement embryonnaire, activation lymphocytaire, ...) (Ruiz *et al.*, 1995). L'expression différentielle des CD44v et de CD44s souligne le rôle différent de ces protéines. En ce qui concerne la partie extracellulaire de CD44s, deux sites de liaison (acides aminés 32 à 132 et acides aminés 150 à 158) vont favoriser une interaction avec l'acide hyaluronique (constituant de la matrice extracellulaire), ce qui permet de classer CD44 comme une molécule d'adhésion cellulaire (Aruffo *et al.*, 1990; Peach *et al.*, 1993). Cependant, CD44 est également un régulateur de signalisation. En effet, l'insertion de l'exon v3 va permettre l'interaction de CD44 avec FGF2 *via* l'ajout d'un héparane sulfate sur le récepteur (Bennett *et al.*, 1995). L'exon v6, quant à lui, est impliqué dans l'interaction avec le HGF et le VEGF (Orian-Rousseau *et al.*, 2008; Tremmel *et al.*, 2009). Ces interactions vont donc modifier la réponse cellulaire aux facteurs de croissance. De plus, la diversité de ces interactions reflète la diversité des effets biologiques induits par

INTRODUCTION

CD44. Bien que CD44 n'ait pas d'activité enzymatique intrinsèque, sa région intracellulaire contient différents domaines d'interaction avec des protéines adaptatrices, permettant la transduction de signaux (Figure 18). Ainsi, l'ankyrine, une protéine du cytosquelette, est recrutée par CD44 pour réguler l'adhésion et la motilité cellulaire dépendantes de l'interaction avec l'acide hyaluronique (Lokeshwar *et al.*, 1994). L'Ezrine, la Radixine et la Moesine (ERM), également des protéines du cytosquelette, vont quant à elles, permettre l'interaction entre CD44 et les filaments d'actine. Ces interactions sont impliquées dans la migration, la forme des cellules ainsi que dans l'adressage de protéines à la membrane plasmique (Fehon *et al.*, 2010). Les mécanismes d'adhésion et de migration sont fréquemment détournés par les cellules cancéreuses. Ainsi, CD44 est très impliqué dans le développement tumoral, notamment dans le cancer du sein. Dans ce cancer, CD44 est principalement connu pour être un marqueur de cellules initiatrices de tumeur (Al-Hajj *et al.*, 2003). Cependant, son rôle ne se cantonne pas à celui d'un simple marqueur. En effet, CD44 semble directement engagé dans les mécanismes métastatiques mis en place par les cellules cancéreuses de sein (Herrera-Gayol *et al.*, 1999; McFarlane *et al.*, 2015). Dans ce contexte, CD44 peut induire l'invasion cellulaire par l'activation de la voie des RhoGTPases. En effet, l'interaction entre l'acide hyaluronique et CD44 permet le recrutement de protéines adaptatrices comme **Tiam1** (T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1) et p115RhoGEF qui vont induire l'activation de RhoA et mener à la survie et l'invasion cellulaire (Louderbough *et al.*, 2011). RhoA peut également favoriser la migration cellulaire en l'absence d'acide hyaluronique. Dans ce cas, RhoA, avec l'ankyrine, permet la formation de lamellipodes (Bourguignon *et al.*, 1999). CD44 intervient également dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques. En effet, la stimulation de CD44 par l'acide hyaluronique permet l'activation de la voie STAT3 qui conduit à l'expression du gène codant **MDR1** (Multi-Drug Resistance 1), une pompe d'efflux impliquée dans l'expulsion des xénobiotiques de la cellule. De plus, il semblerait que CD44, *via* l'ankyrine, interagisse directement avec MDR1 pour stimuler son activité d'efflux des drogues (Bourguignon *et al.*, 2008).

CD44 interagit également avec d'autres récepteurs permettant la transactivation de ces derniers. Ainsi, dans le cancer du sein CD44 agit comme un co-récepteur de Her2. La présence d'acide hyaluronique permet l'interaction entre CD44v3 et Her2, ce qui induit la transactivation de ce dernier (Bourguignon *et al.*, 2001). L'interaction impliquerait Grb2 et mènerait à la prolifération et l'invasion cellulaire par la voie SOS / RAS / MAPK. De plus, bien que les mécanismes soient encore méconnus, CD44 semble contribuer à la résistance au

INTRODUCTION

Trastuzumab, thérapie ciblée anti-Her2 (Boulbes *et al.*, 2015). CD44 interagit également avec l'EGFR, un autre récepteur de la famille ErbB (Wobus *et al.*, 2002). Lorsque cette interaction est induite par l'acide hyaluronique, elle favoriserait la motilité des cellules cancéreuses par l'activation des voies PKC et Akt (Kim *et al.*, 2008). Cependant l'interaction CD44 / EGFR peut également être initiée par une exposition à l'EGF pour induire des effets similaires. Dans ce contexte, l'activation de l'EGFR par son ligand permet le clivage de CD44 par ADAM10 (Murai *et al.*, 2006). Le clivage de CD44 induit alors la migration des cellules cancéreuses (Okamoto *et al.*, 1999). De plus, l'EGF permet une augmentation de l'expression de CD44 qui, lorsqu'il est en quantité suffisante, peut stimuler la migration cellulaire indépendamment d'EGFR et de l'EGF (Ellis *et al.*, 2007). La signalisation alors induite nécessite la présence d'acide hyaluronique.

Ces interactions ne se limitent pas aux membres de la famille ErbB. CD44 interagit également avec le récepteur à l'HGF : c-Met (Matzke *et al.*, 2007). Dans ce cas, CD44v6 fixe l'HGF avec c-Met et potentialise les effets de ce récepteur (Orian-Rousseau *et al.*, 2002). En effet, la fixation de l'HGF induit le recrutement des protéines ERM par CD44 qui permettent de catalyser l'activation de Ras par c-Met, en rapprochant physiquement les différents acteurs de la voie de signalisation (Orian-Rousseau *et al.*, 2007). Ainsi, CD44 contribue aux effets biologiques de l'HGF passant par Ras comme la migration (dépendante de CDC42) ou la prolifération (dépendante des MAPK) (Goyal *et al.*, 2013). Enfin, bien que mal décrit dans le cancer du sein, il a été démontré dans d'autres cancers que CD44v6 contribue à l'angiogénèse dépendante de l'activation de VEGFR2 par son ligand (Tremmel *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces travaux a mis en évidence l'importance de CD44 dans l'agressivité des cancers du sein, que ce soit par une signalisation directe de CD44 après fixation de l'acide hyaluronique, ou par une action de co-récepteur favorisant les signalisations oncogéniques d'autres récepteurs.

INTRODUCTION

II. Les voies aéro-digestives supérieures (VADS)

1. Généralités

Les voies aéro-digestives supérieures regroupent plusieurs organes importants pour les fonctions de respiration, phonation et déglutition. Les VADS sont constitués de plusieurs régions anatomiques distinctes. On peut ainsi schématiquement les regrouper de la manière suivante : fosses nasales et sinus para nasaux, cavité buccale, pharynx et larynx. D'un point de vue anatomique, la trachée et l'œsophage supérieur font également partie des VADS mais leurs pathologies font l'objet de spécialités médicales différentes et ne s'intègrent donc pas dans notre modèle d'étude. La totalité des voies aéro-digestives supérieures est recouverte d'une muqueuse respiratoire de type malpighienne, pluristratifiée et non kératinisée.

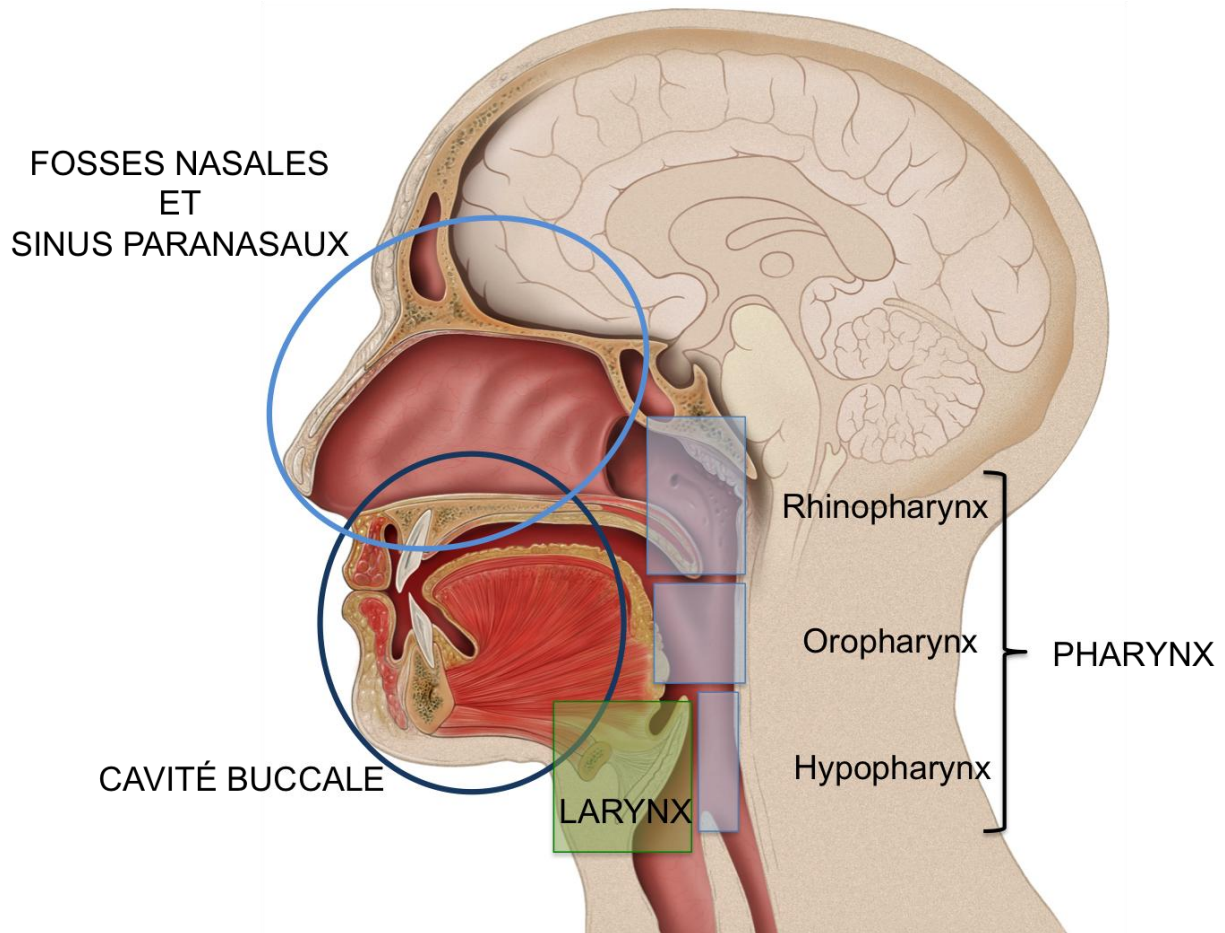


Figure 19 : Régions anatomiques des voies aéro-digestives supérieures

Représentation schématique d'une coupe sagittale de la tête avec la mise en évidence des différentes sous localisations anatomiques constituant les voies aéro-digestives supérieures. Adapté de Medical Illustration by Patrick J. Lynch.

INTRODUCTION

a. Cavités naso-sinusiennes et rhinopharynx

Les cavités naso-sinusiennes font partie du système respiratoire. Les fosses nasales sont constituées de deux cavités abritant les organes de l'olfaction. Ces cavités ont pour rôle de réchauffer, humidifier et purifier l'air inhalé avant son passage dans le larynx (Figure 19). Les cavités sinusiennes sont regroupées en 4 paires symétriques : les sinus frontaux, sphénoïdaux, ethmoïdaux et maxillaires. Le rhinopharynx, appelé également nasopharynx, se situe à la partie supérieure du pharynx, en arrière des fosses nasales (Figure 19).

b. Larynx

Le larynx, quant à lui, est impliqué dans deux grandes fonctions : la respiration et la phonation. Il est constitué de trois étages définis selon le plan des cordes vocales : la sus-glote, la glotte (au niveau des cordes vocales) et la sous-glote. L'étage sus-glottique se situe en dessous de l'os hyoïde. Il est constitué des deux tiers inférieurs de l'épiglotte qui bascule lors de la déglutition et empêche les fausses routes. Il est aussi constitué des bandes ventriculaires qui sont impliquées dans la phonation ainsi que dans la fermeture du larynx lors de la déglutition. Enfin cet étage abrite les aryténoïdes, structures cartilagineuses jouant un rôle dans la phonation. Le plan glottique est principalement constitué des cordes vocales. Enfin, l'étage sous-glottique commence au niveau du cartilage cricoïdien (anneau non extensible) qui se prolonge ensuite par la trachée.

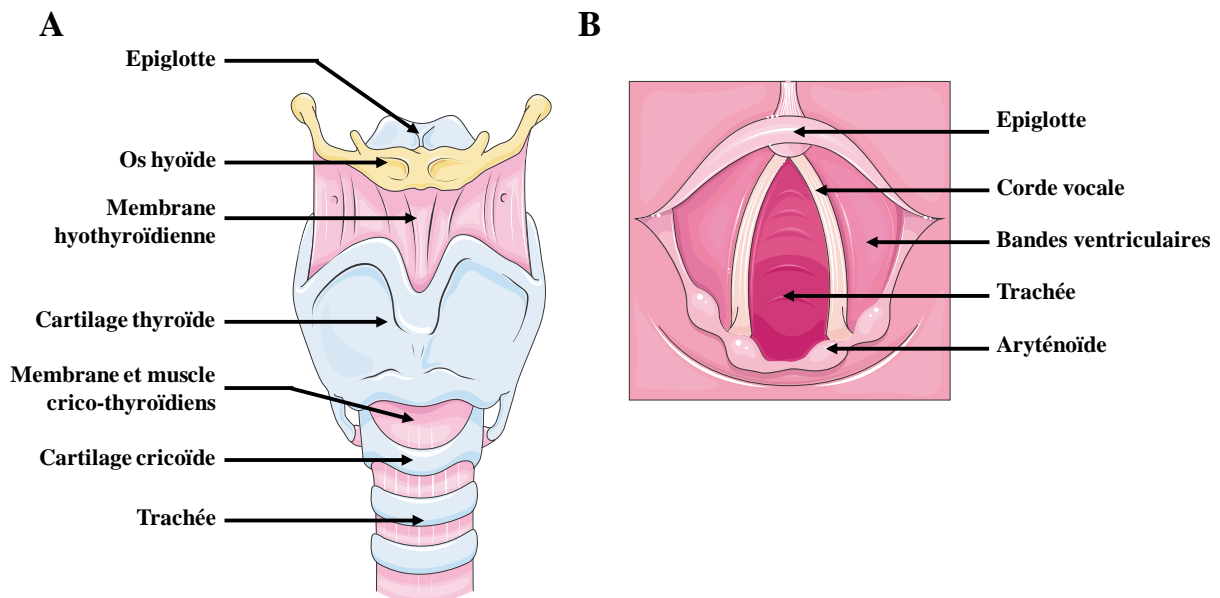


Figure 20 : Anatomie du larynx

Représentation schématique du larynx avec A. vue de face B. coupe transversale. Le larynx est composé de 3 étages : sus-glottique, glottique et sous-glottique. Il abrite les cordes vocales et est engagé dans la respiration et la phonation.

INTRODUCTION

c. Cavité buccale et oropharynx

La cavité buccale a pour rôle principal la préparation du bol alimentaire et sa propulsion vers l'oropharynx. Elle est également impliquée dans la phonation et la perception du goût. Elle regroupe les lèvres, les vestibules, la dentition, la langue mobile, le palais dur (ou palais osseux), la face interne des joues et le plancher buccal. Les dents permettent la mastication des aliments et la langue permet quant à elle, la propulsion du bol alimentaire.

Le prolongement naturel de la cavité buccale est l'oropharynx. Cette zone s'étend du palais mou (ou voile du palais) à l'os hyoïde et abrite notamment la base de la langue et les amygdales palatines. Le palais mou, quant à lui, permet la fermeture de l'accès au rhinopharynx lors de la déglutition.

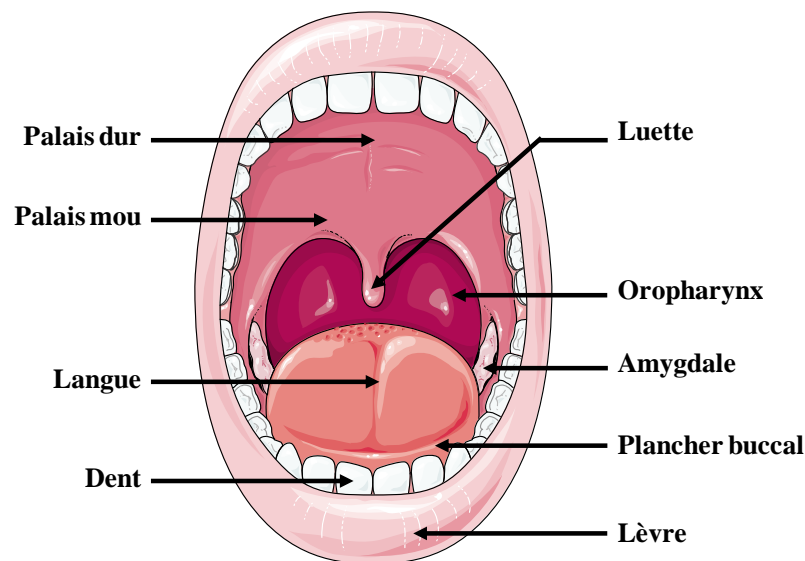


Figure 21 : Anatomie de la cavité buccale

Représentation schématique de la cavité buccale en vue de face. Elle débouche sur l'oropharynx qui va conduire le bol alimentaire vers l'hypopharynx et l'œsophage.

d. Hypopharynx

L'hypopharynx se situe dans le prolongement postérieur de l'oropharynx. Il est en forme de « U » à concavité postérieure entourant le larynx. Les branches de ce « U » sont appelées les sinus piriformes. L'hypopharynx a essentiellement pour rôle l'acheminement du bol alimentaire de l'oropharynx vers l'œsophage.

INTRODUCTION

2. Les cancers des VADS

a. Epidémiologie et facteurs de risque

Dans le monde, on comptabilise plus de 550 000 nouveaux cas de cancers des voies aéro-digestives supérieures par an (Jemal *et al.*, 2011; Torre *et al.*, 2015). Avec 54% de décès, ces cancers sont les 6^{èmes} en termes d'incidence. L'évolution de ces chiffres au cours des années dépend de la sous-localisation tumorale et du pays concerné (Simard *et al.*, 2014).

En France, plus de 14 000 nouveaux cas et environ 4000 décès par ces cancers sont recensés chaque année (Institut National du Cancer (INCa), 2012). Dans les analyses statistiques, on sépare généralement les cancers du larynx des autres cancers des VADS (lèvre, bouche et pharynx). Les cancers du larynx représentent 3322 nouveaux cas et 906 décès par an. Il touche plus souvent les hommes (1,4 cas / 100 000 habitants) que les femmes (0,2 cas / 100 000 habitants). Ce taux d'incidence est en nette diminution depuis les années 1980 : -80% chez les hommes, -50% chez les femmes (Tableau 11). Les autres cancers des VADS représentent 11 316 nouveaux cas et 3 192 décès par an. Alors qu'on observe une forte diminution de l'incidence chez les hommes entre 1980 et 2012 (-60%), l'incidence chez les femmes ne cesse d'augmenter (+60%) (Tableau 11). Elle reste parmi les plus importantes au monde pour ces types de cancer. La moyenne nationale est de 16,1 cas pour 100 000 hommes et 5,6 cas pour 100 000 femmes. De plus, la région Nord-Pas-De-Calais est particulièrement touchée. En effet, en comparaison à la moyenne nationale, la mortalité due à ces cancers dans cette région est respectivement supérieure de 1,87 fois chez les hommes et 1,32 fois chez les femmes. Ceci pourrait s'expliquer par les comportements à risque de la population.

Localisation du cancer	Sexe	1980	1990	2000	2005	2010	2012
Larynx	Homme	11,4	7,6	4,1	2,7	1,7	1,4
	Femme	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
Lèvre, Bouche, Pharynx	Homme	40	37,1	28,9	23,6	18,2	16,1
	Femme	3,5	4,0	4,7	5,2	5,5	5,6

Tableau 11 : Evolution de l'incidence des cancers VADS (Taux Standardisé Monde)

Incidence des cancers des VADS au cours des 30 dernières années. La valeur représentée correspond au Taux Santardisé Monde (TSM) (Source InCa)

Les principaux facteurs de risque impliqués dans le développement des cancers des VADS sont le tabac et l'alcool. La combinaison de ces deux facteurs a un effet synergique et

INTRODUCTION

augmente considérablement le risque relatif (Rothman *et al.*, 1972; Prabhu *et al.*, 2014). En effet, le risque relatif d'un grand fumeur ne consommant pas d'alcool est 2,33 fois plus important qu'une personne non fumeuse et ne consommant pas d'alcool. Les grands consommateurs d'alcool, quant à eux, ont un risque relatif 2,43 fois supérieur. Lorsque ces deux comportements sont associés, le risque relatif augmente de 15,5 fois par rapport à une population non fumeuse et non buveuse. Ce risque varie suivant le siège du cancer étudié. Ainsi, toujours par rapport à une population non consommatrice, les grands fumeurs et grands buveurs d'alcool ont 21,2 fois plus de risque de développer un cancer de l'oropharynx, 35,6 fois plus de risque pour le pharynx et 34,6 fois plus pour le larynx (Zeka *et al.*, 2003).

Le rôle du tabac dans la carcinogénèse est connu depuis longtemps. Parmi les mécanismes mis en jeu, on peut citer la brûlure chronique. En effet, même si la température décroît très rapidement, la fumée est issue d'une combustion du tabac à plus de 850°C. Cela constitue une agression physique chronique de l'épithélium respiratoire forçant son renouvellement. Cette fumée contient également un certain nombre d'agents carcinogènes pouvant affecter les différents organes respiratoires jusqu'au poumon. De plus, une partie de ces carcinogènes se retrouve solubilisée dans la salive. Ces agents, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les nitrosamines, sont oxydés par le cytochrome P450 puis rendus hydrophiles par différentes enzymes comme la glutathion-S-transférase pour permettre leur élimination (Landi 2000; Jalaš *et al.*, 2005). Cependant, lorsque ces enzymes sont saturées, les molécules oxydées deviennent très toxiques pour les cellules et causent des dommages à l'ADN conduisant à une dysplasie puis une cancérisation de l'épithélium respiratoire (Guengerich *et al.*, 1998). Le tabagisme passif associé au développement de cancers des VADS a également été étudié. Il semblerait que ce type de tabagisme augmente le risque de développer des cancers du larynx et, dans une moindre mesure, du pharynx mais n'augmenterait pas le risque de développer des cancers de la cavité buccale (Lee *et al.*, 2008).

Les mécanismes de cancérogénèse liés à la consommation d'alcool sont moins connus. En effet, l'alcool (éthanol) n'est pas directement carcinogène. Il peut cependant irriter les muqueuses, forçant, tout comme les brûlures, le renouvellement de l'épithélium (Seitz *et al.*, 2001). L'alcool contribue également à la dégradation de l'état général de l'individu, notamment par une baisse de la fonction hépatique et par des carences nutritionnelles. Il peut également perturber différentes voies de signalisation des cellules épithéliales par la production d'espèces réactives d'oxygène (Liu *et al.*, 2015). Enfin, l'éthanol étant un solvant

INTRODUCTION

organique, il peut potentialiser les effets carcinogènes du tabac en augmentant la pénétration des composés toxiques tabagiques dans les tissus en contact (Feller *et al.*, 2013).

Les *Papilloma Virus Humains (HPV)* de sérotype 16 ou 18 sont également des facteurs de risque des cancers VADS. En effet, ils semblent être responsables du développement d'une partie des carcinomes oropharyngés (Clump *et al.*, 2015). Ces virus expriment deux oncogènes, les protéines E6 et E7 qui perturbent le cycle cellulaire par l'interaction avec des protéines de type suppresseur de tumeurs (Aswini 2009). Ainsi E6 inactive p53 et empêche donc l'arrêt du cycle cellulaire suite à des dommages à l'ADN. E7, quant à lui, cible la protéine Rb pour conduire à sa dégradation, facilitant ainsi la transition G1/S du cycle cellulaire. Ces cancers viro-induits sont de meilleurs pronostics que les cancers liés au tabagisme et l'alcoolisme car ils répondent mieux aux chimiothérapies et radiothérapies proposées et touchent en général une population plus jeune et en meilleur état général (Herrero *et al.*, 2003).

D'autres facteurs de risques exogènes sont également décrits dans la littérature. Parmi eux, on peut citer l'exposition à l'amiante (Paget-Bailly *et al.*, 2012), l'infection par le virus d'Epstein Barr (Pettersson 2015), la consommation de cannabis (Lopes *et al.*, 2012) ou encore l'exposition aux poussières de bois ou de cuir (Blot *et al.*, 1997; Bonneterre *et al.*, 2007).

Enfin, des facteurs de risque génétiques ont également été mis en évidence. En effet, l'ethnie Han de Chine développe plus fréquemment des cancers induits par le tabac. Cette susceptibilité est causée par un polymorphisme du gène codant le cytochrome P450 impliqué dans les processus de détoxification (Tai *et al.*, 2010).

b. Développement tumoral

Les cancers des VADS sont le plus souvent issus de la cancérisation de l'épithélium malpighien (95 % des cas). On appelle alors ces cancers des carcinomes épidermoïdes. Le processus de cancérisation peut passer par une étape d'hyperplasie puis de dysplasie du tissu. La fréquence de passage par ces étapes avant le développement propre du cancer est difficile à évaluer. Cependant, il semblerait qu'entre 5 et 25 % des lésions dysplasiques donnent lieu à une lésion cancéreuse. La lésion cancéreuse peut présenter une histologie différente. Ainsi, les lésions les moins agressives sont des carcinomes bien différenciés kératinisants (ou matures). Ils sont reconnaissables par l'existence de ponts d'union entre les cellules. Les carcinomes peu différenciés, quant à eux, présentent un aspect similaire aux couches basales de l'épithélium. Ces carcinomes sont beaucoup plus agressifs, avec des propriétés invasives plus

INTRODUCTION

importantes. Enfin, il existe des cancers des VADS formés de cellules tumorales complètement indifférenciées. Il est d'ailleurs parfois difficile de prouver leur origine histologique et peuvent être confondus avec des lymphomes.

Dans 5% des cas, les cancers des VADS ne sont pas de type épidermoïde. Suivant l'origine tissulaire, il peut s'agir de sarcomes, lymphomes, d'adénocarcinomes ou de mélanomes.

Ces cancers étant souvent associés à l'alcool et au tabac, le développement tumoral peut être multifocal, c'est-à-dire se développer plus ou moins simultanément à différents endroits des voies aérodigestives. C'est un point qui complique la prise en charge thérapeutique et rend le pronostic défavorable (Wynder *et al.*, 1977).

Les altérations génétiques conduisant à la cancérisation de l'épithélium des VADS impliquent les gènes suppresseurs de tumeur P21, P16, TP53 et le proto-oncogène CCND1.

c. Classification

✓ *Les différents groupes de cancers des VADS*

On peut distinguer trois groupes de cancers des VADS suivant les facteurs de risque qui leur sont associés (Tableau 12).

Le premier groupe de cancers des VADS réunit les cancers de la cavité buccale, du pharynx et du larynx. Ces cancers sont essentiellement épidermoïdes et représentent la grande majorité des cas. Ils sont associés au tabagisme et à l'alcoolisme.

Le second groupe, constitué des cancers des fosses nasales et des sinus paranasaux, peut être de différents types histologiques. En effet, en plus des carcinomes épidermoïdes, on recense des adénocarcinomes, des carcinomes muco-épidermoïdes, et des carcinomes adénoïdes kystiques. Le rôle du tabac dans le développement de ces cancers est presque inexistant. Cependant, l'exposition aux poussières de bois, aux tanins du cuir ou au nickel est clairement corrélée à l'apparition de cette maladie.

Le dernier groupe, qui représente les cancers du nasopharynx, est principalement constitué de carcinomes épidermoïdes indifférenciés. Alors que le tabac et l'alcool ne sont pas impliqués dans le développement de ce type de cancer, le rôle d'*Epstein Barr Virus (EBV)* ainsi que le profil génétique de certaines ethnies (en Asie du sud-est, au Groenland et au Maghreb) sont, en revanche, reconnus comme facteurs de risque.

INTRODUCTION

Topographie	Histologie	Facteur de risque	Proportion
Cavité buccale	Carcinome épidermoïde	Alcool et Tabac <i>HPV</i>	20-25%
Oropharynx			10-15%
Hypopharynx			25-30%
Larynx			30-35%
Fosses nasales et sinus	Adénocarcinome	Poussière de bois ou de cuir	<1%
Nasopharynx	Carcinome indifférencié	EBV et facteurs génétiques	< 1%

Tableau 12: Répartition des cancers des VADS

Récapitulatif des différentes topographies et des critères histopathologiques associés dans les cancers des VADS, ainsi que leurs fréquences relatives (Guide ALD 30 «cancer des voies aérodigestives supérieures», HAS).

✓ *Le stade TNM*

En plus d'une classification topographique associée à un typage histologique, une classification TNM basée, comme pour les cancers du sein, sur la taille de la tumeur primaire, l'invasion ganglionnaire et la présence de métastases a été mise en place. Les critères varient selon la localisation de la tumeur évaluée.

Les tumeurs de la cavité buccale sont classées de la même manière que les tumeurs de l'oropharynx. L'appréciation « T » se fait sur la taille de la tumeur et sur les éventuelles extensions en périphérie de l'organe, avec T1 pour une tumeur petite et localisée jusqu'à T4 pour une tumeur envahissant les tissus environnants (Tableau 13). L'envahissement ganglionnaire est également apprécié avec une classification allant de N0 à N2 (voir N3 pour les tumeurs de l'oropharynx), avec N0 pour une absence d'atteinte ganglionnaire et N2/3 pour une forte atteinte ganglionnaire.

La classification des tumeurs de l'hypopharynx est également basée sur la taille de la tumeur primaire mais tient également compte de l'envahissement hypopharyngée (T2) et de la fixation de l'hémilarynx (T3). L'atteinte ganglionnaire est également évaluée sur une échelle allant de N0 à N3.

INTRODUCTION

Tumeurs de la cavité buccale / pharynx		
Localisation	TNM	Description
Cavité buccale et Oropharynx	T1	Tumeur < 2 cm
	T2	2 cm < Tumeur < 4 cm
	T3	Tumeur > 4 cm
	T4a	Extension osseuse, cutanée, muscles de la langue, nerf dentaire (résécable)
	T4b	Envahissement de l'espace masticateur / cavum / base du crâne / artère carotide interne (non résécable)
Hypopharynx	T1	Tumeur < 2 cm ET limitée à une sous localisation hypopharyngée
	T2	2 cm < Tumeur < 4 cm dans son plus grand diamètre ET/OU plus d'une sous localisation, pas de fixation hémilaryngée
	T3	Tumeur > 4 cm dans son plus grand diamètre ET/OU fixation de l'hémilarynx
	T4	Tumeur envahissant les structures adjacentes (cartilage laryngé,...)

Tableau 13 : Classification TNM des cancers de la cavité buccale et du pharynx

Récapitulatif des critères histopathologiques utilisés en clinique pour évaluer le Stade TNM d'une tumeur cancéreuse de la cavité buccale et du pharynx.

La classification « T » des autres cancers des VADS ne prend pas directement en compte le volume tumoral, mais plutôt l'extension ou non aux tissus adjacents. L'évaluation de l'envahissement ganglionnaire comprend également quatre niveaux allant de N0 (absence d'atteinte ganglionnaire) à N3 (forte atteinte ganglionnaire).

De manière générale, la lymphophilie importante des tumeurs et le diagnostic souvent tardif de celles-ci nécessitent une attention particulière lors de l'évaluation de l'atteinte ganglionnaire. La prise en charge thérapeutique sera alors basée sur le traitement de la tumeur primitive mais aussi sur le traitement des aires de drainages lymphatiques. Ces aires sont classées par groupe en fonction de leurs localisations. On distingue ainsi 6 groupes : le groupe 1 représente les aires sous-mentale (1a) et sous-maxillaire (1b), le groupe 2 représente l'aire jugulaire supérieure, le groupe 3 et 4 correspondent respectivement aux aires jugulaires moyenne et inférieure, le groupe 5 à l'aire spinale et enfin le groupe 6 est attribué aux aires ganglionnaires cervicales pré-laryngées.

INTRODUCTION

d. Importance d'EGFR dans les cancers des VADS

L'EGFR (Epidermal Growth Factor) est le membre prototypique de la famille ErbB comprenant 4 membres : EGFR / ErbB1 / HER1, Neu / ErbB2 / HER2, ErbB3 / HER3 et ErbB4 / HER4 (Bazley *et al.*, 2005). Il a été découvert en 1977 par Stanley Cohen (Carpenter *et al.*, 1978), 17 ans après la découverte de son ligand.

Nom (protéine)	Gène / ARNm			Protéine	
	N° NCBI	Localisation	Taille	N° Uniprot	Taille
EGFR (pleine longueur)	NM_005228	7p11-13	5616	P00533	1210

Tableau 14 : Le récepteur EGFR humain

Le récepteur EGFR, la localisation chromosomique de son gène et la taille de l'ARNm correspondant en paire de base. Le numéro d'accèsion NCBI correspond au transcrit majoritaire. Le numéro d'accèsion Uniprot et la taille de la protéine en acide aminé correspondent à la forme complète du récepteur.

L'EGFR est codé par un ensemble de 26 exons. Son gène est situé sur le bras court du chromosome 7 (7p11-13) (Tableau 14). C'est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase intrinsèque. Il est composé de 4 domaines extracellulaires, 1 domaine transmembranaire et de 3 domaines cytoplasmiques (Figure 22). La partie extracellulaire (620 acides aminés) comprend deux domaines homologues de liaison au ligand (I et III) et deux autres domaines riches en cystéines (II et IV). La partie transmembranaire est constituée d'un seul domaine (23 acides aminés). Il est suivi par un domaine juxtamembranaire (42 acides aminés) puis d'un domaine tyrosine-kinase (268 acides aminés) et enfin d'une queue C-terminale essentielle pour la transduction du signal (233 acides aminés).

INTRODUCTION

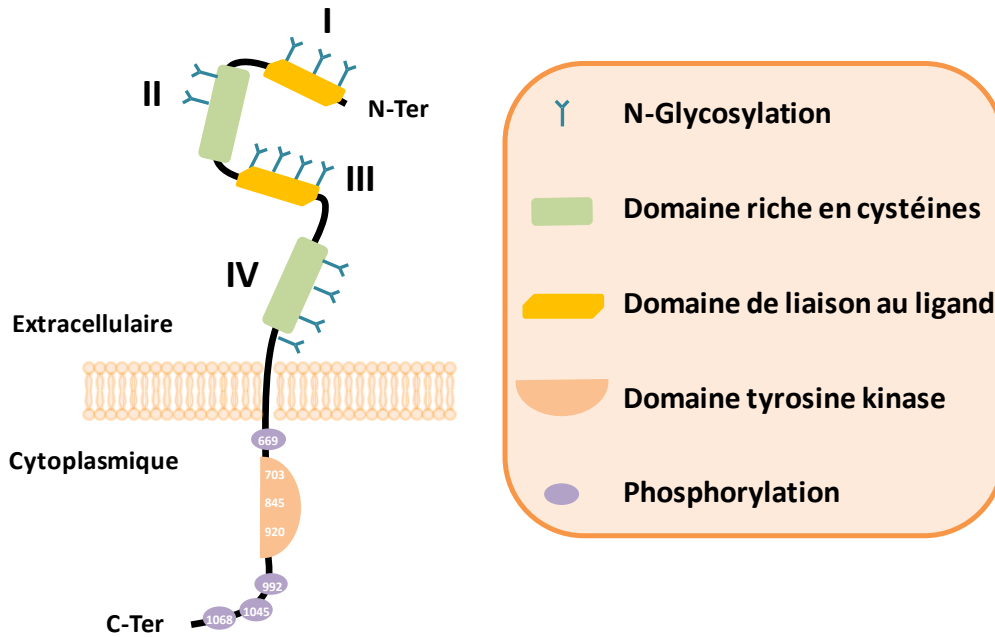


Figure 22 : Représentation schématique de l'EGFR

Le récepteur EGFR est composé d'une région extracellulaire subdivisée en 4 domaines (I à IV) avec les domaines I et III permettant la liaison au ligand (jaune) et les domaines II et IV comprenant des régions riches en cystéines (vert). La partie extracellulaire est également très glycosylée (Y). Elle est suivie d'un domaine transmembranaire et d'une région cytoplasmique constituée de différents résidus phosphorylables importants pour la transduction du signal (violet) et d'un domaine tyrosine kinase (orange).

Après stimulation par l'EGF, l'EGFR se trans-autophosphoryle et peut activer de nombreuses voies de signalisation (STAT, MAPK, PI3-K / Akt, PLC, ...) conduisant à des effets biologiques tels que la prolifération, la migration, l'invasion, la différenciation ou encore l'angiogénèse (Allison 2010). Dans des conditions physiologiques, EGFR est nécessaire pour le développement et le fonctionnement de nombreux organes (Sibilia *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1997). Il est non seulement indispensable dans le développement et le maintien des tissus épithéliaux (Luetteke *et al.*, 1994), mais il est également important dans le développement et le fonctionnement du cœur (Chen *et al.*, 2000), du foie (Scheving *et al.*, 2002), des intestins (Bennett *et al.*, 1989) ou encore l'homéostasie rénale (Sargent *et al.*, 1989). Ce récepteur est également impliqué dans diverses pathologies, notamment les cancers (Rowinsky 2004). L'EGFR est surexprimé dans 90% des carcinomes épidermoïdes des VADS (Dassonville *et al.*, 1993; Grandis *et al.*, 1993). Cette surexpression semble être un évènement « conducteur » de la carcinogénèse des VADS. En effet, elle est retrouvée très tôt

INTRODUCTION

dans le développement de ces cancers (Grandis *et al.*, 1998). De plus, le niveau d'expression d'EGFR semble être directement corrélé avec des caractères histo-pronostiques tels que la taille de la tumeur (Santini *et al.*, 1991), la survie sans rechute (Werkmeister *et al.*, 2000), mais aussi la résistance aux chimiothérapies et à la radiothérapie (Chen *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2002). Bien que les signalisations induites par EGFR dans ces cancers ne soient pas complètement élucidées, il semblerait que la surexpression de l'EGFR soit notamment corrélée à l'activation de STAT3. Celle-ci induirait alors un effet anti-apoptotique sur les cellules cancéreuses (Grandis *et al.*, 2000). Une autre étude a également montré une corrélation entre la surexpression de l'EGFR et l'activation de la voie des MAPKs (Albanell *et al.*, 2001). Cette voie conduirait à l'augmentation de la prolifération cellulaire. L'activation de l'EGFR pourrait être aussi impliquée dans l'induction de la voie PI3-K / Akt (Ongkeko *et al.*, 2005), conduisant également à la croissance tumorale. Enfin, une stimulation du récepteur par l'EGF dans les cellules cancéreuses des VADS permet, *in vitro*, l'activation de la voie PLC favorisant la motilité cellulaire (Thomas *et al.*, 2003). L'ensemble de ces données ont mené au développement de thérapies ciblées anticancéreuses dirigées contre l'EGFR dans les cancers VADS. Un anticorps monoclonal, le Cétuximab, a par ailleurs obtenu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement de ces cancers en 2006. Cet anticorps peut agir à trois niveaux : il peut empêcher la fixation du ligand sur l'EGFR, il peut induire l'internalisation du récepteur et il peut provoquer une réponse immunitaire de type **ADCC** (**Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity**) (Haraldsdottir *et al.*, 2013). Dans le premier cas, l'absence de fixation du ligand empêche l'activation du récepteur et donc l'induction des signalisations oncogéniques sous-jacentes. Dans le second cas, l'internalisation du récepteur mène soit à la dégradation de ce dernier, soit à son recyclage mais sans son activation. Enfin, le dernier mécanisme fait intervenir certaines cellules immunitaires (NK, macrophages, ...) qui vont reconnaître le complexe anticorps-antigène à la surface de la cellule cancéreuse et provoquer une apoptose.

Il existe néanmoins des mécanismes de résistances limitant l'efficacité de ces thérapies. Parmi ces mécanismes, les communications croisées entre les récepteurs y tiennent une place importante (Kalyankrishna *et al.*, 2006). En effet, l'EGFR est capable de se dimériser avec les autres membres de la famille ErbB contre lesquels le Cétuximab n'est pas dirigé. Ainsi, une surexpression d'Her2 et d'Her3 a été retrouvée dans les cancers des VADS résistant au Cétuximab (Pollock *et al.*, 2015). L'EGFR peut également se dimériser avec d'autres récepteurs tyrosine kinase, comme IGF-1R (Barnes *et al.*, 2007). Ces interactions mènent

INTRODUCTION

également à une résistance au Cétuximab qui peut être évitée par la combinaison d'un traitement anti-EGFR et anti-IGF-1R (Galer *et al.*, 2011). Bien que n'interagissant pas directement avec l'EGFR, le récepteur à l'HGF, c-MET, est aussi impliqué dans la résistance aux thérapies anti-EGFR. Lorsqu'il est activé, c-MET induit l'activation de signalisations recoupant celles de l'EGFR (Knowles *et al.*, 2009). Une augmentation d'expression de HGF par les cellules cancéreuses permet donc de compenser l'inhibition d'EGFR par le Cétuximab et donc d'entraîner une résistance à ce traitement (Liska *et al.*, 2011). Enfin, une transactivation de l'EGFR par des **RCPG (Récepteurs Couplés aux Protéines G)** pourrait également favoriser les phénomènes de résistances. Ces récepteurs peuvent induire la maturation de l'EGF et du TGF par l'activation de protéases membranaires comme les protéines ADAMs (Blobel 2005). Ces récepteurs peuvent également, par la voie Src, induire directement une phosphorylation de l'EGFR de manière ligand indépendante (Buchanan *et al.*, 2006). Ensemble, ces interactions non conventionnelles favoriseraient l'induction de signalisations pro-tumorales nécessitant alors une modification de la prise en charge thérapeutique.

e. Prise en charge thérapeutique

✓ *Les thérapies conventionnelles*

La prise en charge thérapeutique repose, comme pour la plupart des cancers, sur l'exérèse chirurgicale, la radiothérapie et la chimiothérapie / thérapie ciblée (Figure 23). La démarche thérapeutique dépend des caractéristiques topologiques et histologiques de la tumeur, ainsi que sa classification TNM. Elle dépend également de l'état général du patient (Guide ALD 30 «cancer des voies aérodigestives supérieures» HAS).

La chirurgie des cancers des VADS dépend de la taille et de la localisation tumorale. Le geste chirurgical peut être réalisé par voie externe ou par endoscopie. Cette chirurgie peut, selon l'étendue de l'exérèse être mutilante et nécessiter une reconstruction. Dans certains cas (tumeurs du larynx ou de l'hypopharynx à un stade avancé) une stratégie de préservation d'organe doit être discutée. Cette stratégie repose sur une combinaison de radiothérapie et de chimiothérapie plutôt qu'une chirurgie d'emblée. Une chirurgie de rattrapage peut être envisagée en 2^e intention en cas de non réponse à la radiochimiothérapie. L'exérèse de la tumeur primaire est accompagnée d'un curage ganglionnaire plus ou moins étendu (uni ou bilatéral, fonctionnel ou radical) selon l'organe touché par la maladie et le stade.

INTRODUCTION

Dans le cas des cancers des VADS avancés (T3 ou T4), et selon la présence ou non de facteurs de mauvais pronostic histologiques, la chirurgie peut être suivie par une radiothérapie. En post-opératoire, l'irradiation du lit tumoral et éventuellement des aires ganglionnaires se fait par une dose de 50 à 65 Gy à raison de 2 Gy par jour, 5 jours par semaine pendant 5 à 6,5 semaines. Une radiothérapie en traitement principal, notamment dans le cadre d'une stratégie de préservation de l'organe, peut être proposée avec des doses allant de 65 à 70 Gy fractionnés en 2 Gy par séance, 5 fois par semaine pour une durée de 6,5 à 7 semaines.

Par ailleurs, une curiethérapie (ou radiothérapie endocavitaire), peut être envisagée en 1^{ère} intention dans le cadre d'une tumeur (T1 ou T2) de la cavité buccale ou de l'oropharynx.

La chimiothérapie, quant à elle peut être proposée en association à la radiothérapie dans une visée curative de la maladie. La radiochimiothérapie concomitante est une stratégie thérapeutique s'inscrivant dans une optique de préservation de l'organe où siège la tumeur maligne. Elle associe une irradiation de la tumeur de 70 Gy en 35 fractions de 2 Gy et un traitement polychimiothérapeutique basé sur l'utilisation de taxotère, cisplatine, et 5-Fu.

La chimiothérapie peut également être proposée seule dans le cadre des tumeurs métastatiques. Des protocoles associant du cisplatine (ou carboplatine), du 5-FU et du Cétuximab peuvent être aussi envisagés.

En effet, une dernière approche thérapeutique consiste en l'utilisation de Cétuximab, une thérapie ciblée dirigée contre EGFR. Ce traitement est utilisé dans les cancers épidermoïdes en association avec la radiothérapie et/ou chimiothérapie. Cette association permet une amélioration de la survie globale pour les cancers localement avancés par rapport à une radiothérapie/chimiothérapie seule. Elle peut également être administrée en seconde ligne, pour le traitement de patients en récurrence et/ou métastatiques en échec thérapeutique. Cependant, l'efficacité de cette thérapie reste limitée et de nombreux mécanismes de résistance (émergence d'un variant d'EGFR, suractivation du récepteur ligand indépendant, ...) sont observés. C'est pour cela que de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être imaginées. Certaines, plus ou moins avancées dans les phases pré-cliniques ou cliniques, seront détaillées ci-dessous.

INTRODUCTION

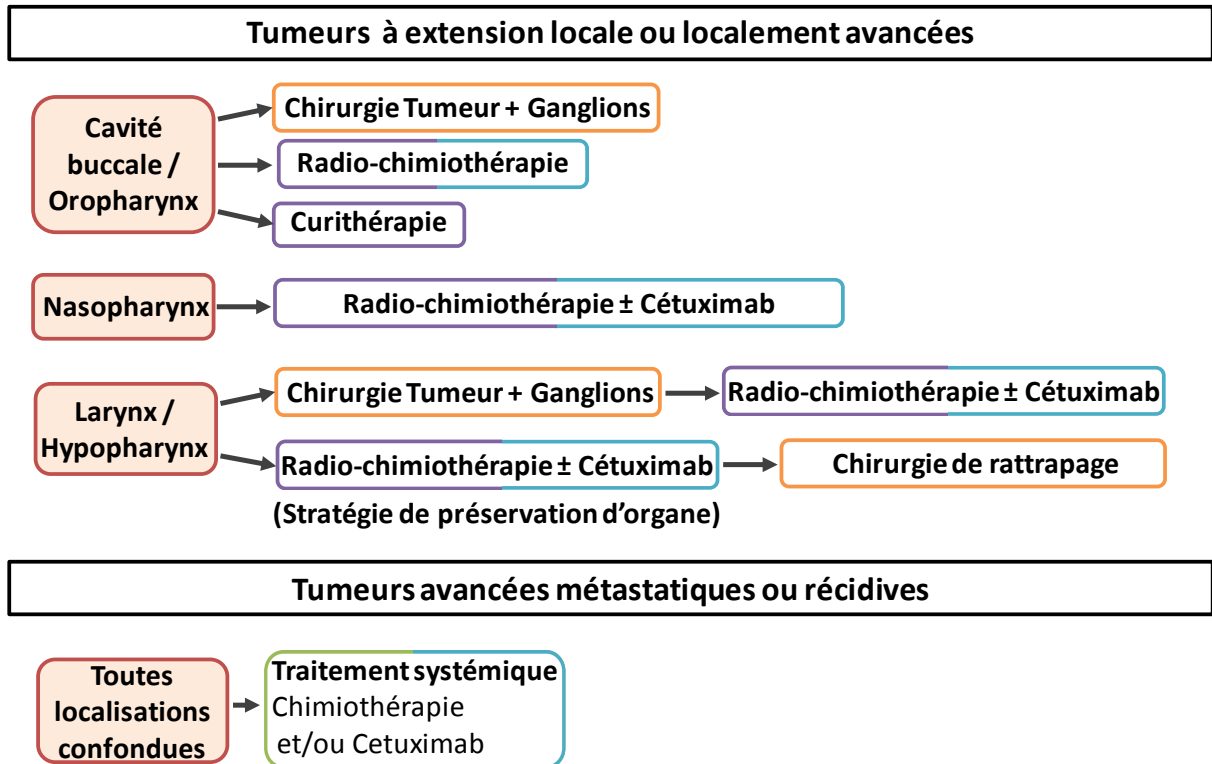


Figure 23 : Principes de la prise en charge thérapeutique dans les cancers des VADS

Diagramme de prise en charge thérapeutique en fonction des caractéristiques histologiques et de la localisation de la tumeur des VADS.

✓ Les thérapies émergentes

Plusieurs stratégies thérapeutiques sont en cours d'évaluation dans le traitement des cancers des VADS (Figure 24).

La première consiste à développer de nouveaux inhibiteurs dirigés contre les membres de la famille d'EGFR. Ainsi l'étude SPECTRUM a permis d'évaluer l'effet du Panitumumab, un autre anticorps monoclonal bloquant EGFR, en association avec une chimiothérapie cisplatine + 5-Fu (Vermorken *et al.*, 2013). Bien que ce traitement n'apporte pas d'amélioration de la survie globale des patients, il permet d'améliorer la survie sans progression et la réponse objective tumorale de ces derniers. Un autre anticorps, le Zalutumumab est actuellement en essai clinique de phase III (Machiels *et al.*, 2011). Il permet également une amélioration de la survie sans progression comparé à des soins de support seul. L'absence d'effet sur la survie globale peut être imputable, comme pour le Cétuximab, à la mise en place de mécanismes de résistance (Cohen 2014). L'utilisation de petites molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase d'EGFR, telles que le Gécitinib et l'Erlotinib, n'ont pas démontré d'effets bénéfiques significatifs en comparaison au traitement radio-chimiothérapeutique standard (Argiris *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2013). Des inhibiteurs plus

INTRODUCTION

larges de la famille de l'EGFR ont également été testés et semblent plus prometteurs. Le Lapatinib, qui inhibe à la fois EGFR et HER2 n'apporte pas de bénéfice seul mais semble bénéfique en association avec de la radiothérapie (Harrington *et al.*, 2009). L' Afatinib et le Dacomitinib ciblent quant à eux EGFR, HER2 et HER4. Ils sont respectivement en essai clinique de phase III et II (Burtness *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015). La diversité des récepteurs ciblés permet de prévenir certaines résistances observées avec le Cétuximab. De plus le Dacomitinib peut cibler l'EGFR variant III dont l'émergence est l'un des mécanismes de résistance fréquemment observés dans les cancers des VADS. L'activité anti-tumorale de ces composés est intéressante (réponse objective de 11% pour le Dacomitinib).

La seconde stratégie vise à inhiber l'angiogénèse notamment par le ciblage du VEGF et de ses récepteurs. En effet, près de 90% des cancers des VADS surexpriment des facteurs angiogéniques (Seiwert *et al.*, 2008). La croissance rapide de ces tumeurs crée des zones hypoxiques où une vascularisation est nécessaire, ce qui fait des anti-angiogéniques une option thérapeutique intéressante. Le Bevacizumab, décrit précédemment, est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF. Il a été testé dans des essais cliniques de phase II en combinaison avec le Cétuximab et le cis-platine et donne des résultats assez prometteurs dans le traitement des cancers métastatiques ou des récurrences (Fury *et al.*, 2015). Une combinaison Bevacizumab avec du 5-Fu a également été testée mais l'essai clinique de phase II a cependant été interrompu en raison d'une progression locorégionale de la maladie trop importante (Salama *et al.*, 2011). Plus récemment, le Vandetanib, un nouvel inhibiteur d'activité tyrosine kinase, a été développé pour cibler le VEGFR2 mais aussi EGFR. Son effet, particulièrement intéressant pour le traitement des cancers de VADS, est actuellement en cours d'évaluation dans un essai clinique de phase II (Limaye *et al.*, 2013). Le Sorafenib et le Sunitinib, deux inhibiteurs à large spectre d'action (ciblant notamment les VEGFR), sont également à l'étude dans les cancers des VADS. Ainsi même si le Sunitinib n'a pas eu d'effet suffisamment convainquant (Choong *et al.*, 2010), le Sorafénib induit des effets intéressants (Elser *et al.*, 2007). En effet, il permet une réponse partielle en monothérapie chez des patients dont la maladie est en récurrence ou métastatique. Enfin, deux autres inhibiteurs, le Motesanib et le Linifanib qui ciblent à la fois les récepteurs au VEGF et au PDGF, sont actuellement en développement préclinique (Kruser *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2014). Leurs effets sur les cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo*, semblent prometteurs, surtout en association avec la radiothérapie.

INTRODUCTION

D'autres récepteurs tyrosines kinases peuvent être également ciblés pour traiter les cancers des VADS. Ainsi, le Foretinib est un inhibiteur avec des propriétés intéressantes. En effet, il inhibe à la fois le VEGFR2 (important pour l'angiogénèse) et c-Met, souvent impliqué dans la prolifération des cellules cancéreuses. Un essai clinique de phase II a démontré une bonne tolérance de l'inhibiteur en monothérapie, mais avec des effets limités à une stabilisation de la maladie (Seiwert *et al.*, 2013). Une action synergique avec le Cétuximab, où la surexpression de c-Met fait partie des mécanismes de résistances, est en cours d'évaluation (Xu *et al.*, 2011). IGF-1R est également une cible de choix dans les cancers des VADS. En effet, sa surexpression est associée à un mauvais pronostic dans ces cancers. Des études précliniques ont, par ailleurs, démontré la bonne efficacité d'un inhibiteur de ce récepteur, la Picropodophylline, dans les carcinomes nasopharyngés (Yin *et al.*, 2013). Ces résultats doivent cependant être confirmés par des essais cliniques.

La voie PI3-K / Akt / mTOR, sous-jacente à EGFR, peut être suractivée dans les cancers des VADS (Simpson *et al.*, 2015). C'est dans ce cadre que deux inhibiteurs de mTOR, l'Évérolimus et le Temsirolimus, ont été testés (Grunwald *et al.*, 2015; Massarelli *et al.*, 2015). Cependant, les résultats sont mitigés dans les cancers des VADS. Ceci est probablement dû à l'hétérogénéité des tumeurs traitées. Ainsi une sélection des patients avec un cancer des VADS dont la voie PI3-K est clairement suractivée (Mutation de PTEN, de PIK3CA,...) pourrait permettre de mieux apprécier les effets de ces inhibiteurs.

INTRODUCTION

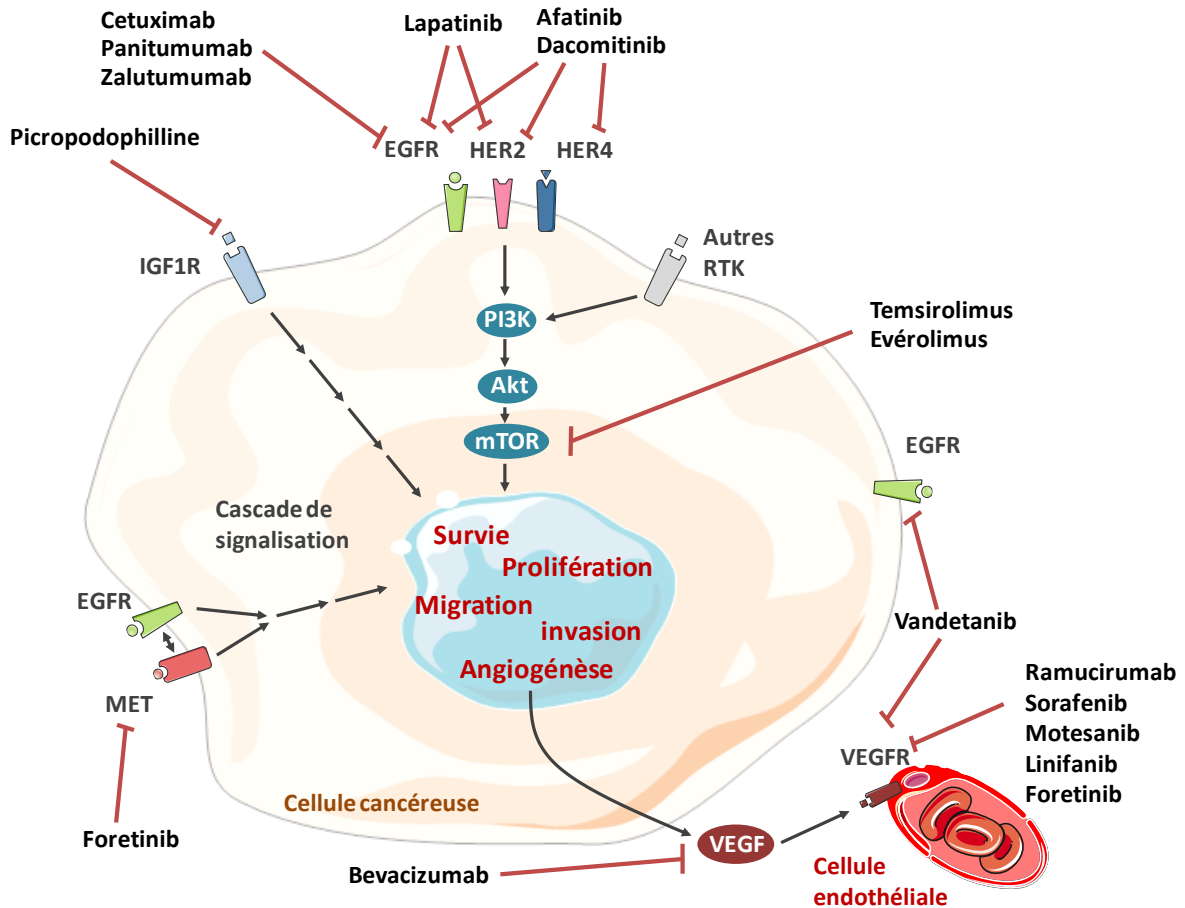


Figure 24 : Les thérapies ciblées émergentes dans les cancers des VADS

Illustration des principales thérapies ciblées actuellement en cours de développement préclinique ou clinique dans les cancers des VADS. La seule molécule ayant, à ce jour, obtenu une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) pour le traitement de ce cancer est le Cétuximab.

En conclusion, les options de thérapies ciblées disponibles dans le traitement des cancers des VADS restent très limitées. Tout comme les thérapies actuellement développées dans les cancers du sein, les thérapies ciblées émergentes dans le traitement des cancers des VADS concernent l'inhibition des facteurs de croissance, de leurs récepteurs et des voies de signalisation induites par ceux-ci. Une compréhension plus étendue de ces voies de signalisation permettrait donc de prévenir les résistances mais également d'imaginer de nouvelles options thérapeutiques.

De manière intéressante, bien que le (pro)NGF soit retrouvé dans ces deux localisations cancéreuses (sein et VADS), l'effet de ce facteur de croissance sur les cellules tumorales n'est que peu connu. La compréhension de son rôle et le décryptage des voies de signalisation induites dans les cellules cancéreuses s'inscrit donc parfaitement dans la dynamique actuelle de développement de thérapies ciblées personnalisées.

**DEMARCHE
EXPERIMENTALE**

Démarche expérimentale

Contexte scientifique

Le développement de composés ciblant les facteurs de croissance, leurs récepteurs (récepteurs à activité tyrosine kinase ou RTKs), ou les effecteurs de leurs signalisations constitue un axe d'approches thérapeutiques prometteuses. Néanmoins, ces thérapies ciblées peinent à démontrer leurs efficacités ; la plupart d'entre elles sont encore en phases précliniques ou demeurent en phases précoces d'essais cliniques. Intrinsèquement, ces nouveaux agents thérapeutiques, du fait de leur spectre d'action réduit vis-à-vis de la nature complexe et hétérogène des carcinomes, se heurtent à des phénomènes de résistance innée ou acquise. L'activation de signaux de transduction en aval des récepteurs de facteurs de croissance sont à l'origine de nombreux échappements des cellules cancéreuses aux thérapies (radiothérapie, chimiothérapie) (Magne *et al.*, 2010). Ainsi, le Trastuzumab, un anticorps monoclonal bloquant dirigé contre le récepteur ErbB2 illustre bien cet état de fait. Son efficacité est maintenant bien établie mais reste limitée. En effet, seuls 9% des cancers du sein sur-expriment ErbB2 (Vogel 2010). De plus, seules 26% des patientes présentant un cancer du sein métastatique de type ErbB2 répondent au Trastuzumab lorsqu'il est utilisé seul en traitement de première ligne (Vogel *et al.*, 2002). A l'instar des dérivés comme le Sorafenib, l'utilisation à des doses efficaces est également limitée par leur pharmacotolérance avec des effets secondaires qui peuvent être délétères (Mellor *et al.*, 2011). Enfin, de nombreux phénomènes de résistance liés à la (co-)activation de voies de transduction par d'autres facteurs de croissance et récepteurs sont décrits. Ces phénomènes sont en particulier liés à l'existence d'un réseau de co-activation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) «kinase networks» (Wilson *et al.*, 2012; Gusenbauer *et al.*, 2013). Dans ce contexte, l'INSERM U908 a été le premier laboratoire à démontrer l'activité du Nerve Growth Factor (NGF) dans le cancer du sein. Le NGF est le membre prototypique de la famille des neurotrophines qui agit via les récepteurs TrkA (Tropomyosin receptor kinase A) et p75^{NTR} (p75 Neurotrophin Receptor). *In vivo*, le NGF favorise le développement tumoral dans des modèles précliniques de souris (Adriaenssens *et al.*, 2008) (US patent n°7618790, 17/11/2009). Plus récemment, nos travaux ont permis de décrire que le précurseur du NGF, le proNGF, est également exprimé, de façon spécifique, dans le cancer du sein (US patent n°8008009, 30/08/2011). Nous avons ainsi montré que l'expression du proNGF est corrélée à

DEMARCHE EXPERIMENTALE

l'invasion ganglionnaire. De plus, le proNGF augmente les capacités migratoire et invasive des cellules cancéreuses de sein *in vitro* (Demont *et al.*, 2012). L'action du proNGF a été principalement décrite dans les cellules neuronales et, dans une moindre mesure, dans certains cancers dont les cancers épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures. Dans le modèle neuronal, le proNGF induit la mort des cellules nerveuses par apoptose, là où le NGF permet survie et différenciation. L'apoptose est due à la fixation du proNGF sur 2 sites de liaison membranaire de haute affinité qui sont la sortiline et p75^{NTR} (Nykjaer *et al.*, 2004). De façon surprenante, nous avons montré que, dans les cellules tumorales mammaires, l'action pro-invasive du proNGF est liée à sa fixation sur la sortiline et à l'activation de TrkA et non celle de p75^{NTR}. Nos premières études sur la signalisation intracellulaire décrivent que le proNGF induit l'activation d'Akt et de Src (Demont *et al.*, 2012). L'ensemble de ces données suggère que l'axe (pro)NGF / TrkA pourrait être un élément important et insoupçonné de la progression tumorale. Il serait donc intéressant de cibler cet axe. Cependant, les études cliniques ont montré que les traitements par un inhibiteur de TrkA (comme le Lestaurtinib) ont une efficacité limitée. Ces résultats décevants ont été imputés au manque de spécificité de cet inhibiteur. De nouveaux inhibiteurs plus spécifiques de TrkA ont ainsi été développés. Nous avons, pour notre part, émis l'hypothèse que l'absence d'efficacité du Lestaurtinib est liée à l'existence de co-activation de récepteurs membranaires impliquant TrkA.

Objectif de la thèse

Dans ce contexte, mon projet de thèse a consisté en la mise en évidence des réseaux de récepteurs induits par le NGF et le proNGF. J'ai pour cela utilisé deux modèles de cancer épithéliaux : le cancer du sein (adénocarcinome) et les cancers des VADS (épidermoïdes) pour lesquels l'expression du NGF, de son précurseur et de son récepteur TrkA ont été rapportées. J'ai plus particulièrement recherché à :

- 1) Décrypter les mécanismes d'action du NGF par protéomique fonctionnelle.
- 2) Etudier les transactivations induites par le proNGF dans les cancers.

Méthodologie

- 1) Décrypter les mécanismes d'action du NGF par protéomique fonctionnelle.

Dans le but de définir les interactomes induits par le NGF, nous avons réalisé une analyse protéomique pour identifier les protéines en complexe avec le récepteur TrkA. Pour cela, le récepteur TrkA portant une étiquette HA a été surexprimé dans les cellules cancéreuses de

DEMARCHE EXPERIMENTALE

sein MDA-MB-231. Cette étiquette a permis d'augmenter l'efficacité du pull-down de TrkA et ainsi la détection de ses partenaires. Puis nous avons validé les protéines identifiées de façon fonctionnelle par :

- Des marquages membranaires pour suivre leur exposition à la membrane plasmique,
- La quantification des signalisations induites (phospho-protéomique et activité des RhoGTPases),
- La quantification des complexes par marquage PLA (Proximity Ligation Assays),
- L'étude *in vitro* et *in vivo* de l'invalidation des récepteurs impliqués.

2) Etudier les transactivations induites par le proNGF dans les cancers

Dans le but d'évaluer les transactivations de récepteurs à activité tyrosine kinase, j'ai réalisé un « kinase array » qui a démontré une modulation de l'EGFR. J'ai donc cherché à valider ce résultat par :

- L'identification du résidu tyrosine kinase impliqué sur l'EGFR,
- L'impact de la phosphorylation sur la signalisation de l'EGFR,
- L'impact de la phosphorylation sur la biologie des cellules cancéreuses.

Valorisation des résultats

Les résultats obtenus au cours de ma thèse font l'objet :

- **D'un article en co-premier auteur dans la revue *Oncotarget* :**

Aubert L*, Guilbert M*, Corbet C, Génot E, Adriaenssens E, Chassat T, Bertucci F, Daubon T, Magné N, Le Bourhis X, Toillon RA. "NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib". *Oncotarget*, 6(12): 9807-9819.

*co-premier auteur

- **D'un article en préparation :**

Guilbert M., Lagadec C., Angrand PO., Volkel P., Duval J., Magné N., Le Bourhis X. and Toillon RA. "Pro-NGF down-regulates EGF signaling in cancer" (soumission prévue dans Cancer Letters)

- **D'un brevet :**

Guilbert M, Aubert L, Corbet C, Toillon RA, Le Bourhis X. (2014) Utilisation conjointe d'un inhibiteur de TrkA et d'un inhibiteur de X pour une utilisation dans le traitement de cancers. N° de dépôt : 1000256348 (INPI)

RESULTATS

Résultats

I. Article 1

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

Introduction

Notre laboratoire a montré que le NGF et son récepteur, TrkA, jouent un rôle majeur dans le développement tumoral mammaire. Cependant, les mécanismes sous-jacents restent mal connus. Ce travail avait donc pour objectif de mieux comprendre la signalisation induite par le NGF dans le cancer du sein, via une approche protéomique fonctionnelle. Cette approche a consisté en une combinaison de deux techniques de purification (immunoprécipitation du récepteur TrkA, et des protéines membranaires biotinylées par streptavidine pull-down) couplées à une analyse en spectrométrie de masse. Cette analyse, effectuée sur des MDA-MB-231 HA-TrkA traitées ou non par du NGF a permis de mettre en évidence un interactome spécifique à l'axe NGF/TrkA.

Résultats et Conclusion

Dans cette article, nous avons démontré que le NGF induit la formation d'un complexe TrkA / CD44. Par ailleurs, la formation de ce complexe est indépendante de la phosphorylation de TrkA. De manière intéressante, nous avons montré que cette coopération menait à l'activation d'une voie signalisation parallèle aux voies Src et PI3-Kinase / Akt induites par l'activation de TrkA. Cette signalisation, dépendante de CD44 mais indépendante de la phosphorylation de TrkA, fait intervenir les protéines p115RhoGEF, RhoA, RhoC et ROCK1. Elle participe, tout comme la voie Src et la voie PI3-K /Akt, à l'invasion induite par le NGF dans les cellules cancéreuses de sein. Enfin, un modèle préclinique de xéno greffe en souris SCID a permis de démontrer que l'effet du Lestaurtinib, inhibiteur pharmacologique de TrkA, est renforcé par l'inhibition de l'expression de CD44. Ainsi, nos résultats démontrent l'importance de CD44 dans l'axe NGF / TrkA et suggèrent un rôle de ce dernier dans les mécanismes de résistance aux thérapies dirigées contre le récepteur TrkA.

Cet Article a été publié dans **Oncotarget** en 2015

RESULTATS

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

Léo Aubert^{1,2,3†}, Matthieu Guilbert^{1,2,3†}, Cyril Corbet^{1,2,3}, Elisabeth Génot⁴, Eric Adriaenssens^{2,5}, Thierry Chassat⁶, François Bertucci⁷, Thomas Daubon⁴, Nicolas Magné^{8,9}, Xuefen Le Bourhis^{1,2,3‡}, and Robert-Alain Toillon^{1,2,3‡*}

¹ INSERM U908, 59 655 Villeneuve d'Ascq, France.

² University Lille 1, 59 655 Villeneuve d'Ascq, France.

³ SIRIC OncoLille, 59 000 Lille, France.

⁴ INSERM U1045, 33 607 Pessac, France.

⁵ CNRS UMR 8161, 59 000 Lille, France.

⁶ PLETHA, Institut Pasteur de Lille, 59000 Lille, France.

⁷ INSERM UMR 891, Institut Paoli-Calmettes, 13 009 Marseille, France.

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

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

† The two authors have equally contributed to this work.

‡ The two authors have equally contributed to this work.

* Contact information: 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

<http://signaling-reprogramming-csc.univ-lille1.fr>

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

RESULTATS

ABSTRACT

There is accumulating evidence that TrkA and its ligand Nerve Growth Factor (NGF) are involved in cancer development. 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. To verify this hypothesis, we combined different approaches including mass spectrometry proteomics, co-immunoprecipitation and proximity ligation assays. We found that NGF treatment induced CD44 binding to TrkA at 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. Moreover, both TrkA tyrosine kinase inhibition with lestaurtinib and CD44 silencing with siRNA inhibited cell growth *in vitro* as well as tumor development in mouse xenograft model; combined treatment significantly enhanced the antineoplastic effects of either treatment alone. Altogether, our results demonstrate that NGF-induced 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

INTRODUCTION

Nerve growth factor (NGF), the first growth factor discovered by Stanley Cohen and Rita Levi Montalcini (Cohen *et al.*, 1954), functions in both normal tissues and cancers of different origins (Adriaenssens *et al.*, 2008). In particular, NGF is produced and released by breast cancer and tumor-associated stromal cells. Its expression is known to drive angiogenesis (Romon *et al.*, 2010) and to be responsible for bone metastasis pain (Bloom *et al.*, 2011). 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 (Marchesi *et al.*, 2010). Mounting evidence suggests that NGF not only affects tumor-associated cells but also dictates cancer cell behaviors (Dolle *et al.*, 2003). Interestingly, in breast cancer cells, TrkA activation is correlated with the high pro-invasive and metastatic potential (Davidson *et al.*, 2004; Lagadec *et al.*, 2009; Demont *et al.*, 2012) that is associated with poor clinical outcomes (Mansell *et al.*, 2009; Alexander *et al.*, 2012). Tyrosine kinase inhibitors derived from staurosporine (K252a, lestaurtinib) are reported to exert antitumor effects in both *in vitro* and preclinical *in vivo* models (Weeraratna *et al.*, 2001). Nevertheless, TrkA kinase inhibitors failed to demonstrate therapeutic efficacy in clinical trials (Marshall *et al.*, 2005). The lack of objective responses to TrkA inhibitors in clinical trials has been linked to insufficient bioavailability of the drugs (Collins *et al.*, 2007) and more recently, to an intrinsic resistance mechanism in cancer cells involving NF-kappa B signaling (Holz *et al.*, 2013). 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 (Orian-Rousseau *et al.*, 2008). 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) (Ponta *et al.*, 1998). CD44 is also known as a marker of cancer stem cells (Lobo *et al.*, 2007) and its expression may cause therapeutic failure in many cancers (Zoller 2011).

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

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 (Demont *et al.*, 2012). 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 bands of increased intensity were detected in NGF-treated cells using IP 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). We then performed biotin labeling and streptavidin pull-down to analyze NGF-induced potential modifications of membrane associated proteins. Several bands of increased intensity upon NGF stimulation were observed (Fig. S1) and processed for mass spectrometry analysis. The following proteins were identified: RhoA (Transforming protein RhoA), RhoC (Rho-related GTP-binding protein C), Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13, Arp2 (Actin-related 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 [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 3-fold increase in the TrkA/CD44 complexes was observed at the plasma membrane. This increase was transient as the PLA signal decreased to basal level after 30 min of NGF treatment. The observed kinetics of CD44/TrkA association might be due to TrkA shuttling as PLA experiments were performed without membrane permeabilization. Indeed, flow cytometry

RESULTATS

analysis showed that membrane TrkA was not significantly altered after 5 min of NGF treatment, but was reduced after 30 min (about 25%), indicating that TrkA may be internalized (Fig. 1D). Membrane CD44 was also increased (27%) after 5 min of NGF treatment but decreased under basal levels after 30 min (-17%) (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 association between TrkA and CD44 at the plasma membrane in cancer cells of various origins.

CD44 diversifies NGF signaling through the RhoA/RhoC/ROCK1 pathway to stimulate cell invasion

CD44 is known to stimulate breast tumor cell invasion through the RhoA pathway (Bourguignon *et al.*, 2003). 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 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 ascertain that CD44 is responsible of RhoGTPase activation, we measured RhoA and RhoC activities after CD44 invalidation by siRNA. As shown in Fig. 2F, CD44 siRNA reduced RhoGTPase activities for both RhoA and RhoC. We also analyzed the invasive capacity of breast cancer cells *in vitro* using a transwell system (Fig. 3A-C). We found that inhibition of CD44 and p115RhoGEF either through siRNA or the ROCK1 specific inhibitor Y-27632 totally abolished NGF-induced invasion. 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 activate the RhoGTPase signaling pathway to enhance cell invasion, independently of TrkA canonical pathways.

RESULTATS

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 inhibit TrkA phosphorylation (Fig. S4). A 2-fold increase of PLA signal was observed at the plasma membrane after 5 min of treatment with NGF, the PLA signal intensity returned to basal levels after 30 min of treatment (Fig. 4A). Similar results were observed in both K252a-treated cells (Fig. 4B) and cells expressing TrkA kinase-dead mutant (Fig. 4C) after 5 min of treatment with NGF. 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. 4B) and kinase-dead mutant (Fig. 4C) cells compared to control (Fig. 4A). This could be due to suboptimal TrkA internalization as it has been reported that phosphorylation of TrkA offers docking sites for cellular endocytosis machinery (Lin *et al.*, 2006). 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, no diminution of TrkA levels was observed in cells treated with K252a compared with DMSO-treated control cells, indicating that inhibition of TrkA phosphorylation slowed TrkA internalization. We then measured p115RhoGEF binding to TrkA and RhoGTPase activation in TrkA kinase dead mutant cells. As shown in Fig. 4E and F, p115RhoGEF binding to TrkA was still enhanced under NGF treatment (3.8 fold increase after 30 min of NGF treatment) (Fig. 4E). Moreover, in TrkA kinase-dead cells, RhoA and RhoC were activated in absence of NGF treatment and NGF further increased these activities. Together, these results indicate that TrkA/CD44 association and the subsequent RhoGTPase activation are not abolished by the inhibition of TrkA phosphorylation. In contrast, the inhibition of TrkA phosphorylation seems to maintain TrkA/CD44 complex.

RESULTATS

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

As the formation of TrkA/CD44 complex 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. 5A 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. 5C and D, lestaurtinib (clinical derivative of K252a) or siCD44 reduced tumor growth when compared to control (scramble siRNA). 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. 5E).

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 (Louderbough *et al.*, 2011). 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 (Zoller 2011). 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 (Matzke *et al.*, 2005). A splice variant of CD44 expressed in the apical ectoderm ridge presents FGFs to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth (Sherman *et al.*,

RESULTATS

1998). 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 (Wood *et al.*, 2010), 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 (Kramer *et al.*, 1997) 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^{NTR}, GPCR (G protein-coupled receptor), and Ret-5. P75^{NTR} is a low affinity receptor and is the first described co-receptor of TrkA. After its binding to p75^{NTR}, NGF has an increased affinity for TrkA (Hempstead *et al.*, 1991). In addition, p75^{NTR} also delays TrkA ubiquitination and sustains its phosphorylation (Makkerh *et al.*, 2005). However, we have previously shown that p75^{NTR} is not involved in NGF-stimulated invasion of breast cancer cells (Demont *et al.*, 2012). 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 (Lee *et al.*, 2002). 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 (Tsui-Pierchala *et al.*, 2002). 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 (Davidson *et al.*, 2004). We showed that in breast cancer cell lines, the biological effects of TrkA are mainly supported by its phosphorylation (Lagadec *et al.*, 2009; Demont *et al.*, 2012). Moreover, it has been found that NTRK1 fusion or rearrangement that constitutively activates TrkA by phosphorylation is oncogenic in lung tissue (Vaishnavi *et al.*, 2013). Altogether, these data indicate the

RESULTATS

importance of phospho-TrkA and its canonical signaling pathways in tumor development and suggest that tyrosine kinase inhibitors would be good candidates for cancer therapy. Nevertheless, despite the powerful anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo* (Festuccia *et al.*, 2007; Thress *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009), 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 rationale for the development of new therapeutics by simultaneously blocking both the kinase dependent and independent effects of TrkA.

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 (Demont *et al.*, 2012). 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 β -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 μ 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

RESULTATS

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 CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂), and then incubated (30 min, 4°C) with a membrane-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 CaCl₂ and 0.2 mM MgCl₂) (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 (Toillon *et al.*, 2007).

Western blot

RESULTATS

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 (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). siCTRL (scramble siRNA) were from Life technologies. siRNA transfection was performed using INTERFERin™ according to the manufacturer's instructions (Polyplus transfection, Ozyme, France).

RESULTATS

RhoGTPases activation assay

Cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed in 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 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 (Varon *et al.*, 2006).

Cell invasion

Invasion assays were performed as previously described (Demont *et al.*, 2012) in Boyden microchambers (BD Biosciences) with 8 µm pore size membranes.

Clonogenic cell growth

Clonogenic assays were performed as previously described (Franken *et al.*, 2006). After siRNA transfection, 2,000 cells were seeded in 35 mm petri dishes. Colonies were stained with crystal violet (Toillon *et al.*, 2007) and colonies of at least 50 cells were counted after one week of culture.

Tumor xenograft growth in immunodeficient mice

HA-TrkA MDA-MB-231 cells (3×10^6) 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 µg/mouse) or scramble siRNA (7.5 µg/mouse) were delivered using *in vivo* jetPEI[®] 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.

RESULTATS

TABLE

Table 1. Identification of putative CD44 signaling partners under NGF stimulation

	Protein name	Uniprot ID	Mass (kDa)	Number of peptides	Mascot score	Refs
TrkA-interacting proteins (HA-TrkA immunoprecipitation)	CD44 antigen	P16070	81	3	125	(Zoller 2011)
	Ezrin	P15311	80	22	318	(Martin <i>et al.</i> , 2003)
	Moesin	P26038	75	9	165	(Arpin <i>et al.</i> , 2011)
	Rho guanine nucleotide exchange factor 1	Q92888	115	11	104	(Bourguignon <i>et al.</i> , 2003; Guilluy <i>et al.</i> , 2011)
	Focal adhesion kinase 1	Q05397	125	2	40	(Arpaia <i>et al.</i> , 2012)
	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	O15144	34	8	122	(Korobova <i>et al.</i> , 2008; Yokotsuka <i>et al.</i> , 2011)
	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	P63244	35	20	578	(Cao <i>et al.</i> , 2011)
	Alpha-actinin-1	P12814	103	20	245	(Stevenson <i>et al.</i> , 2012)
	LIM domain and actin-binding protein 1	Q9UHB6	85	3	64	(Stevenson <i>et al.</i> , 2012)
Plasma membrane-associated proteins (streptavidin pull-down)	Transforming protein RhoA	P61586	21	6	204	(Bourguignon 2008; Bourguignon <i>et al.</i> , 2010)
	Rho-related GTP-binding protein RhoC	P08134	22	6	219	(Bourguignon 2008; Bourguignon <i>et al.</i> , 2010)
	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	Q14344	44	10	133	(Kozasa <i>et al.</i> , 1998)
	Actin-related protein 2	P61160	44	16	326	(Korobova <i>et al.</i> , 2008)
	Basigin	P35613	42	8	182	(Li <i>et al.</i> , 2007)

RESULTATS

	Ras-related protein R-Ras2	P62070	23	3	62	(Keely <i>et al.</i> , 1999)
	Actin, cytoplasmic 2	P63261	42	21	569	(Stevenson <i>et al.</i> , 2012)

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.

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 and Hamburger V. 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. 1954; 40:1014-1018.
2. Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, Mougel A, Page A, Romon R, Nurcombe V, Le Bourhis X and Hondermarck H. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. Cancer research. 2008; 68:346-351.
3. Romon R, Adriaenssens E, Lagadec C, Germain E, Hondermarck H and Le Bourhis X. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. Molecular cancer. 2010; 9:157.
4. Bloom AP, Jimenez-Andrade JM, Taylor RN, Castaneda-Corral G, Kaczmarska MJ, Freeman KT, Coughlin KA, Ghilardi JR, Kuskowski MA and Mantyh PW. Breast cancer-induced bone remodeling, skeletal pain, and sprouting of sensory nerve fibers. The journal of pain : official journal of the American Pain Society. 2011; 12:698-711.
5. Marchesi F, Piemonti L, Mantovani A and Allavena P. Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. Cytokine & growth factor reviews. 2010; 21:77-82.
6. Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V and Hondermarck H. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. Oncogene. 2003; 22:5592-5601.
7. Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Ann Florenes V, Nielsen S and 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 research and treatment. 2004; 83:119-128.
8. Demont Y, Corbet C, Page A, Ataman-Onal Y, Choquet-Kastylevsky G, Fliniaux I, Le Bourhis X, Toillon RA, Bradshaw RA and Hondermarck H. Pro-nerve growth factor induces

RESULTATS

autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287:1923-1931.

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

10. Mansell J, Monypenny IJ, Skene AI, Abram P, Carpenter R, Gattuso JM, Wilson CR, Angerson WJ and Doughty JC. Patterns and predictors of early recurrence in postmenopausal women with estrogen receptor-positive early breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2009; 117:91-98.

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

12. Weeraratna AT, Dalrymple SL, Lamb JC, Denmeade SR, Miknyoczki S, Dionne CA and Isaacs JT. 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*. 2001; 7:2237-2245.

13. Marshall JL, Kindler H, Deeken J, Bhargava P, Vogelzang NJ, Rizvi N, Luhtala T, Boylan S, Dordal M, Robertson P, Hawkins MJ and Ratain MJ. Phase I trial of orally administered CEP-701, a novel neurotrophin receptor-linked tyrosine kinase inhibitor. *Investigational new drugs*. 2005; 23:31-37.

14. Collins C, Carducci MA, Eisenberger MA, Isaacs JT, Partin AW, Pili R, Sinibaldi VJ, Walczak JS and Denmeade SR. Preclinical and clinical studies with the multi-kinase inhibitor CEP-701 as treatment for prostate cancer demonstrate the inadequacy of PSA response as a primary endpoint. *Cancer biology & therapy*. 2007; 6:1360-1367.

15. Holz MS, Janning A, Renne C, Gattenlohner S, Spieker T and Brauninger A. Induction of endoplasmic reticulum stress by sorafenib and activation of NF-kappaB by

RESULTATS

lestaurtinib as a novel resistance mechanism in Hodgkin lymphoma cell lines. *Molecular cancer therapeutics*. 2013; 12:173-183.

16. Orian-Rousseau V and Ponta H. Adhesion proteins meet receptors: a common theme? *Advances in cancer research*. 2008; 101:63-92.

17. Ponta H, Wainwright D and Herrlich P. The CD44 protein family. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1998; 30:299-305.

18. Lobo NA, Shimono Y, Qian D and Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annual review of cell and developmental biology*. 2007; 23:675-699.

19. Zoller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature reviews Cancer*. 2011; 11:254-267.

20. Bourguignon LY, Singleton PA, Zhu H and 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. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278:29420-29434.

21. Lin DC, Quevedo C, Brewer NE, Bell A, Testa JR, Grimes ML, Miller FD and Kaplan DR. APPL1 associates with TrkA and GIPC1 and is required for nerve growth factor-mediated signal transduction. *Molecular and cellular biology*. 2006; 26:8928-8941.

22. Louderbough JM and Schroeder JA. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Molecular cancer research : MCR*. 2011; 9:1573-1586.

23. Matzke A, Herrlich P, Ponta H and Orian-Rousseau V. A five-amino-acid peptide blocks Met- and Ron-dependent cell migration. *Cancer research*. 2005; 65:6105-6110.

RESULTATS

24. Sherman L, Wainwright D, Ponta H and 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 & development*. 1998; 12:1058-1071.
25. Wood MD, Hunter D, Mackinnon SE and Sakiyama-Elbert SE. Heparin-binding-affinity-based delivery systems releasing nerve growth factor enhance sciatic nerve regeneration. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2010; 21:771-787.
26. Kramer K, Cheung NK, Gerald WL, LaQuaglia M, Kushner BH, LeClerc JM, LeSauter L and Saragovi HU. Correlation of MYCN amplification, Trk-A and CD44 expression with clinical stage in 250 patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1997; 33:2098-2100.
27. Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF and Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*. 1991; 350:678-683.
28. Makkerh JP, Ceni C, Auld DS, Vaillancourt F, Dorval G and Barker PA. p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO reports*. 2005; 6:936-941.
29. Lee FS, Rajagopal R and Chao MV. Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2002; 13:11-17.
30. Tsui-Pierchala BA, Milbrandt J and 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; 33:261-273.
31. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, Mahale S, Davies KD, Aisner DL, Pilling AB, Berge EM, Kim J, Sasaki H, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nature medicine*. 2013; 19:1469-1472.

RESULTATS

32. Wang T, Yu D and Lamb ML. Trk kinase inhibitors as new treatments for cancer and pain. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2009; 19:305-319.
33. Festuccia C, Muzi P, Gravina GL, Millimaggi D, Specca S, Dolo V, Ricevuto E, Vicentini C and Bologna M. 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*. 2007; 30:193-200.
34. Thress K, Macintyre T, Wang H, Whitston D, Liu ZY, Hoffmann E, Wang T, Brown JL, Webster K, Omer C, Zage PE, Zeng L and Zweidler-McKay PA. Identification and preclinical characterization of AZ-23, a novel, selective, and orally bioavailable inhibitor of the Trk kinase pathway. *Molecular cancer therapeutics*. 2009; 8:1818-1827.
35. Toillon RA, Lagadec C, Page A, Chopin V, Sautiere PE, Ricort JM, Lemoine J, Zhang M, Hondermarck H and Le Bourhis X. 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*. 2007; 6:1239-1247.
36. Varon C, Basoni C, Reuzeau E, Moreau V, Kramer IJ and Genot E. TGFbeta1-induced aortic endothelial morphogenesis requires signaling by small GTPases Rac1 and RhoA. *Experimental cell research*. 2006; 312:3604-3619.
37. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J and van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*. 2006; 1:2315-2319.
38. Martin TA, Harrison G, Mansel RE and Jiang WG. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2003; 46:165-186.
39. Arpin M, Chirivino D, Naba A and Zwaenepoel I. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell adhesion & migration*. 2011; 5:199-206.
40. Guilluy C, Garcia-Mata R and Burridge K. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends in cell biology*. 2011; 21:718-726.

RESULTATS

41. Arpaia E, Blaser H, Quintela-Fandino M, Duncan G, Leong HS, Ablack A, Nambiar SC, Lind EF, Silvester J, Fleming CK, Rufini A, Tusche MW, Brustle 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; 31:884-896.
42. Yokotsuka M, Iwaya K, Saito T, Pandiella A, Tsuboi R, Kohno N, Matsubara O and Mukai K. Overexpression of HER2 signaling to WAVE2-Arp2/3 complex activates MMP-independent migration in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2011; 126:311-318.
43. Korobova F and Svitkina T. Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. *Molecular biology of the cell*. 2008; 19:1561-1574.
44. Cao XX, Xu JD, Xu JW, Liu XL, Cheng YY, Li QQ, Xu ZD and Liu XP. RACK1 promotes breast carcinoma migration/metastasis via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. *Breast cancer research and treatment*. 2011; 126:555-563.
45. Stevenson RP, Veltman D and Machesky LM. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance. *Journal of cell science*. 2012; 125:1073-1079.
46. Bourguignon LY. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Seminars in cancer biology*. 2008; 18:251-259.47. Bourguignon LY, Wong G, Earle C, Krueger K and 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. *The Journal of biological chemistry*. 2010; 285:36721-36735.
48. Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G and Sternweis PC. p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science*. 1998; 280:2109-2111.

RESULTATS

49. Li QQ, Wang WJ, Xu JD, Cao XX, Chen Q, Yang JM and Xu ZD. Up-regulation of CD147 and matrix metalloproteinase-2, -9 induced by P-glycoprotein substrates in multidrug resistant breast cancer cells. *Cancer science*. 2007; 98:1767-1774.

50. Keely PJ, Rusyn EV, Cox AD and Parise LV. R-Ras signals through specific integrin alpha cytoplasmic domains to promote migration and invasion of breast epithelial cells. *The Journal of cell biology*. 1999; 145:1077-1088.

RESULTATS

FIGURE AND TABLE LEGENDS

Figure 1. NGF induces binding 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. CD44 binding to HA-TrkA was normalized and indicated as Fold Change. CD44 binding to HA-TrkA at 0 min was considered as 1. (B) Reverse IP with anti-CD44 antibody followed by immunoblotting with anti-HA antibody. HA-TrkA binding to CD44 was normalized and indicated as Fold Change. HA-TrkA binding to CD44 at 0 min was considered as 1. (C) TrkA/CD44 association was visualized by a PLA; interactions between TrkA and CD44 are shown as red spots. Density of red spots was quantified by Image J software. TrkA/CD44 PLA density without stimulation was considered as 1. (D and E) Flow cytometry analyses of membrane levels of TrkA (D) and CD44 (E). Fold Changes were determined using the median value of each histogram.

Figure 2. NGF induces association of TrkA with CD44/p115RhoGEF/RhoA/RhoC/ROCK1 and RhoGTPase activation. (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) CD44 invalidation inhibits RhoA and RhoC activities. HA-TrkA MDA-MB-231 cells were transfected with siCTRL (scramble siRNA) or siCD44 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.

Figure 3. CD44, p115RhoGEF and ROCK1 are involved in NGF-stimulated cell invasion. HA-TrkA MDA-MB-231 cells were transfected with si CTRL (scramble siRNA), siCD44 or

RESULTATS

siRNA efficiency was assessed by immunoblot with specific antibodies against CD44 or p115RhoGEF. β -actin was used as a loading control.

Figure 4. TrkA binds to 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. Density of red spots was quantified by Image J software. TrkA/CD44 PLA density without stimulation in DMSO was considered as 1. (D) K252a impedes TrkA internalization as monitored by flow cytometry. Results are representative of three independent experiments. (E) HA-TrkA (wild-type) and HA-TrkA Kinase-dead expressing cells were treated with NGF (5 and 30 min). IPs were done with anti-HA and immunoblotting was used to detect the presence of p115RhoGEF. P115RhoGEF binding to HA-TrkA was normalized and indicated as Fold Change. P115RhoGEF binding to HA-TrkA at 0 min was considered as 1. (F) 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.

Figure 5. Effects of combined targeting of TrkA and CD44 on tumor cell growth. (A and B) 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 in vivo Jet PEI + scramble siRNA (7.5 μ g/mouse, Control), lestaurtinib (10 mg/kg), Jet PEI + siCD44 (7.5 μ g/mouse) or lestaurtinib and Jet PEI + siCD44 (7.5 μ g/mouse). (C) Tumor volumes

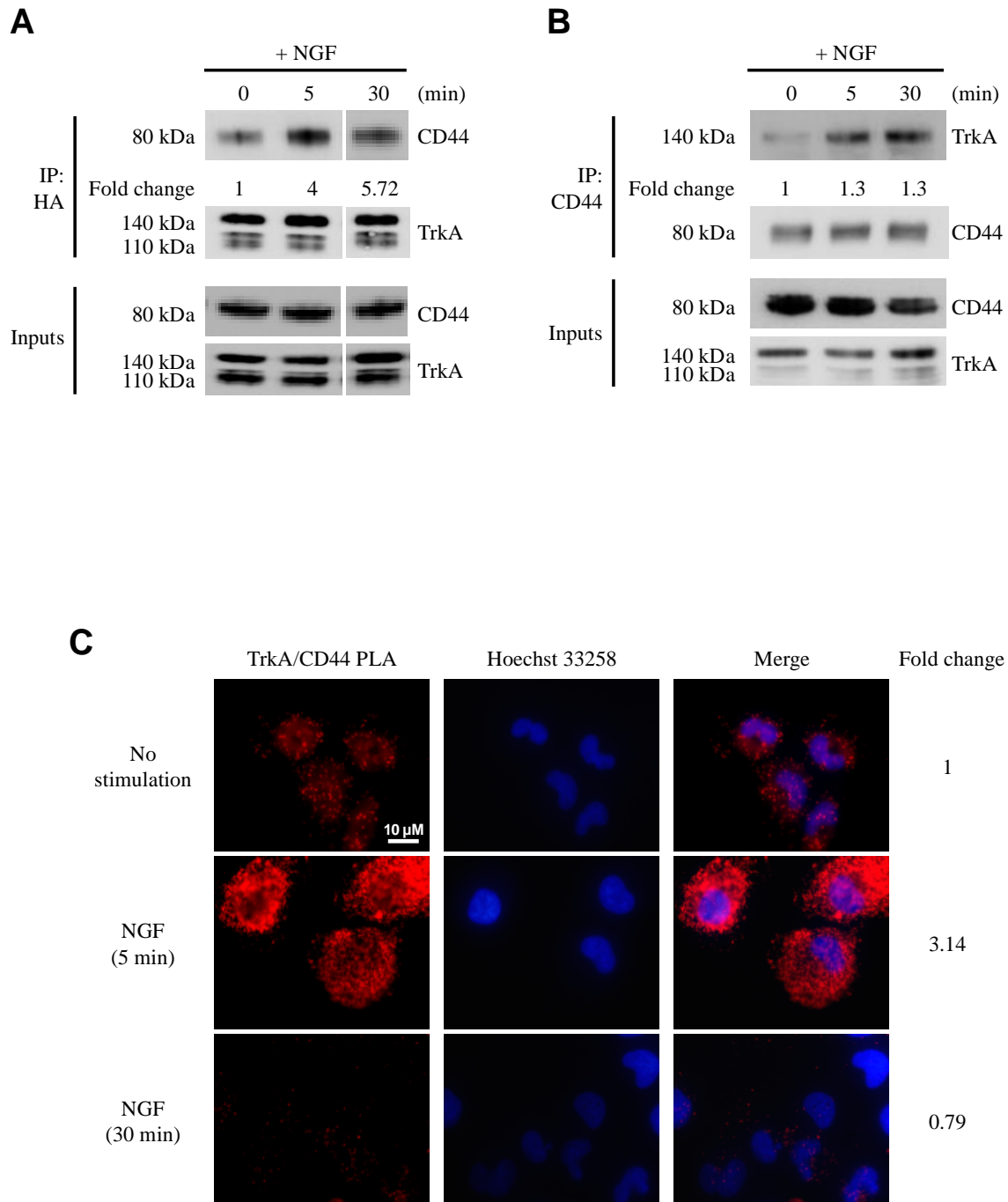
RESULTATS

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 6. 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.

Table 1. Mass spectrometry identification of putative interacting partners of TrkA (HA-TrkA IP) and plasma membrane-associated proteins (streptavidin pull-down) under NGF stimulation was performed as described in materials and methods.

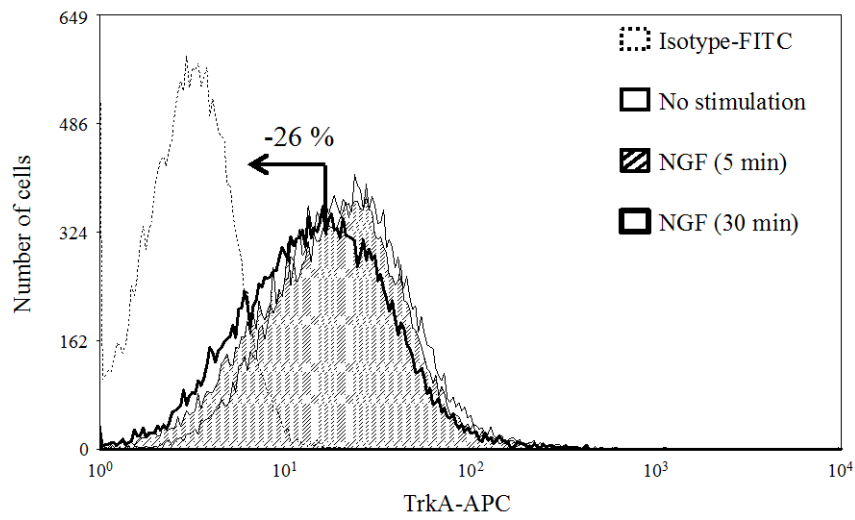
RESULTATS



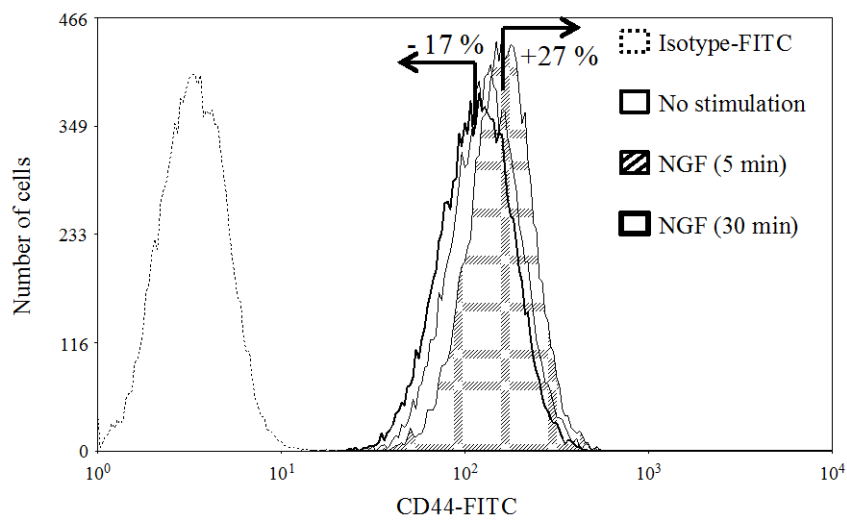
Aubert *et al*, Figure 1

RESULTATS

D

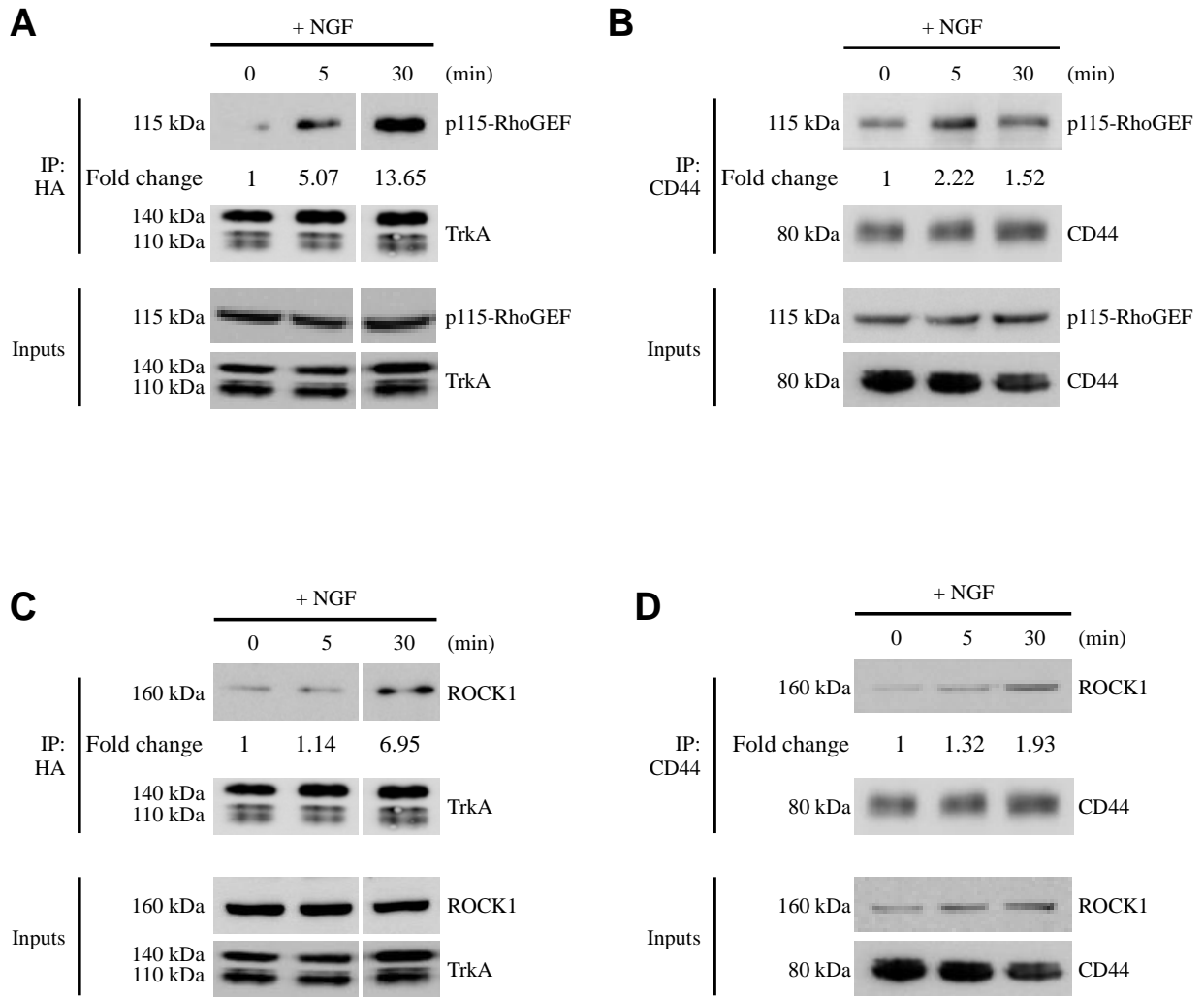


E



Aubert *et al*, Figure 1

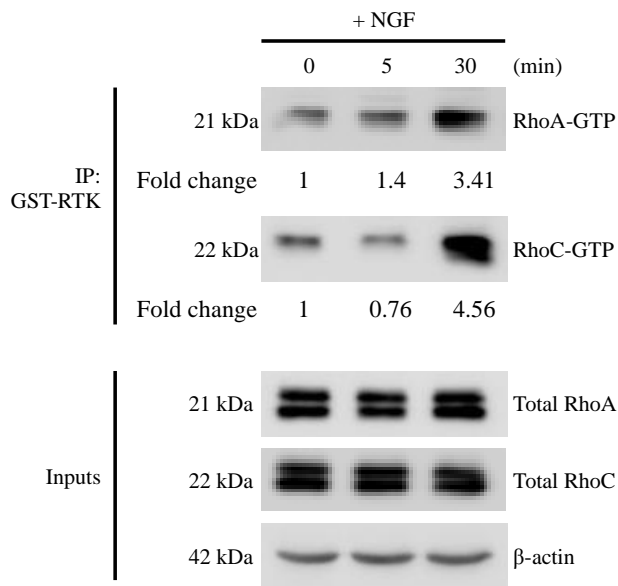
RESULTATS



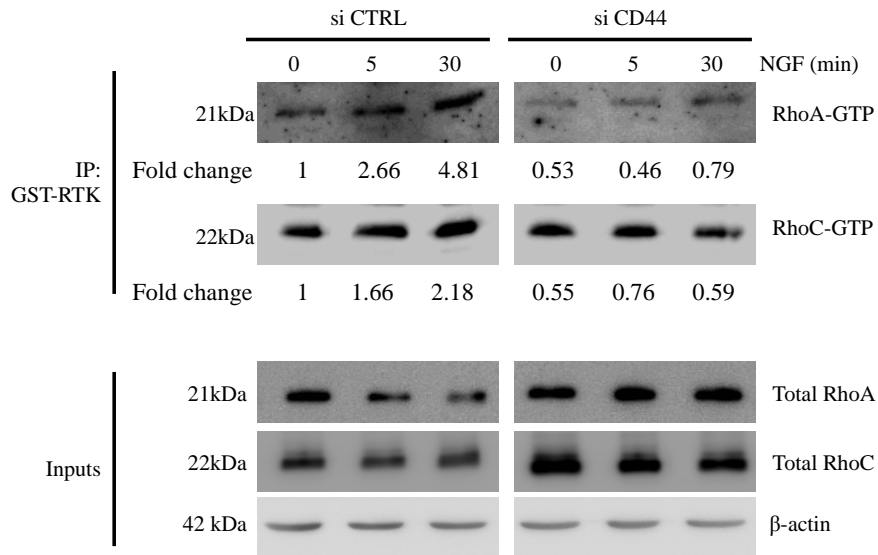
Aubert *et al*, Figure 2

RESULTATS

E



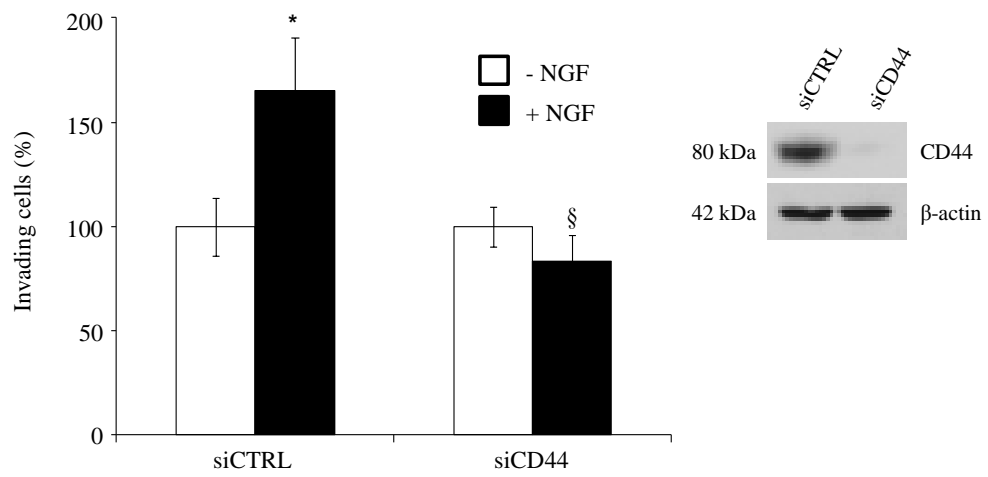
F



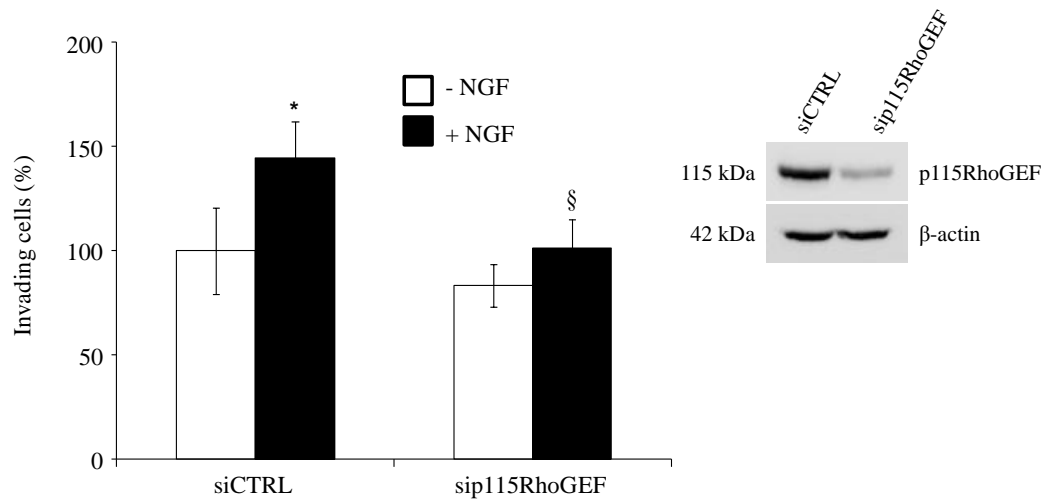
Aubert *et al*, Figure 2

RESULTATS

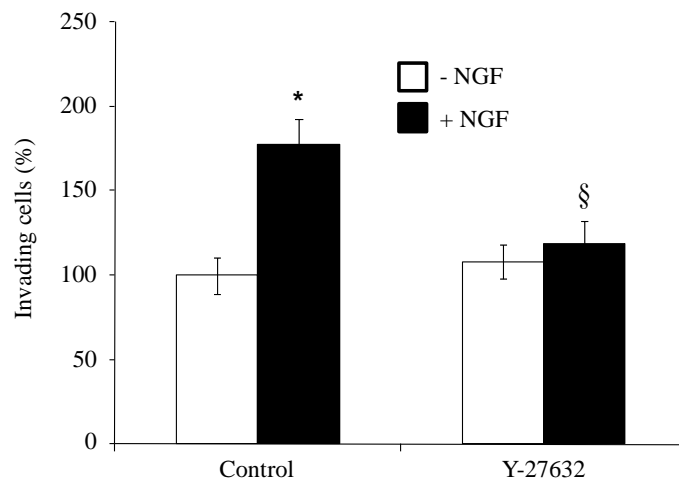
A



B

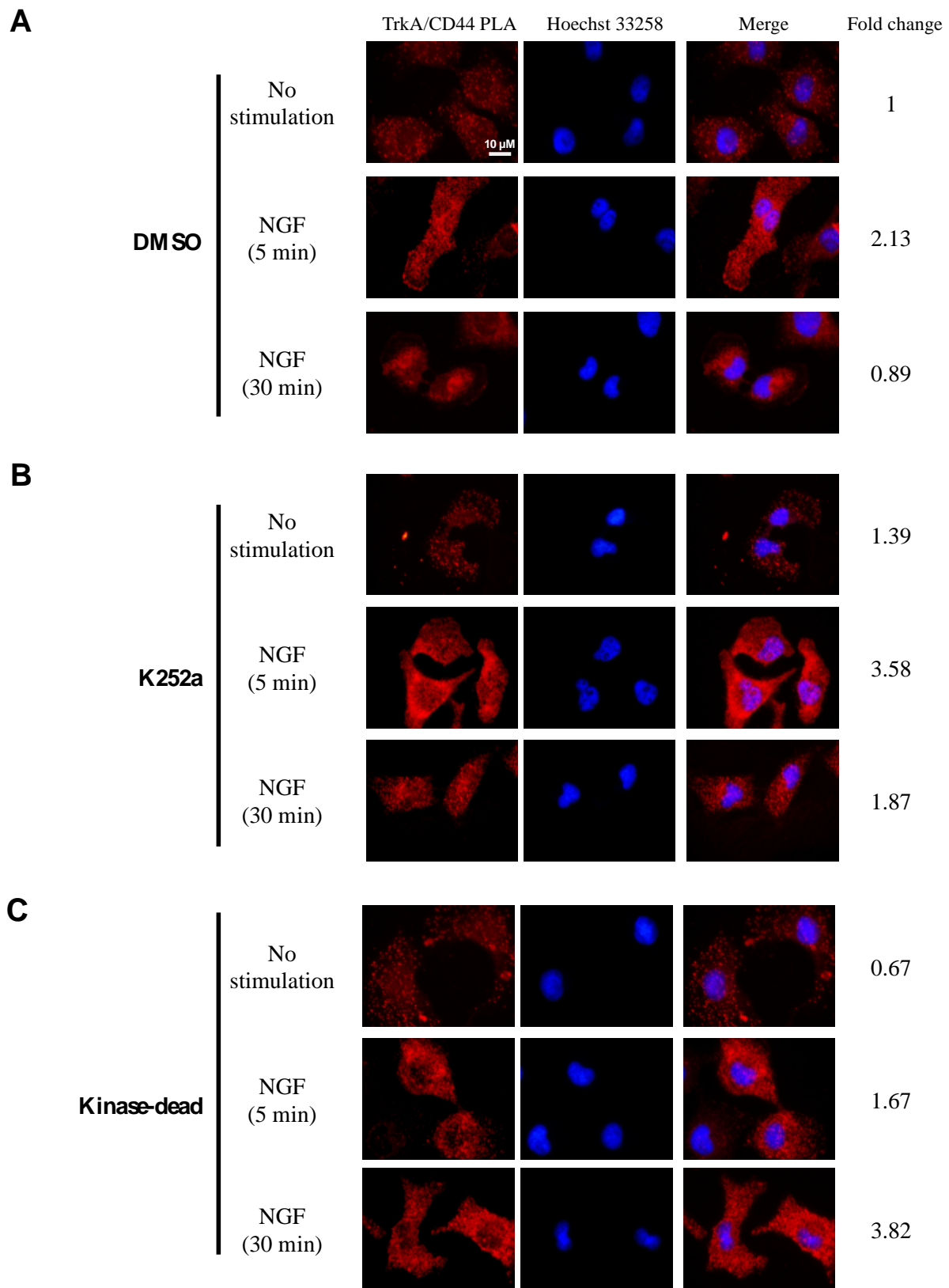


C



Aubert *et al*, Figure 3

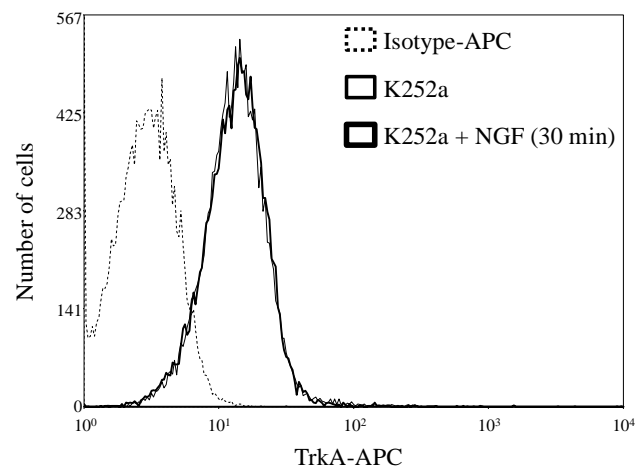
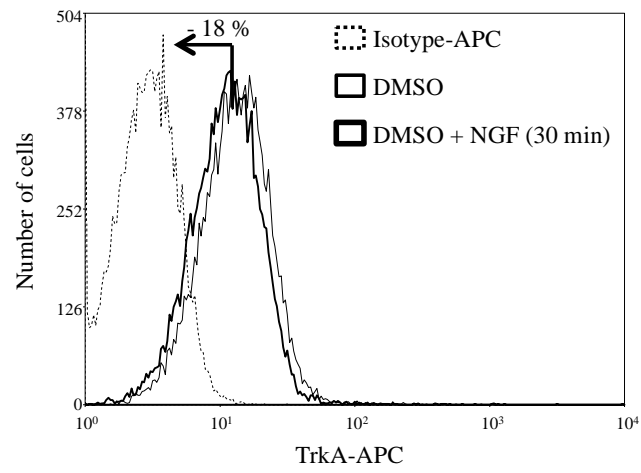
RESULTATS



Aubert *et al*, Figure 4

RESULTATS

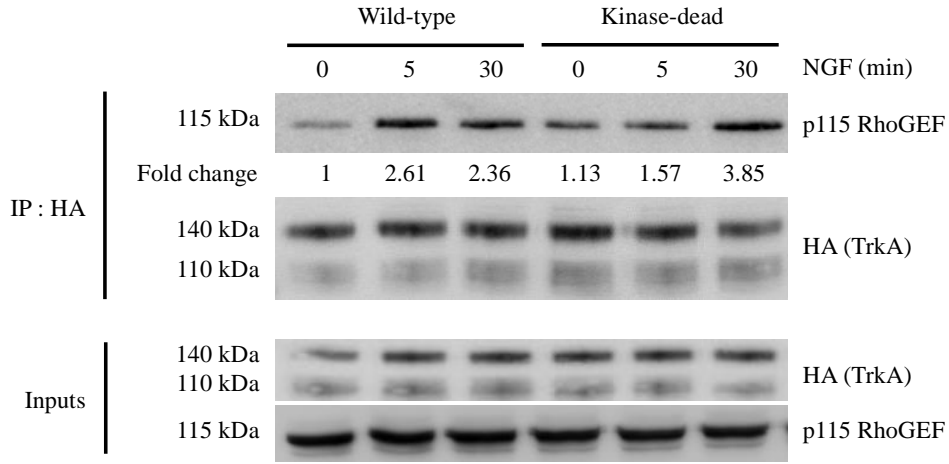
D



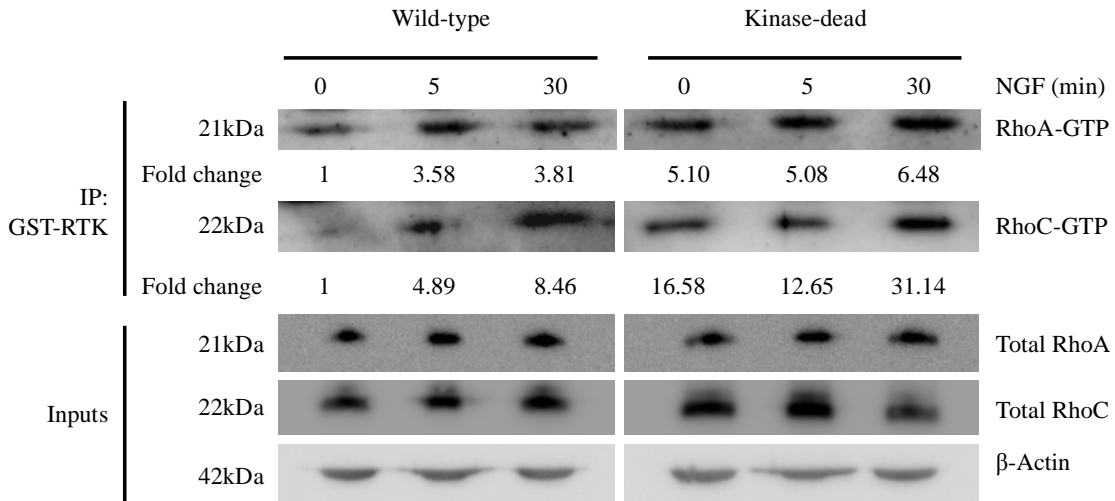
Aubert *et al*, Figure 4

RESULTATS

E

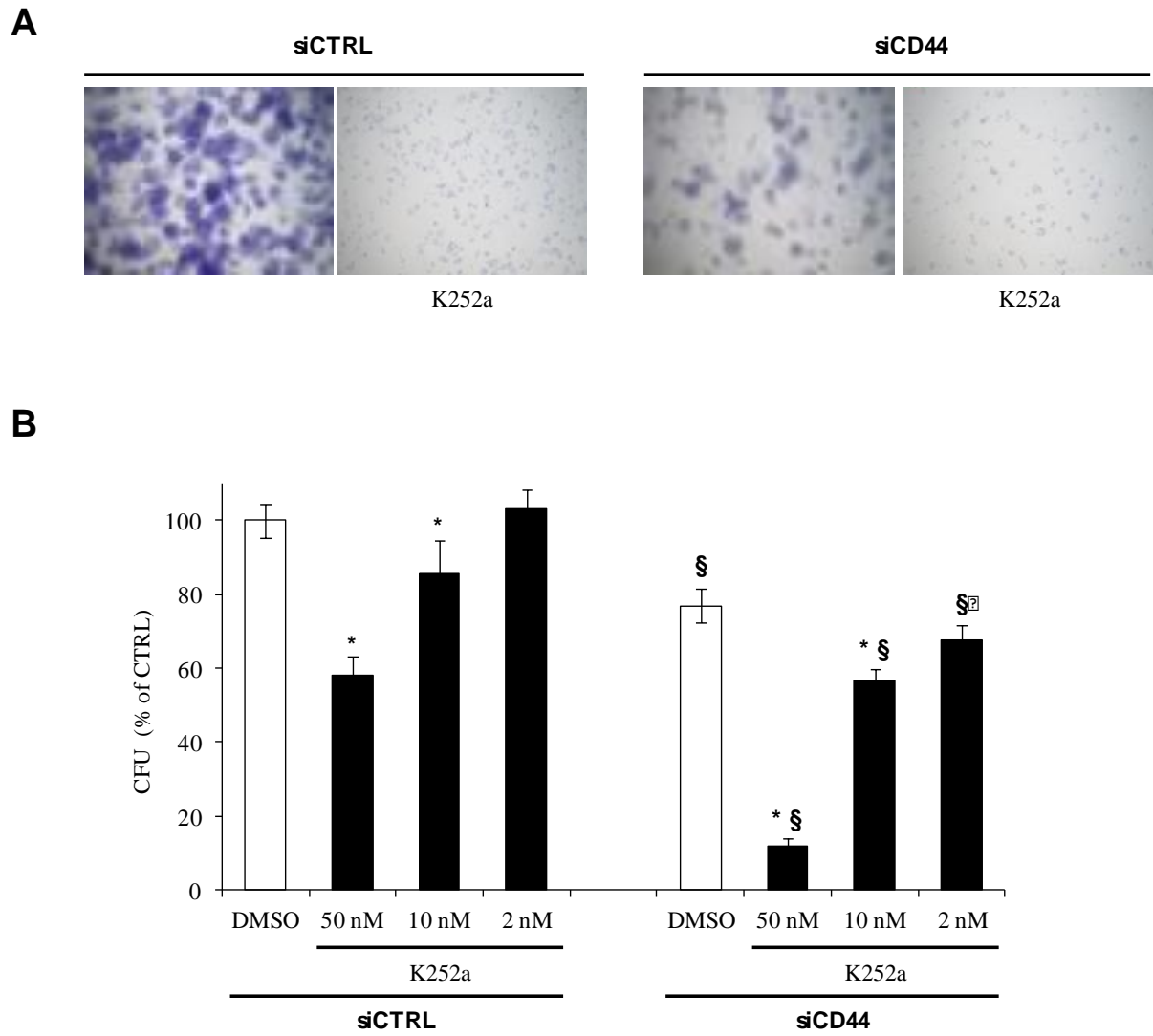


F



Aubert *et al*, Figure 4

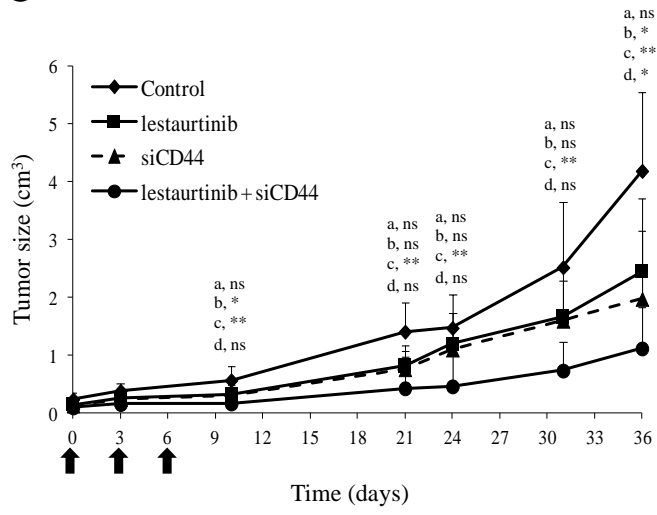
RESULTATS



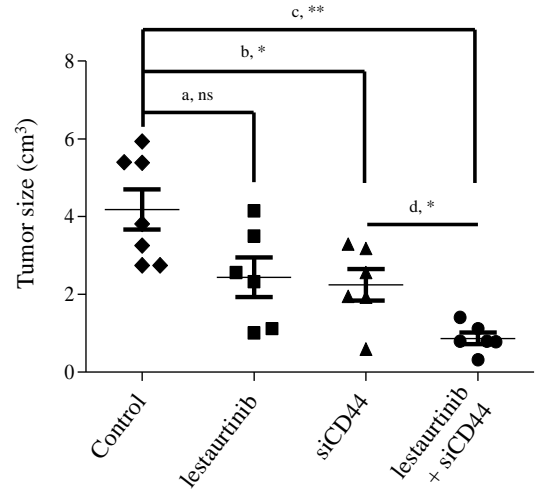
Aubert *et al*, Figure 5

RESULTATS

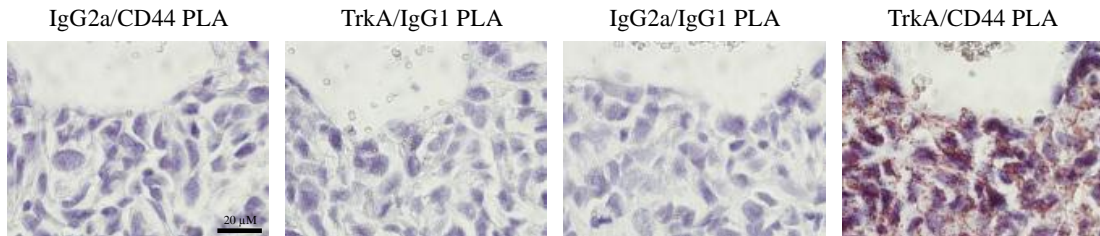
C



D

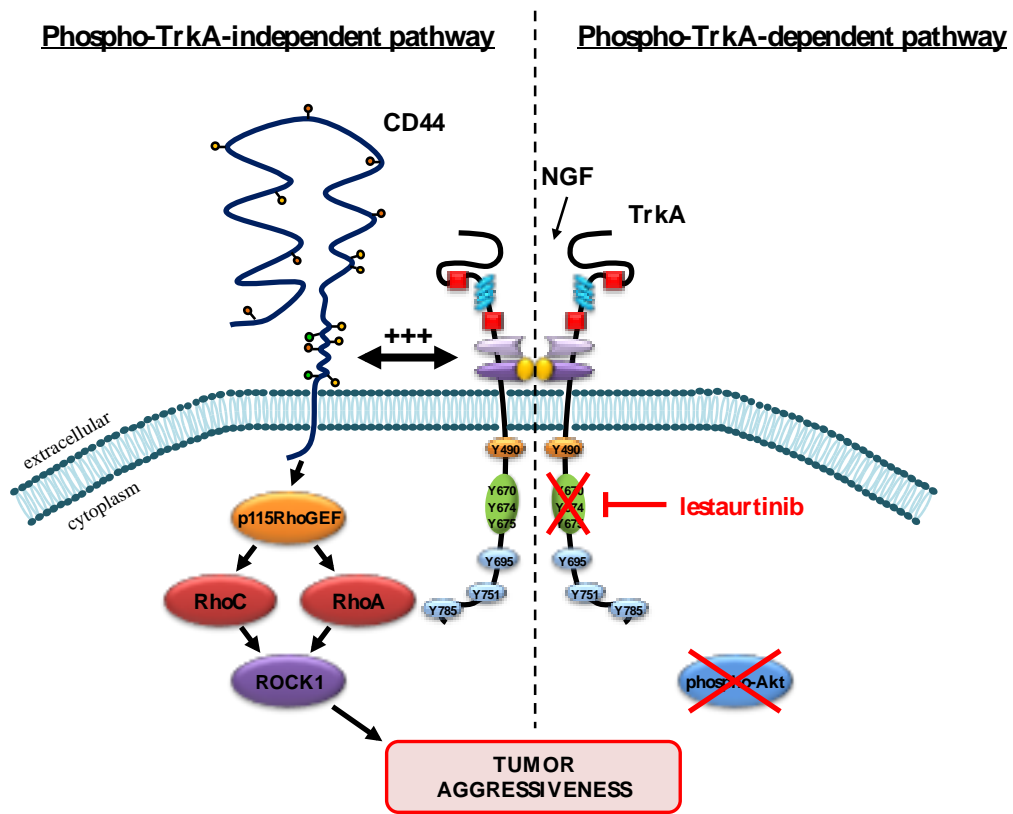


E



Aubert *et al*, Figure 5

RESULTATS



Aubert *et al*, Figure 6

RESULTATS

SUPPLEMENTAL METHODS

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% CO₂-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 ≥ 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

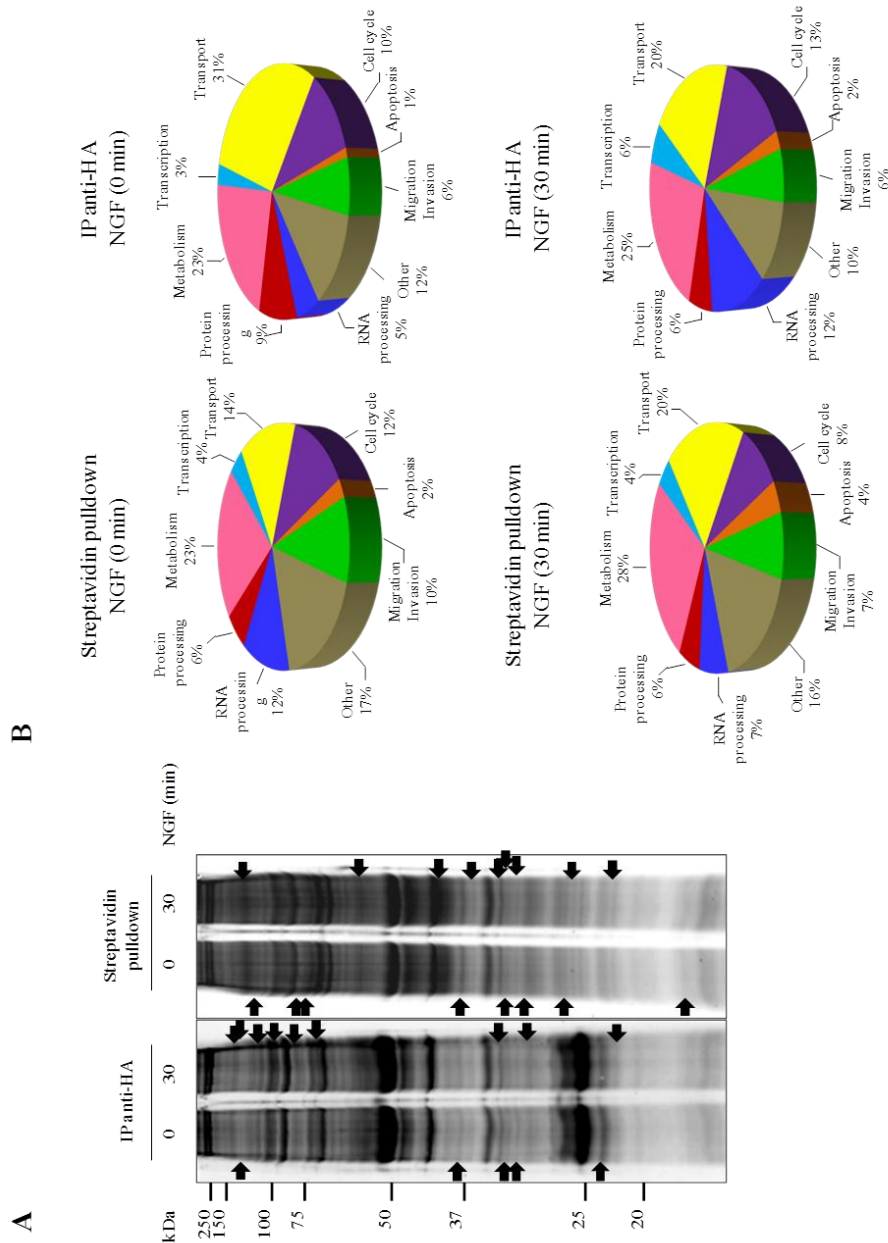
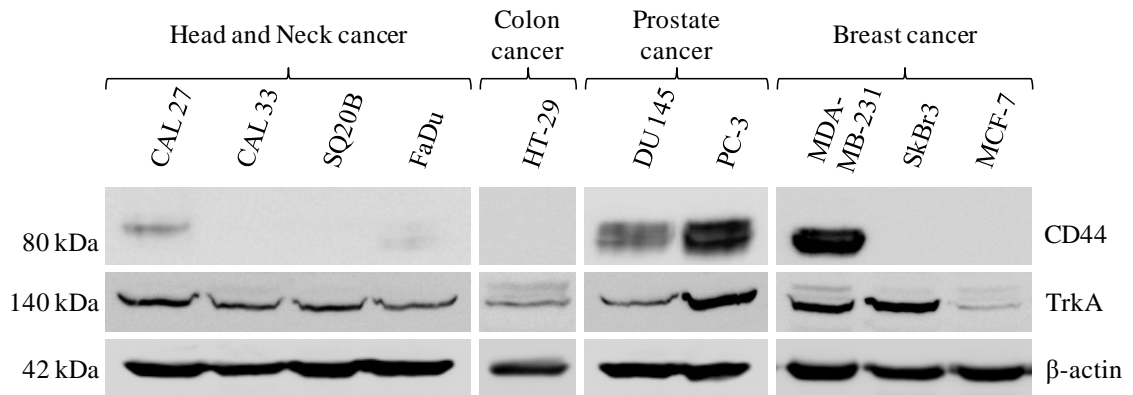


Figure S1. Proteomic analysis of NGF/TrkA signaling. (A) Location of excised bands on SDS-PAGE gel (Arrows). (A) Location of excised bands on SDS-PAGE gel (Arrows). HA-TrkA MDA-MB-231 cells were biotinylated and treated or not with NGF for 30 min. HA-TrkA immunoprecipitation or streptavidin pull-down was then performed on cell lysates (15 mg per condition) and the eluted proteins were separated by SDS-PAGE. Differential band cutting (indicated by arrows) 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.

RESULTATS

A



B

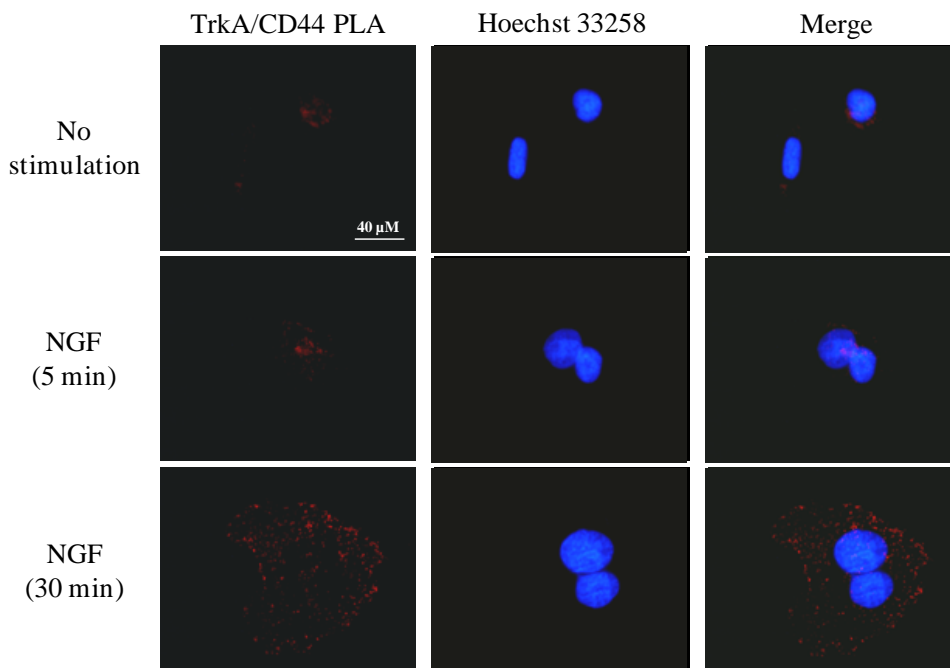


Figure S2. Involvement of TrkA/CD44 association in other cancers. (A) Expression of TrkA and CD44 receptors in several cancer cell lines. Whole cell lysates from cancer cells were immunoblotted using CD44 and TrkA antibodies. Equal loading was checked with β -actin antibody. (B) NGF induced direct interaction 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.

RESULTATS

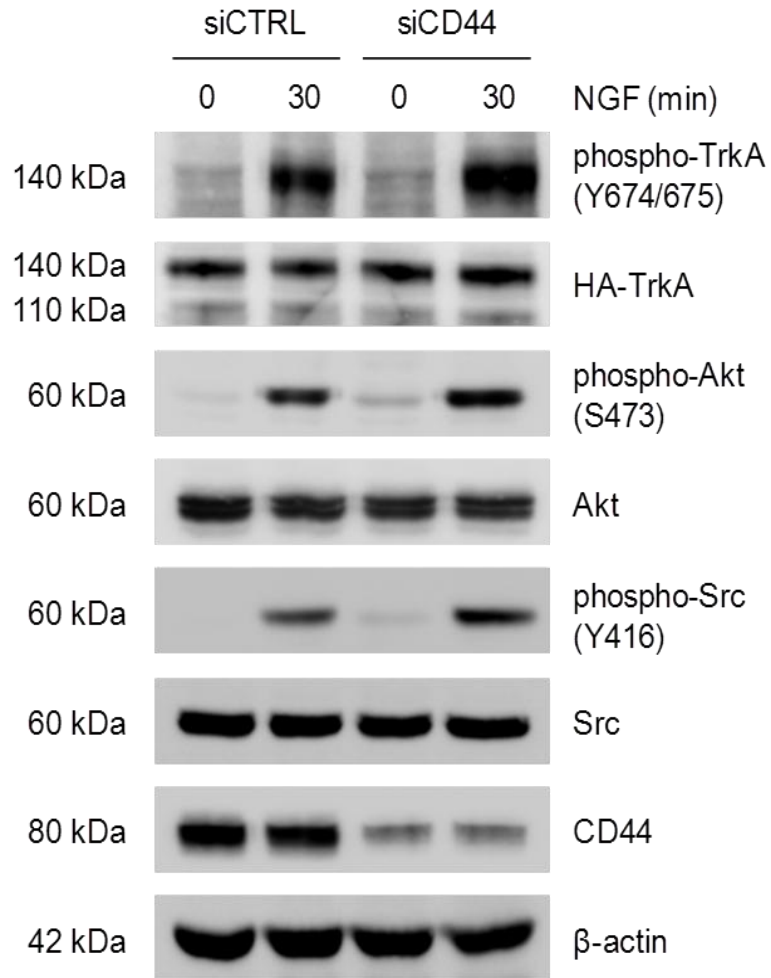


Figure S3. Inhibition of CD44 expression does not affect NGF-induced TrkA activity and canonical TrkA pathways. MDA-MB-231 cells overexpressing HA-TrkA were transfected with siRNA directed against CD44 (siCD44), or control siRNA (siCTRL). Cells were then stimulated with NGF (5 or 30 min). Phosphorylations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

RESULTATS

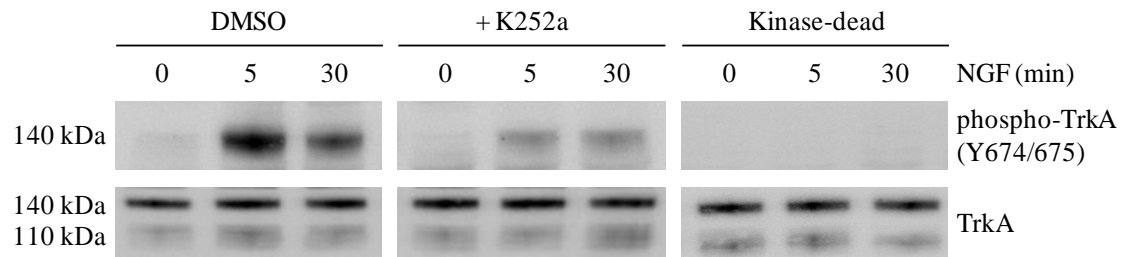


Figure S4. Inhibition of TrkA phosphorylation. HA-TrkA MDA-MB-231 cells incubated with DMSO or with K252a, and HA-TrkA kinase-dead MDA-MB-231 cells were treated with NGF (5 or 30 min). TrkA phosphorylation was assessed by immunoblotting with phospho-specific antibody. Equal loading was verified with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

RESULTATS

II. Article 2

Pro-NGF down-regulates EGF signaling in cancer

Introduction

Notre laboratoire a mis en évidence un rôle du proNGF dans le développement tumoral, indépendamment de la signalisation induite par le NGF. En effet, le proNGF induit la formation d'un complexe original, impliquant les récepteurs sortiline et TrkA. Ce complexe favorise alors, *via* les voies Src et PI3-Kinase / Akt, l'invasion des cellules cancéreuses. L'objectif de ce travail a consisté en l'étude des interactions entre les récepteurs à activité tyrosine kinase induites par le proNGF. Pour cela, j'ai réalisé un « kinase array » qui m'a permis de mettre en évidence une phosphorylation du récepteur à l'EGF.

Résultats et Conclusion

Ce travail a permis de mettre en évidence qu'une stimulation des cellules cancéreuses par le proNGF induit la phosphorylation de l'EGFR sur le résidu Tyr-1068. Cette phosphorylation est retrouvée à la fois dans des lignées cancéreuses de sein, mais également dans des lignées de cancers des voies aéro-digestives supérieures. Des analyses par cytométrie en flux ont montré que la phosphorylation de la tyrosine 1068, suite à une stimulation par le proNGF, conduit à diminution de l'expression de l'EGFR à la membrane. Cet effet du proNGF requiert, par ailleurs, la présence de la sortiline mais pas de p75^{NTR}. De manière intéressante, des tests d'invasion en chambre de Boyden ont montré que le proNGF inhiberait l'effet pro-invasif de l'EGF et que cette inhibition passerait par la phosphorylation de la tyrosine 1068. De plus, il semblerait que le proNGF inhibe également l'effet de l'EGF sur la prolifération des cellules cancéreuses. L'ensemble de ces résultats est tout à fait encourageant et permet de questionner le manque d'effet clinique des inhibiteurs dans les tumeurs mammaires et ORL.

Ces travaux feront l'objet d'une soumission dans le journal **Cancer Letters**.

Pro-NGF down-regulates EGF signaling in cancer

Guilbert Matthieu^{1,2,3}, Lagadec Chann^{1,2,3}, Angrand Pierre-Olivier^{1,2,3}, Volkel Pamela^{1,2,6},
Duval Jeremy^{1,2,3}, Magné Nicolas^{4,5}, Le Bourhis Xuefen^{1,2,3} and Toillon Robert-Alain^{1,2,3,§}

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

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

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

⁴ CNRS, délégation du Nord, Lille, France.

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

⁶ Institut de cancérologie Lucien Neuwirth, 42270 Saint Priest en Jarez, France,

§ Contact information: 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

<http://signaling-reprogramming-csc.univ-lille1.fr>

Running title: proNGF downregulates EGFR.

Keywords: EGFR, proNGF, sortilin, cancer

RESULTATS

ABSTRACT

Neurotrophins and their precursors exhibit increasing complexity in their biological responses by the diversity of receptor binding. In breast cancer, we have previously showed that proNGF induced cell growth and invasion through sortilin binding. Here, we demonstrate in breast cancer and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) that proNGF inhibits EGF response through phosphorylation on EGFR tyrosine 1068. Indeed, we determine that proNGF-dependent Y1068 phosphorylation decreases EGFR expression at the cell membrane level by flow cytometry analysis. Using Proximity Ligation Assay (PLA), we also showed that sortilin forms a complex with EGFR. This complex is detected at the plasma membrane and decreases under proNGF treatment. Analyzes of biological consequences of proNGF treatment on EGF response demonstrated that proNGF impairs EGF induced invasion and proliferation in cancer cells. These results may explain the lack of EGFR inhibitor efficiency in breast and HNSCC cancer by downregulation of EGFR.

RESULTATS

INTRODUCTION

Growth factors and their receptors have been implicated in various physiological and pathological processes. Indeed, cancer cells divert growth factor signaling to increase proliferation, angiogenesis, and metastases. Epidermal Growth Factor (EGF) is a prototypical growth factor implicated in tumor development. It acts through tyrosine kinase receptor named EGF-receptor (EGFR) (Wells 1999). EGFR is showed to be implicated in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC), lung or colon carcinoma development (Ang *et al.*, 2002; Hirsch *et al.*, 2003; Spano *et al.*, 2005). So targeted therapies have been developed and are used to block EGFR activation within the cells (Scaltriti *et al.*, 2006). Nevertheless these targeted therapies are limited and generally relapses occur (Kobayashi *et al.*, 2005; Diaz *et al.*, 2012). Numerous explanations of these therapies failures have been suggested such as the influence of microenvironment, tumor heterogeneity or cell plasticity (Gillies *et al.*, 2012). Altogether, the studies show that cancer cells integrate signal, which lead to their cell fate. This integration could be done by transactivation processes and elucidated EGFR regulation (Wheeler *et al.*, 2008). Moreover EGFR receptors could physically form heterodimers with the other EGFR family members but also interact with other receptors (Zwick *et al.*, 1999; Olayioye *et al.*, 2000). Also, Festuccia *et al* have shown that Her2 interacts with TrkA in prostate cancer cell (Festuccia *et al.*, 2009). TrkA is the high affinity receptor of the Nerve Growth Factor (NGF). NGF and its receptors are also important determinant of cancer development (Dolle *et al.*, 2004; Demont *et al.*, 2012). Indeed NGF acts through a tyrosine kinase receptor TrkA, p75^{NTR} and sortilin. These receptors are known to differently form complex depending of the ligand and their relative expressions (Clewes *et al.*, 2008; Masoudi *et al.*, 2009). So we recently demonstrated that invasive effect of NGF in cancer cells is dependent of TrkA/CD44 complex and subsequent RhoGTPase activation (Aubert *et al.*, 2015). We also showed that proNGF (precursor of NGF) may act in cancer through a sortilin/TrkA complex (Demont *et al.*, 2012). Nevertheless, the proNGF signaling remains unclear. So, in this study, we examined the effects of proNGF stimulation on breast cancer cells using kinase arrays and we showed that proNGF down-regulates EGFR in cancer cells.

RESULTATS

RESULTS

ProNGF induced EGFR phosphorylation on Tyr1068

To determine whether proNGF could interact with tyrosine kinase signaling, we analyzed by kinase arrays the activation of growth factor receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells (Figure 1A and B). Indeed, as we previously showed proNGF induced a slight increase of TrkA phosphorylation. Moreover, we detected an increase of phosphorylation of EGFR, ERBB4 and Axl while proNGF decreases phosphorylation of EphA2. Interestingly, EGFR phosphorylation is mainly impacted by proNGF with a five-fold increase of tyrosine phosphorylation level. So we tested the impact of proNGF on the phosphorylation of tyrosine residues (992, 1045 and 1068) of the cytoplasmic tails of EGFR in two breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and Sk-Br-3) and two HNSCC (Figure 1C). Interestingly, we found that proNGF only induces the phosphorylation of tyrosine 1068. Using Cal-27 we showed that proNGF induced a rapid but more transient increase of the Y1068 phosphorylation as compared to EGF (Figure 1D). Interestingly NGF does not enhance Y1068 phosphorylation.

ProNGF induced EGFR down regulation *via* sortilin.

Tyrosine 1068 is known to be important to EGFR internalization. So we analyzed the effect of proNGF on EGFR expression in Cal-27. Using flow cytometry, we visualized that proNGF decreased EGFR membrane staining (-52% after 15min of treatment) (Figure 2A and B). The level of EGFR seems to return to the basal level after 30 min of proNGF stimulation. To confirm the assessment of Y1068 residue on EGFR membrane regulation, we transfected Y1068F EGFR mutant expression vector in Cal-27 HNSCC and examined EGFR amount in flow cytometry under proNGF stimulation. As showed in figure 2C, while proNGF decreases EGFR, no modification of EGFR amount was observed in Y1068F mutant indicating that down-regulation of EGFR is mediated by this residue.

Moreover, we also examined the involvement of proNGF receptors in this EGFR regulation by invalidating p75^{NTR} and sortilin (Figure 2D). As observed, sip75^{NTR} did not modify the effect of proNGF on EGFR staining: proNGF still decreased EGFR staining about 47% under proNGF. While siSortilin inhibits EGFR level decrease induced by proNGF. To confirm the involvement of sortilin, effects of siSortilin and sip75^{NTR} on EGFR Y1068 phosphorylation were then assessed on western blot (Figure 2E). Thus, according to the previous result siSortilin but not sip75^{NTR} seems to abolish EGFR 1068 phosphorylation induced by proNGF.

RESULTATS

ProNGF induces Sortilin/EGFR complex in cancer cells

In order to determine interaction between sortilin and EGFR, proximity ligation assays were performed using Cal-27 expressing wild type EGFR and Y1068F mutant EGFR (Figure 3). We first realized PLA staining without permeabilization. As observed, a slight interaction between sortilin and EGFR is detected in absence of stimulation. This interaction is higher in Cal-27 EGFR Y1068F mutant than in wild type EGFR cells. In presence of proNGF, PLA signal is increase after 5 min of treatment and then decrease in wild type cells. While in EGFR mutant, a strong increase is observed at 5 min with proNGF and no decrease of PLA signal is observed. These results indicated that proNGF regulates EGFR complex and Y1068F mutation probably allows complex stabilization at the plasma membrane. To confirm this hypothesis we then perform PLA but on permeabilized cells to detect potential complex endocytosis in wild type EGFR cells. In this condition, PLA signal is observed at 5 min and is maintained up to 30 min of proNGF treatment in wild type as well as in Y1068F mutant cells. Altogether, PLA experiments suggested that proNGF induced the formation of sortilin EGFR complex wich allows EGFR internalization and that sortilin/EGFR complex internalization is dependent of Y1068 phosphorylation on EGFR.

ProNGF downregulates EGF biological activities in cancer cells.

To mesure the functional consequences of proNGF phosphorylation of EGFR within the cell, we tested the effect of proNGF on EGF induced invasion and cell growth of Cal-27 cells (Figure 4). In Figure 4A, invasive capacities of Cal-27 were measured by transwell assays. As observed, basal invasive capacity of native Cal-27, Cal-27 wild type EGFR and Cal-27 Y1068F EGFR mutant were the same. Indeed, EGF enhanced invasion of the three cell lines while proNGF had no effect. The invasive capacities of native Cal-27 and Cal-27 wild type EGFR were decreased as compared to EGF alone when cells were treated by both proNGF and EGF (mix). Interestingly, proNGF did not induced decrease of EGF responsiveness indicating that proNGF effect on EGF induced invasion is dependent of Y1068 phosphorylation.

Moreover, we tested the impact of proNGF on EGF induced clonogenic cell growth (Figure 4C). In clonogenic assay, Y1068F mutant cells failed to develop colony (data not shown) indicated that Y1068 regulated Cal-27 clonogenicity. Moreover, we shown that both EGF and proNGF induced clonogenic growth but the addition of the two growth factors had antagonist effect by reducing colonies formation. These results indicated that proNGF alters EGF effect and interestingly EGF seems to regulate proNGF effects too.

RESULTATS

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that proNGF is able to transactivate EGFR on Tyr-1068. Functional consequence of Y1068 phosphorylation is to down-regulate EGFR and the inhibition of subsequent EGF biological effects in cancer cells. Interestingly, proNGF is already known to inhibit Trk-mediated survival (Song *et al.*, 2010). Nevertheless, mechanism seems to be different. Indeed, proNGF effect in neuron cells is mediated by proNGF binding to p75^{NTR} and induction of PTEN phosphatase. Moreover PTEN acts downstream of growth factor receptor signaling to inhibit PI3-kinase mediated survival. Wilson *et al* also demonstrate that sortilin and EGFR are associated to enhance EGFR expression in cancer exosome (Wilson *et al.*, 2014). As we observed, the authors show that sortilin and EGFR are in complex. Nevertheless, this complex is associated to the sorting of EGFR and exocytosis. Sortilin involvement in endocytosis is also well documented. Indeed, sortilin acts as endocytic receptor for numerous factor like apolipoprotein A-V or CNTF (Nilsson *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2010). One could exclude that proNGF binding to sortilin induced such endocytosis of proNGF. Thus by the physical binding to EGFR, sortilin induced it endocytosis in a non-specific manner. Indeed, EGFR endocytosis is a complex mechanism allow by a kinetic of kinase, phosphatase and ubiquitin ligase recruitment at the phosphorylation site (Vivanco *et al.*, 2010). In this paper, the authors demonstrate that termination of EGFR signaling is link to Cbl binding to EGFR controlled by PTEN phosphatase. Interestingly PTEN is link to EGFR endocytosis and proNGF stimulation. The authors also stress the fact that regulation of such a mechanism is responsible of EGFR inhibitor resistance in cancer cells by a tight regulation of EGFR phosphorylation. One could exclude that under EGFR inhibitor treatment effects of proNGF by its differential regulation of Y1068F participate at such escape mechanism. Indeed, Wheeler *et al* demonstrate that Y1068 phosphorylation of EGFR is an independent pejorative prognostic factor in HNSCC (Wheeler *et al.*, 2012). Nevertheless, tyrosine 1068 phosphorylation mechanism is unknown. In this study, we demonstrated that proNGF induced Y1068 phosphorylation independently of other tyrosine residues of EGFR. So it will be interesting to test the hypothesis of proNGF induction of Y1068 phosphorylation in HNSCC. In conclusion, our results have to be improved by exploring the signal transduction of proNGF by sortilin. Moreover, physiological consequences on tumor have to be measured to assess the involvement of such activation in tumors.

RESULTATS

METHODS

Cell culture

Cal-27 and Cal-33 Head and Neck cancer cell (HNSCC) lines and Sk-Br-3 breast cancer cell lines was cultured in Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM) (Invitrogen Corporation, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% inactivated FBS (Fetal Bovine Serum) (Life technologies, Saint-Aubin, France), 1% non-essential amino acids and antibiotics.

MDA-MB-231 breast cancer cell line was cultured in Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) with the same supplemental components.

Cells was starved during 24 h in culture medium with 0.1% FBS before treatment with 0.5 nM recombinant human non cleavable proNGF (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) or 16nM NGF(Alomone Labs) or 2nM EGF (Biotechne, Minneapolis, USA) at times indicated, with or without a pre-incubation for 1 h with Neurotensin (1 μ M) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

cDNA constructs and transfection

The EGFR-wt (pCMV-Hygro) (Sino Biological, Beijing, P.R. China) mutagenesis was performed by replacing tyrosine 1068 residue into phenylalanine with the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent technologies, Massy, France) by the following primers:

Forward: 5' CTCCCAGTGCCTGAATTCATAAACCAGTCCGTTC 3'

Reverse: 5' GAACGGACTGGTTTATGAATTCAGGCACTGGGAG 3'

Cell electroporation were done using the Cell Line Nucleofector Kit R (Lonza) with W-001 setting. Cells were selected with 750 μ g/ml Hygromycin (Invitrogen).The siRNA sequences used (2 μ g for each transfection) were against p75^{NTR} (Eurogentec, Angers, France): AUGCCUCCUUGGCACCUCC, sortilin (Eurogentec): CUCUGCUGUUAACACCACCTT compared to control (siGFP) GAUGAACUUCAGGGUCAGCTT.

Western-blotting

Subconfluent cancer cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed and kept on ice 10 min in the lysis buffer. Cells were then scratched with a rubber scraper and the supernatants were collected after centrifugation (6000 x g, 10 min, 4°C). Protein concentration was determined using the BCA assay (Sigma-Aldrich) and samples were stored at -80°C until analysis. Protein extracts were then separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Immobilon, Millipore). The membranes were blocked with 5% non-fat milk

RESULTATS

(anti-EGFR, anti EGFR-pY992, pY1045, pY1068), 0.2% casein (anti-sortilin) or 5% bovine serum albumin (BSA) (anti-actin) in TBS-0.1% Tween 20. Immunoblotting with primary antibody were under the same condition (except for anti-EGFR, anti EGFR- pY992, pY1045, pY1068: 5%BSA in TBS-T), overnight at 4°C. After horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson Immunoresearch, Asnières, France) incubation for 1 hour at room temperature, reactive proteins were detected using SuperSignal West Pico Substrate (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Signal acquisition was performed by Fuji LAS-4000 luminescent image analyzer and quantified using Fujifilm Multi Gauge software. The antibodies used in these studies were: anti-sortilin (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), anti-actin (A2066, Sigma-Aldrich) and all other antibodies was provided by Cell Signaling Technologies (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France).

Flow cytometry analysis

After N.C. proNGF (0.5nM) treatment, cells were washed twice with ice-cold PBS. Cells were incubated with isotype IgG goat (Biotechne), anti-EGFR antibody (Biotechne) (1 µg in 1% SVF, 30 min, 4°C) and washed again twice with ice-cold PBS. After Alexa488-conjugated secondary antibody (Jackson Immunoresearch) incubation for 30 min at 4°C, EGFR staining were analyzed using flow cytometry CyAn™ and Summit 4.5 software (Beckmann Coulter, France).

***In vitro* proximity ligation assay (PLA)**

Cells (20 000 / well) were grown on acid-washed eight-well glass slides (Thermo Fischer Scientific) in DMEM-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) for different time. After treatment, cells were fixed with paraformaldehyde (4% in PBS) and permeabilized with PBS-Triton X100 0,5%. Samples were incubated with BSA (4% in PBS) for 1h at room temperature. Immuno-staining was performed overnight at 4°C with primary antibodies diluted 1:50 (goat anti-EGFR Biotechne; mouse anti-sortilin, Biotechne) or 1:100 (rabbit anti-EphA2, #6997 Cell Signaling Technology) in the saturation buffer. The slides were washed twice in PBS 1X for 5 min each and incubated for 1h, at 37°C, with oligo-labeled anti-mouse minus and anti-goat plus PLA probes (Sigma-Aldrich) diluted 1:5 in 4% BSA. The slides were then washed twice for 5 min each with TBS-T and signals were detected by Duolink Detection kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. After

RESULTATS

counterstaining with Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich), samples were mounted with fluorescence mounting medium (Dako). Images were acquired using a fluorescence microscope (100X oil immersion objective, microscope Eclipse Ti; Nikon, Champigny sur Marne, France) and analyzed with NIS-Elements BR software (Nikon).

In vitro invasion assay

Cells were starved in culture medium with 0.1% FBS. Invasion assays were done in 12-well Boyden microchambers (BD Biosciences) with 8 µm pore size membranes. The Transwells were first coated with 100 µl of culture medium with 40 µg of rat tail collagen I (Millipore) for 1 h at 37°C in 5% CO₂. 100,000 cells in 400 µl culture medium with 0.1% FBS were loaded in the upper chamber with or without inhibitors. 1.6 ml culture medium with 0.1% FBS was placed in the lower chamber with human N.C. proNGF (0.5 nM) or EGF (2 nM) and incubated for 24 h. After cells fixation in frozen methanol for 10 min, the membranes were washed twice with cold PBS and the upper surfaces of the membranes were scrapped in order to remove cells. Then, the cells remaining on the face down were Hoechst-stained (1 mM; 30 min), mounted on glass slides with glycergel and counting (16 fields per membrane) through a fluorescence microscope (objective 40X, microscope Eclipse Ti). Data are reported as mean ± S.D. of three experiments done in triplicate. Statistics were performed with one-way ANOVA test and Bonferroni's post-test ($p < 0.001$) by using GraphPad Prism 5.01 software.

Clonogenic assay

After 24h of starvation (1%FBS) 30 000 cells was seeded on 35mm petri dishes and treated by EGF (2nM), proNGF (0,5nM) or both. After 3 weeks, cells was fixed by PBS-Glutaraldehyde 1% and stained by crystal violet. Colonies was counted with ImageJ software.

RESULTATS

REFERENCES

- [1]A. Wells, EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31 (1999) 637-643.
- [2]K.K. Ang, B.A. Berkey, X. Tu, H.Z. Zhang, R. Katz, E.H. Hammond, K.K. Fu, L. Milas, Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 62 (2002) 7350-7356.
- [3]F.R. Hirsch, M. Varella-Garcia, P.A. Bunn, Jr., M.V. Di Maria, R. Veve, R.M. Bremmes, A.E. Baron, C. Zeng, W.A. Franklin, Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 21 (2003) 3798-3807.
- [4]J.P. Spano, C. Lagorce, D. Atlan, G. Milano, J. Domont, R. Benamouzig, A. Attar, J. Benichou, A. Martin, J.F. Morere, M. Raphael, F. Penault-Llorca, J.L. Breau, R. Fagard, D. Khayat, P. Wind, Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 16 (2005) 102-108.
- [5]M. Scaltriti, J. Baselga, The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12 (2006) 5268-5272.
- [6]S. Kobayashi, T.J. Boggon, T. Dayaram, P.A. Janne, O. Kocher, M. Meyerson, B.E. Johnson, M.J. Eck, D.G. Tenen, B. Halmos, EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 352 (2005) 786-792.
- [7]L.A. Diaz, Jr., R.T. Williams, J. Wu, I. Kinde, J.R. Hecht, J. Berlin, B. Allen, I. Bozic, J.G. Reiter, M.A. Nowak, K.W. Kinzler, K.S. Oliner, B. Vogelstein, The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 486 (2012) 537-540.
- [8]R.J. Gillies, D. Verduzco, R.A. Gatenby, Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat Rev Cancer* 12 (2012) 487-493.

RESULTATS

[9]D.L. Wheeler, S. Huang, T.J. Kruser, M.M. Nechrebecki, E.A. Armstrong, S. Benavente, V. Gondi, K.T. Hsu, P.M. Harari, Mechanisms of acquired resistance to Cétuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* 27 (2008) 3944-3956.

[10]M.A. Olayioye, R.M. Neve, H.A. Lane, N.E. Hynes, The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19 (2000) 3159-3167.

[11]E. Zwick, P.O. Hackel, N. Prenzel, A. Ullrich, The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* 20 (1999) 408-412.

[12]C. Festuccia, G.L. Gravina, P. Muzi, D. Millimaggi, V. Dolo, C. Vicentini, C. Ficorella, E. Ricevuto, M. Bologna, Her2 crosstalks with TrkA in a subset of prostate cancer cells: rationale for a guided dual treatment. *Prostate* 69 (2009) 337-345.

[13]Y. Demont, C. Corbet, A. Page, Y. Ataman-Onal, G. Choquet-Kastylevsky, I. Fliniaux, X. Le Bourhis, R.A. Toillon, R.A. Bradshaw, H. Hondermarck, 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 (2012) 1923-1931.

[14]L. Dolle, E. Adriaenssens, I. El Yazidi-Belkoura, X. Le Bourhis, V. Nurcombe, H. Hondermarck, Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 4 (2004) 463-470.

[15]O. Clewes, M.S. Fahey, S.J. Tyler, J.J. Watson, H. Seok, C. Catania, K. Cho, D. Dawbarn, S.J. Allen, Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin. *J Neurochem* 107 (2008) 1124-1135.

[16]R. Masoudi, M.S. Ioannou, M.D. Coughlin, P. Pagadala, K.E. Neet, O. Clewes, S.J. Allen, D. Dawbarn, M. Fahnestock, Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors. *J Biol Chem* 284 (2009) 18424-18433.

[17]L. Aubert, M. Guilbert, C. Corbet, E. Genot, E. Adriaenssens, T. Chassat, F. Bertucci, T. Daubon, N. Magne, X. Le Bourhis, R.A. Toillon, NGF-induced TrkA/CD44 association is

RESULTATS

involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib. *Oncotarget* 6 (2015) 9807-9819.

[18]W. Song, M. Volosin, A.B. Cragolini, B.L. Hempstead, W.J. Friedman, ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons. *J Neurosci* 30 (2010) 15608-15615.

[19]C.M. Wilson, T. Naves, F. Vincent, B. Melloni, F. Bonnaud, F. Lalloue, M.O. Jauberteau, Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J Cell Sci* 127 (2014) 3983-3997.

[20]S.K. Nilsson, S. Christensen, M.K. Raarup, R.O. Ryan, M.S. Nielsen, G. Olivecrona, Endocytosis of apolipoprotein A-V by members of the low density lipoprotein receptor and the VPS10p domain receptor families. *J Biol Chem* 283 (2008) 25920-25927.

[21]J.V. Larsen, M. Hansen, B. Moller, P. Madsen, J. Scheller, M. Nielsen, C.M. Petersen, Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer. *Mol Cell Biol* 30 (2010) 4175-4187.

[22]I. Vivanco, D. Rohle, M. Versele, A. Iwanami, D. Kuga, B. Oldrini, K. Tanaka, J. Dang, S. Kubek, N. Palaskas, T. Hsueh, M. Evans, D. Mulholland, D. Wolle, S. Rajasekaran, A. Rajasekaran, L.M. Liao, T.F. Cloughesy, I. Dikic, C. Brennan, H. Wu, P.S. Mischel, T. Perera, I.K. Mellinghoff, The phosphatase and tensin homolog regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor response by targeting EGFR for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 6459-6464.

[23]S. Wheeler, D.R. Siwak, R. Chai, C. LaValle, R.R. Seethala, L. Wang, K. Ciepely, C. Sherer, C. Joy, G.B. Mills, A. Argiris, J.M. Siegfried, J.R. Grandis, A.M. Egloff, Tumor epidermal growth factor receptor and EGFR PY1068 are independent prognostic indicators for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 18 (2012) 2278-2289.

RESULTATS

FIGURE AND TABLE LEGENDS

Figure 1. proNGF induces EGFR phosphorylation on Tyr1068. (A) MDA-MB-231 cells were treated by 0.5 nM of proNGF for 5min. Then protein extract were prepared and tyrosine phosphorylation of RTK were assessed by phospho-RTK array. (B) Analysis of densitometry was performed and tyrosine phosphorylations of RTK of no treated cells were considered as 1. (C) MDA-MB-231 cells, Sk-Br-3 cells, Cal-33 cells and Cal-27 cells were treated with 0.5nM of proNGF for the indicated times. Protein samples were examined by Western blotting using anti-phosphoEGFR, anti-EGFR or anti- β -Actin (as loading control). (D) Cal-27 cells were treated by 2nM of EGF, 0.5nM of proNGF or 16nM of NGF for the indicated time and protein extracts were then prepared and examined by western blotting. Quantification was performed and no treated cells were considered as 1.

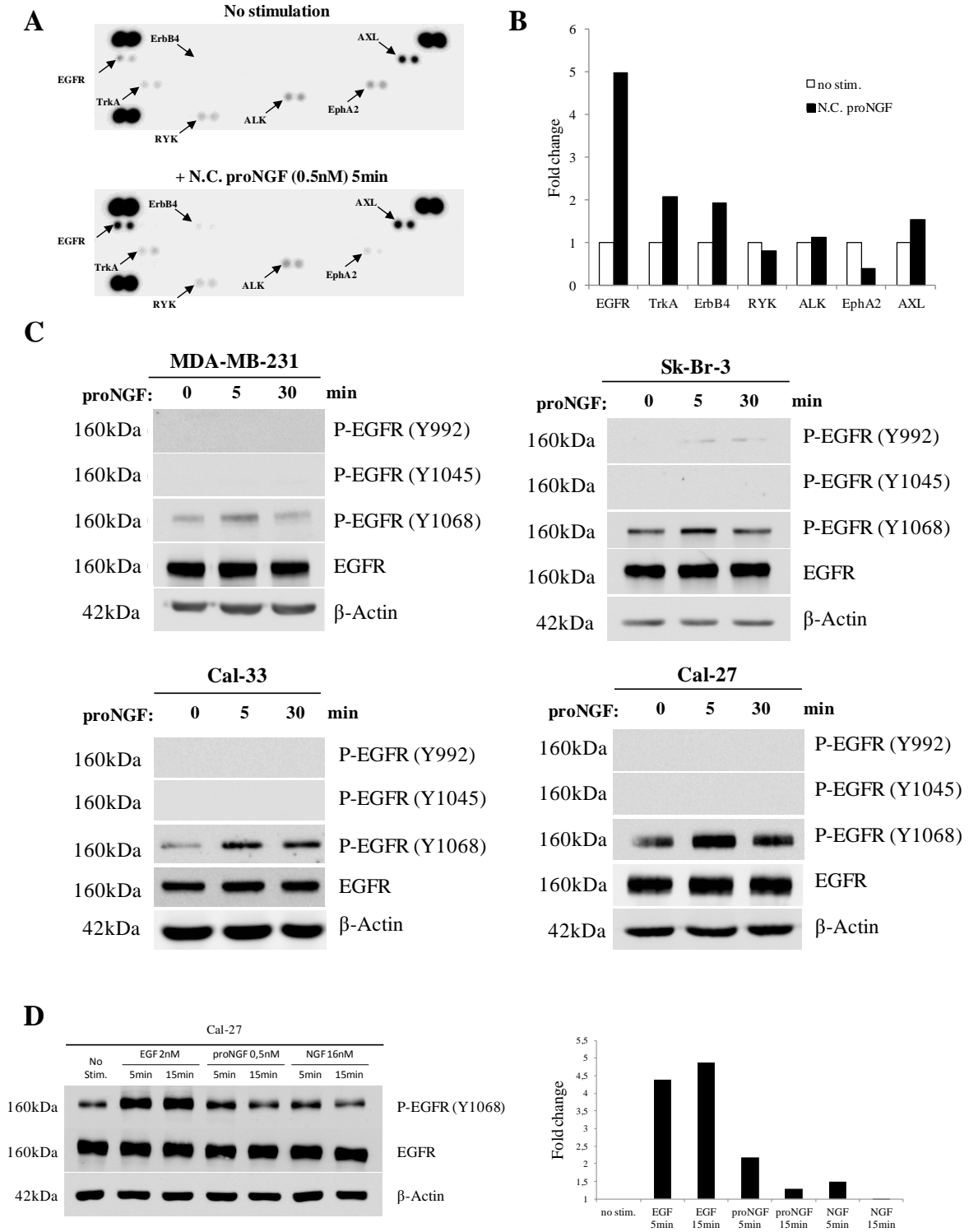
Figure 2. proNGF induced EGFR down regulation via sortilin. (A and B) Cal-27 cells were treated with 0.5nM of proNGF for the indicated time and membrane level of EGFR was assessed by flow cytometry. Fold Changes were determined using the median value of each histogram and no treated cells were considered as 100%. (C and D) Cal-27 cells were transfected by EGFR wt plasmid, EGFR Y1068F mutant plasmid, sip75^{NTR} or siSortilin. Then, Cal-27 cells were treated with 0.5nM of proNGF for 15 min or 30 min and membrane level of EGFR was assessed by flow cytometry (E) Cal-27 cells were transfected by siGFP or siSortilin and treated by 0.5 nM of proNGF for 5min or 30min. Protein samples were assessed by western blotting using anti-phosphoEGFR, anti-EGFR or anti- β -Actin (as loading control).

Figure 3. ProNGF induces sortilin/EGFR complex in cancer cells. Cal-27 cells were transfected by EGFR wt plasmid, EGFR Y1068F mutant plasmid and treated with 0.5nM of proNGF for 5min, 15 min or 30 min. Then, permeabilization of cell membranes was or not performed. sortilin/EGFR association was examined by a proximity ligation assay and interaction between sortilin and EGFR are visualized as red spots.

RESULTATS

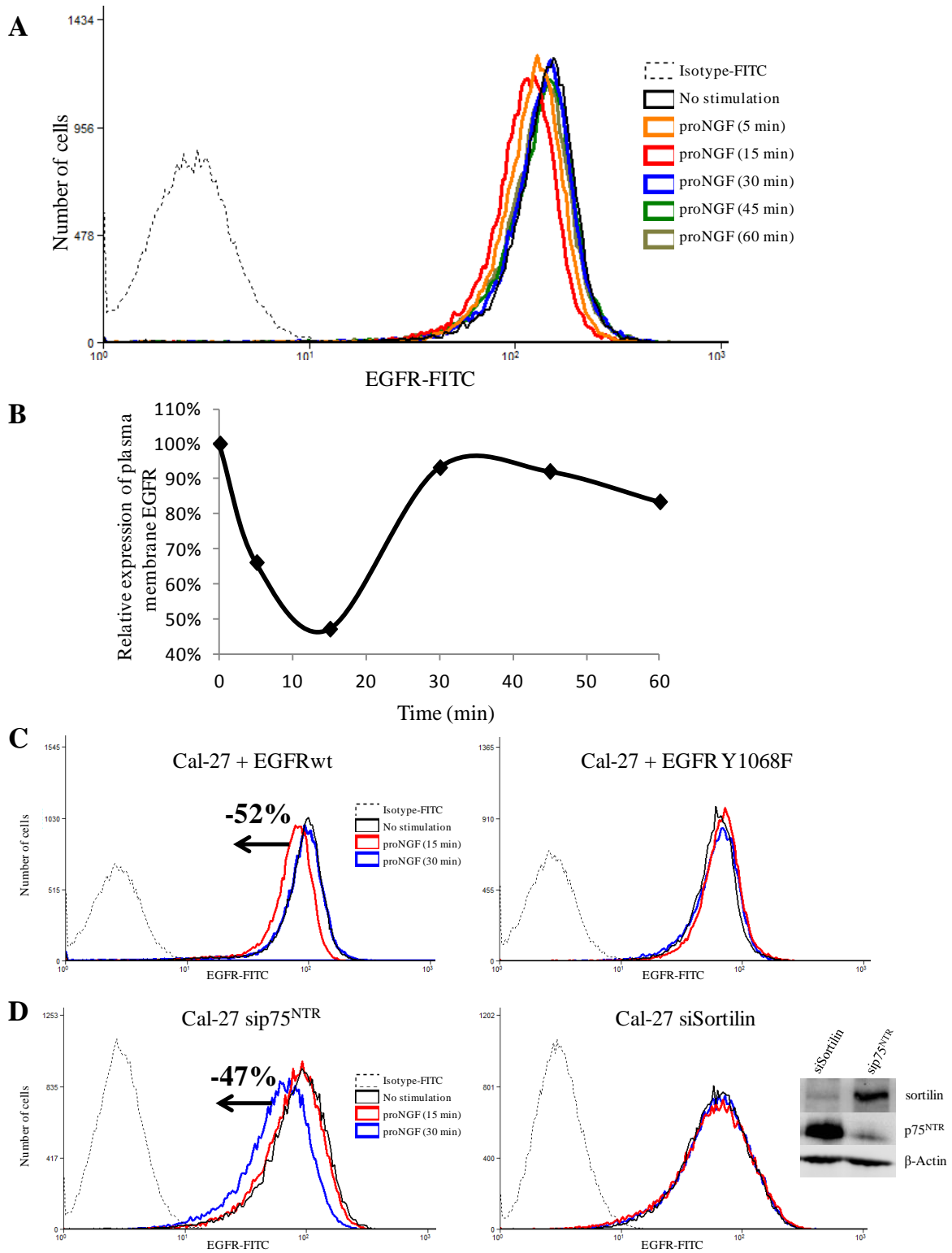
Figure 4. ProNGF downregulates EGF biological activities in cancer cells. (A) Cal-27 wt, transfected by EGFRwt or EGFR Y1068F mutant plasmids cells were treated with 2nM of EGF, 0.5nM of proNGF or both. Invading cells were evaluated using Transwells assay. Fold Changes were determined using the mean \pm S.D. of three experiments and no treated cells were considered as 100%. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. Error bars represent S.D. *** $p < 0.001$ for growth factor stimulation versus no stimulation; * $p < 0.05$ for growth factor stimulation versus no stimulation; ¶ $p < 0.001$ for EGF stimulation versus Mix condition. (B) Effects of EGF, proNGF or both treatment on colony formation. Cells were plated at single cell density and cultured for three weeks. Then, cells were stained by crystal violet and quantification of colony forming units (CFU) was performed with imageJ software (no treated cells were considered as 1).

RESULTATS



Guilbert *et al*, Figure 1

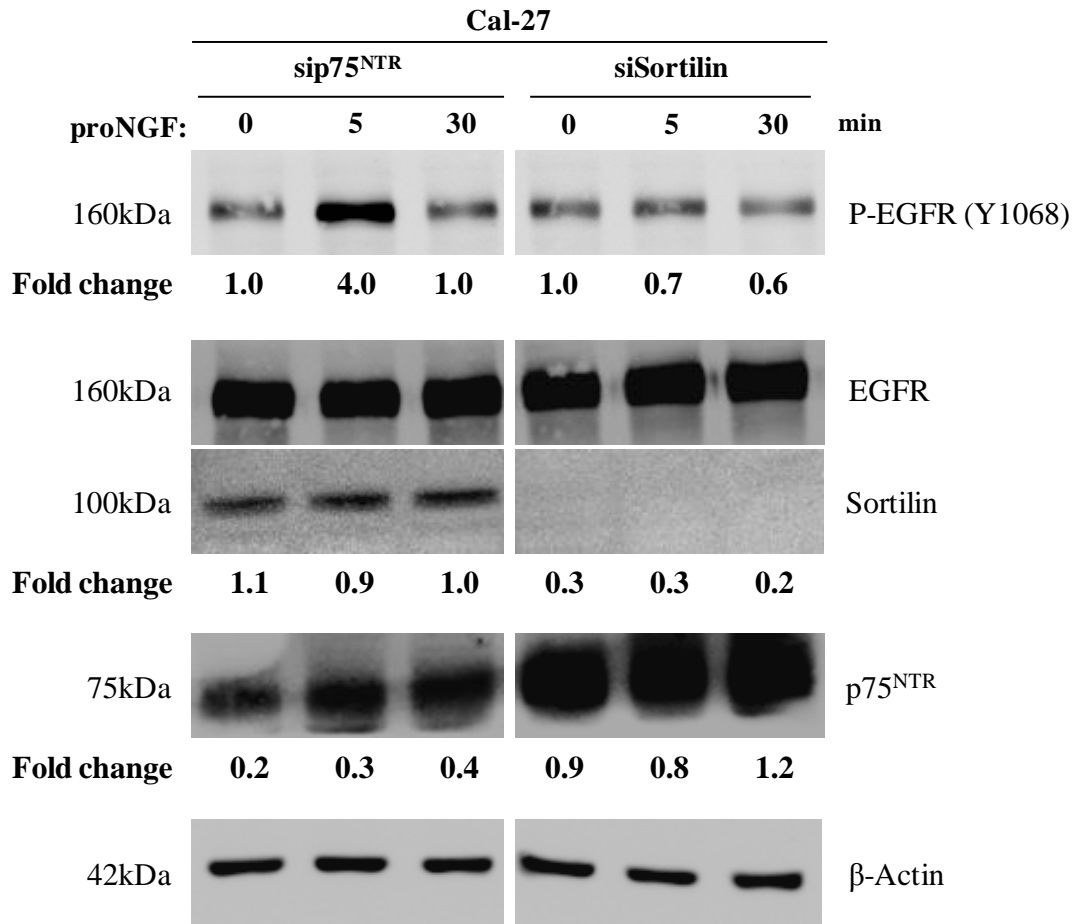
RESULTATS



Guilbert *et al*, Figure 2

RESULTATS

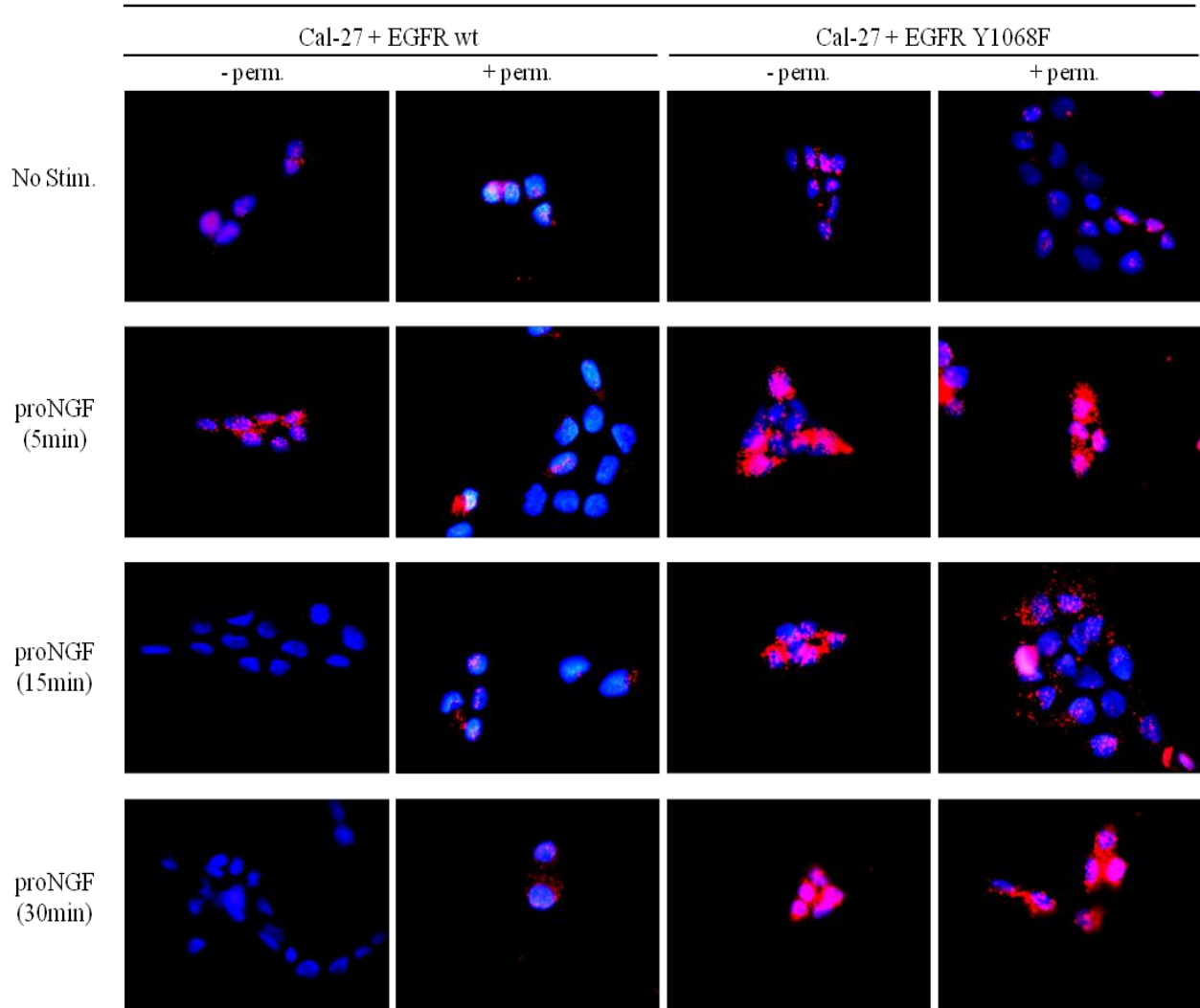
E



Guilbert *et al*, Figure 2

RESULTATS

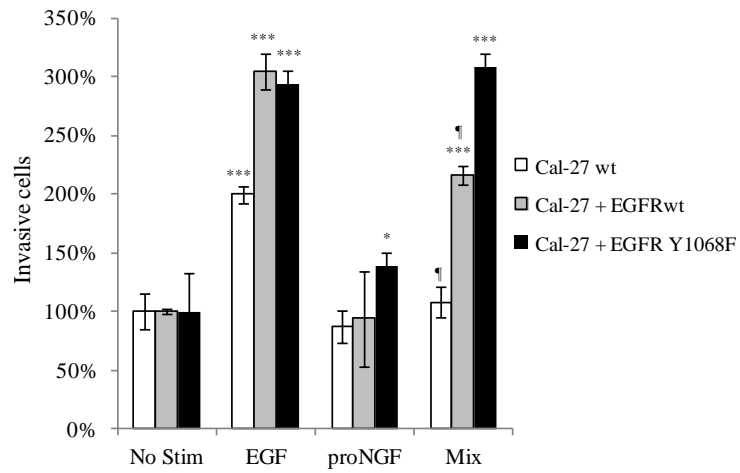
Sortilin-EGFR interaction



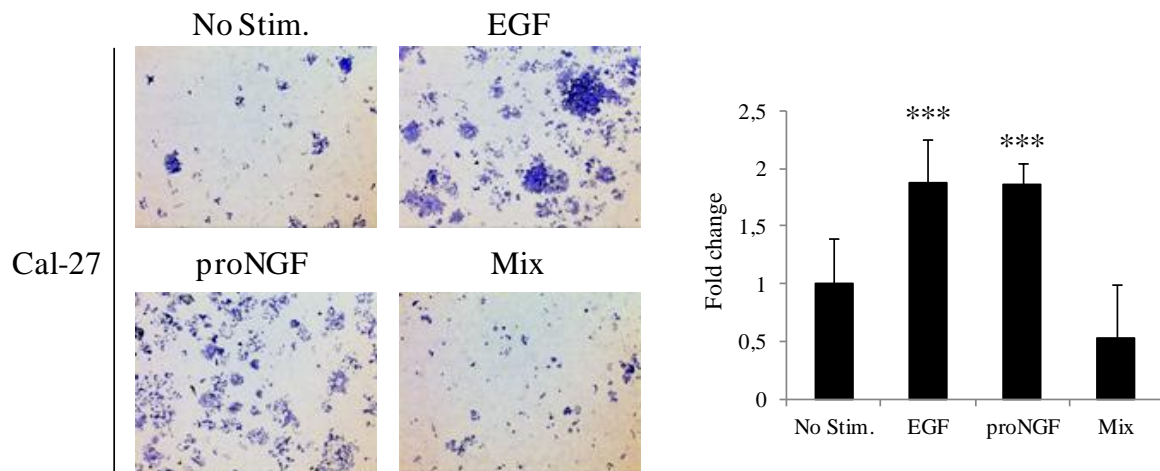
Guilbert *et al*, Figure 3

RESULTATS

A



B



Guilbert *et al*, Figure 4

**DISCUSSION
&
PERSPECTIVES**

Discussion & Perspectives

Mes travaux ont montré que le NGF et son précurseur induisent la formation d'interactomes qui ne se limitent pas à leurs récepteurs canoniques (TrkA, p75^{NTR} et sortiline) dans les cellules cancéreuses. Ainsi, j'ai pu démontrer que le NGF induit la formation d'un complexe TrkA / CD44 et l'activation d'une signalisation sous-jacente indépendante de l'activité tyrosine kinase de TrkA (Aubert *et al.*, 2015). Cette signalisation est non seulement à l'origine des effets biologiques induits par le NGF (invasion, croissance cellulaire) mais explique probablement également les mécanismes de résistance des cellules cancéreuses lors de traitements par des inhibiteurs de TrkA comme le Lestaurtinib. De plus, j'ai mis en évidence que le proNGF induit lui aussi un interactome complexe via un récepteur X (brevet soumis) et la modulation de la phosphorylation de l'EGFR dans les cellules tumorales (article en préparation). Néanmoins de nombreuses questions restent en suspens concernant la formation, le fonctionnement et les effets biologiques des interactomes que je décris. Ces questions sont discutées ci dessous.

I. Etude de l'interactome de TrkA induit par le NGF

1. Interaction TrkA / CD44

Nous avons dans un premier temps démontré que le NGF induit une association fonctionnelle entre TrkA et CD44. A ce jour, cette interaction n'avait jamais été décrite dans la littérature. Nos travaux permettent ainsi de mettre en lumière l'importance du complexe TrkA / CD44 dans les cancers et posent des questions sur les mécanismes sous-jacents de cette interaction. En effet, malgré une forte expression de CD44 et de TrkA dans les cellules tumorales, il semblerait qu'aucune étude n'avait démontré la liaison ou l'effet biologique de la formation d'un tel complexe. Pour autant CD44 est connu pour interagir avec de nombreux récepteurs aux facteurs de croissance comme l'EGFR mais aussi le FGFR, c-Met, HER2, VEGFR2, TGFR1 (Orian-Rousseau *et al.*, 2008). Ces interactions entre CD44 et ces différents récepteurs sont probablement à l'origine de la diversité des effets biologiques induits par CD44. De plus, les patrons d'expression de CD44 et de ses isoformes sont altérés dans les cellules cancéreuses (Naor *et al.*, 1997). Ainsi, dans les cancers, les variants de CD44

sont surexprimés par rapport à la forme standard (qui ne possède pas d'exons variants). Cette dérégulation de l'expression de CD44 et de ses isoformes dans les cancers semble cependant bien maîtrisée. Ainsi si l'on prend comme modèle les cancers du sein, les cellules cancéreuses au phénotype luminal vont exprimer des isoformes de hauts poids moléculaires ayant inséré plusieurs exons hypervariables, alors que les cellules cancéreuses de sein au phénotype basal, expriment des isoformes de bas poids moléculaires, contenant 2 ou 3 exons maximum (Olsson *et al.*, 2011). Cette expression différentielle de la forme standard et de ses variants a de nombreuses conséquences biologiques, notamment dans la capacité de CD44 à interagir avec les facteurs de croissance et leurs récepteurs. Plus particulièrement, il a été démontré que les variants de CD44 contenant les régions hypervariables 3 et 6 interfèrent avec les facteurs de croissance et leurs récepteurs. En effet, l'insertion de la région v3 modifie la glycosylation de CD44 et permet la liaison de facteurs de croissance affins à l'héparine comme le **proHB-EGF** (**H**eparin-**B**inding **E**GF-like **G**rowth **F**actor) ou l' **HGF/SF** (**H**eparin **G**rowth **F**actor / **S**catter **F**actor) (Bennett *et al.*, 1995; van der Voort *et al.*, 1999). Une fois lié à CD44v3, le proHB-EGF est clivé par la MMP7 pour donner l'HB-EGF mature qui active HER4. Dans le cas de l'HGF/SF, sa liaison à CD44 serait elle aussi dépendante de la glycosylation apportée par la région hypervariable v3. Cependant d'autres mécanismes d'interaction, indépendants de la glycosylation, font intervenir l'isoforme CD44v6 dans la signalisation HGF / c-Met (Orian-Rousseau *et al.*, 2002). Les interactions entre CD44 et les facteurs de croissance ne sont pas encore pleinement décryptées. Il se pourrait que les variants de CD44 interagissent directement avec leurs récepteurs. Afin de déterminer les mécanismes d'interaction mis en jeu dans la formation du complexe TrkA / CD44 induit par le NGF, il serait donc intéressant de caractériser la nature du ou des variants de CD44 impliqué(s) dans cette interaction. Pour cela, l'invalidation spécifique de variants par des approches de siRNA associée à l'étude de l'interaction TrkA / CD44 et des effets biologiques induits par le NGF est envisagée. Une approche différente, en cours de réalisation, consiste à transfecter dans des cellules Cos-7, n'exprimant pas CD44, les différents variants afin d'évaluer leur capacité à se complexer avec TrkA après stimulation des cellules par du NGF.

L'interaction pourrait également être le fruit de l'échafaudage entre les protéines de signalisation et les récepteurs de facteurs de croissance. Dans notre étude, nous avons montré que le complexe TrkA / CD44 induit le recrutement des protéines p115RhoGEF, RhoA, RhoC et ROCK1 (Aubert *et al.*, 2015). Ces protéines sont par ailleurs connues pour interagir avec les composants du cytosquelette comme les protéines ERM (retrouvées dans nos

identifications en protéomique) et participeraient à la formation de complexes de signalisation dépendants de CD44 (Martin *et al.*, 2003). Il est possible que dans ce cadre, p115RhoGEF agisse en tant qu'intermédiaire dans l'interaction TrkA / CD44. En effet, cette protéine est capable d'interagir physiquement avec CD44 (Bourguignon *et al.*, 2003), mais peut également interagir avec les RTK (Schiller 2006). Afin de déterminer son rôle exact dans l'interaction TrkA / CD44, l'utilisation d'un siRNA dirigé contre p115RhoGEF suivit de l'évaluation de l'interaction entre les deux co-recepteurs par Duolink ou immunoprécipitation est envisagée.

2. Signalisations induites par le complexe TrkA / CD44

La signalisation induite par le NGF dans les cellules cancéreuses de sein peut être regroupée en deux catégories : les signalisations dépendantes de l'activité tyrosine kinase de TrkA et celles qui ne le sont pas.

Nos études réalisées sur les cellules MDA-MB-231 ont permis de montrer que le NGF induisait bien la phosphorylation de Src et d'Akt et que ces voies conduisent à l'invasion cellulaire. Pour confirmer le rôle de TrkA dans ces signalisations, nous avons soit inhibé l'expression de TrkA par siRNA, soit inhibé son activité par traitement des cellules au K252a. Nous avons alors démontré que l'activation des voies Src et Akt est non seulement dépendante de la présence de TrkA mais requiert également l'activité kinase du récepteur (données non montrées). De plus, l'inhibition d'expression de CD44 par siRNA n'affecte pas la phosphorylation de Src et Akt (Aubert *et al.*, 2015), suggérant ainsi que ces signalisations canoniques ne nécessitent pas la formation du complexe TrkA / CD44. Il serait intéressant de déterminer comment les voies Src et Akt conduisent à l'invasion cellulaire, en évaluant notamment le rôle de FAK qui est retrouvé dans la liste des interactants de TrkA dans notre étude (Aubert *et al.*, 2015) et qui joue un rôle important dans l'invasion cellulaire (Guarino 2010).

Parallèlement à cela, une voie de signalisation, cette fois-ci indépendante de l'activité kinasique de TrkA est activée après stimulation au NGF. En effet, nous avons montré que le NGF permettait l'induction de la voie des RhoGTPases (p115RhoGEF / RhoA et RhoC / ROCK1). L'étude de l'activité des RhoGTPases a par ailleurs montré que cette signalisation nécessitait CD44 et que, non seulement l'activité tyrosine kinase de TrkA n'est pas requise pour l'activation de cette voie, mais que l'utilisation d'un TrkA-KD (Kinase Dead) favorisait cette activation. L'implication de la voie des RhoGTPases dans les mécanismes d'invasion est bien décrite dans la littérature (Sahai *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2008). Ceci est aussi confirmé

dans notre modèle car, après inhibition de p115RhoGEF ou de ROCK1, l'invasion cellulaire dépendante du NGF est fortement diminuée. Il serait également intéressant d'étudier le rôle des protéines ERM dans cette signalisation. En effet, l'Ezrin et la Moesin sont deux protéines retrouvées dans l'interactome de TrkA après traitement au NGF. Des liens sont par ailleurs établis entre les RhoGTPases et les protéines ERM. En effet, les RhoGTPases sont connues pour induire la phosphorylation des ERM sur une thréonine située en C-terminal de ces protéines (T567 pour l'Ezrin, T564 pour la Radixin et T558 pour la Moesin) (Matsui *et al.*, 1998). Ces phosphorylations entraînent un changement conformationnel des protéines ERM modulant leurs interactions avec les filaments d'actine pour conduire à l'invasion cellulaire (Chuan *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2009). De plus, il semblerait que les ERM phosphorylés mènent à un rétrocontrôle positif de l'activité des RhoGTPases en séquestrant RhoGDI (Matsui *et al.*, 1999). L'étude de ces phosphorylations sous l'effet du NGF pourrait donc contribuer à une meilleure compréhension de la signalisation sous-jacente au complexe TrkA / CD44. Enfin, la Basigine, protéine recrutée à la membrane plasmique sous l'effet du NGF, pourrait également s'avérer être un élément important de l'axe NGF / TrkA / CD44. En effet, cette glycoprotéine transmembranaire est étroitement liée à CD44. Elle stimule la synthèse d'acide hyaluronique, principal ligand de CD44, en favorisant l'expression des Has (Hyaluronan synthases) (Marieb *et al.*, 2004). Cette production d'acide hyaluronique peut alors induire la résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques, par l'activation de transporteurs de type ABC (ATP-binding cassette) (Misra *et al.*, 2003). CD44 participerait également à ces mécanismes de résistance (Toole *et al.*, 2008). Un fort taux d'acide hyaluronique peut également, *via* l'activation de CD44, induire un phénomène d'**EMT** (**E**pithelial-**M**esenchymal **T**ransition) conduisant à un phénotype pro-invasif des cellules cancéreuses (Zoltan-Jones *et al.*, 2003). Dans le contexte de nos études, il est possible d'envisager une signalisation en deux temps, comme le modèle proposé par Ellis et ses collaborateurs pour l'interaction CD44 / EGFR (Ellis *et al.*, 2007): Le premier temps consisterait en une activation de la Basigine par un axe NGF / TrkA / CD44 conduisant, dans un second temps, à une signalisation pro-invasive indépendante du NGF dirigée par un axe acide hyaluronique / CD44. Il serait donc intéressant d'évaluer le niveau d'expression des Has après stimulation au NGF et d'apprécier le rôle de l'acide hyaluronique dans notre modèle par des traitements à la hyaluronidase. Ces études pourraient ainsi définir l'acide hyaluronique comme un acteur majeur de la signalisation induite par le NGF et le complexe TrkA / CD44.

3. Applications cliniques

D'un point de vue translationnel, la diversité des voies de signalisation induites par le NGF et conduisant à des effets pro-tumoraux suggère qu'il serait plus efficace d'inhiber les récepteurs plutôt que de cibler directement ces voies. Dans ce cadre, la recherche des déterminants moléculaires de l'interaction TrkA / CD44 pourrait alors définir des cibles thérapeutiques inhibant spécifiquement la formation de ce complexe tout en évitant les phénomènes de résistance. En effet, nous avons montré que l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de TrkA par le Lestaurtinib est insuffisante pour bloquer efficacement la signalisation pro-tumorale induite par le NGF dans les cancers. Dans les cellules exprimant CD44, la résistance au Lestaurtinib s'observe après 3 semaines de culture, suggérant un mécanisme de résistance innée. De plus, les expériences de co-inhibition de TrkA et de CD44 réalisées sur des modèles de xénogreffes en souris SCID soutiennent le fait que CD44 est bien impliqué dans cette résistance. Néanmoins, les modulations thérapeutiques de CD44 et de ses variants (et notamment du variant 6 avec le Bivatuzumab) se sont avérées toxiques chez l'Homme, ce qui a stoppé les essais cliniques de thérapies ciblées (Tijink *et al.*, 2006). Il serait donc utile de développer des thérapies visant à empêcher l'interaction entre CD44 et ses co-récepteurs dans les tumeurs. Dans ce cadre, une approche thérapeutique intéressante serait d'utiliser des petits peptides interférents. Une stratégie visant à bloquer l'interaction de CD44v6 avec c-Met et VEGFR2 est par ailleurs déjà à l'étude (Orian-Rousseau 2010). Dans le cadre de l'axe TrkA / CD44, il serait intéressant de déterminer la présence du complexe dans les tumeurs avec, par exemple, la technique de PLA dont nous avons démontré la spécificité. Ceci dans le but d'optimiser la réponse thérapeutique induite par ces inhibiteurs. En effet, la détermination de ces complexes par PLA en ferait un test compagnon prédictif qui permettrait de cibler uniquement les patients répondeurs. Nos résultats suggèrent également que l'interaction CD44 / TrkA pourrait avoir un rôle pronostique. A ce jour, la seule co-expression de CD44 et de TrkA rapportée se trouve dans les neuroblastomes (Combaret *et al.*, 1997), mais aucune étude de corrélation avec le pronostic ne sous-entend d'association fonctionnelle entre ces deux récepteurs. En effet, les études de corrélation de l'expression de TrkA ou de CD44 avec des critères clinico-pathologiques dans différents cancers n'ont jusqu'à présent apporté que des résultats contradictoires. Ainsi, notre laboratoire a montré que l'expression de TrkA serait associée à un bon pronostic dans le cancer du sein (Descamps *et al.*, 2001), alors que Davidson et ses collaborateurs ont montré qu'une activation de TrkA serait de mauvais pronostic dans le cancer de l'ovaire (Davidson *et al.*, 2003). Pour CD44, les résultats des

études sont tout aussi contrastés et l'interprétation est rendue plus complexe par le manque d'informations exhaustives sur les isoformes exprimées dans les cellules tumorales. La recherche de TrkA en complexe avec CD44 par PLA devrait donc être plus informative car elle renseignerait de la présence d'un complexe fonctionnel. Des résultats préliminaires de marquages PLA obtenus par Romain Lévêque actuellement en Master 2 sur une cohorte de 38 patientes atteintes de cancer du sein tendent à prouver le caractère de mauvais pronostic de l'association TrkA / CD44. L'étude sur une cohorte de patientes plus large va néanmoins être réalisée pour valider ce pouvoir prédictif.

II. Etude des interactomes induits par le proNGF

Au début de ma thèse les travaux du laboratoire avaient mis en évidence que le proNGF induit une signalisation *via* la sortiline et TrkA dans le cancer du sein (Demont *et al.*, 2012). Nous avons en outre caractérisé, par spectrométrie de masse, l'interactome de TrkA induit par le proNGF et mis en évidence l'implication d'un récepteur à activité tyrosine kinase menant à une signalisation pro-tumorale indépendante de la phosphorylation de TrkA (données confidentielles, brevet en cours). De manière complémentaire, j'ai pour ma part, mis en évidence que le proNGF induit la phosphorylation d'un autre récepteur tyrosine kinase non décrit dans la signalisation induite par le proNGF : l'EGFR.

1. Communications croisées entre le proNGF et EGFR

Mes travaux ont pu déterminer que cette phosphorylation a lieu spécifiquement sur le résidu Tyr-1068. Celle-ci a été retrouvée à la fois dans les cellules cancéreuses de sein (adénocarcinome) et dans les cellules cancéreuses des voies aéro-digestives supérieures (carcinome épidermoïde) suggérant un mécanisme fortement conservé. Néanmoins, les mécanismes de trans-phosphorylation de ce récepteur par le proNGF restent à déterminer. La transactivation de l'EGFR est un mécanisme qui a déjà été observé dans d'autres contextes. Certains travaux ont, par exemple, démontré le rôle de la PKC dans la transactivation de ce récepteur (Stewart *et al.*, 2005; He *et al.*, 2008). La kinase p38 semble également pouvoir transactiver l'EGFR, bien que les mécanismes ne soient pas pleinement connus (Cheng *et al.*, 2002). Dans une étude plus récente menée sur des cellules épithéliales bronchiques, il a été décrit que Src était le médiateur responsable d'une transphosphorylation d'EGFR sur les tyrosines 845 et 1068 (Wu *et al.*, 2015). Notre laboratoire ayant déjà décrit l'activation de la voie Src par le proNGF dans le cancer du sein (Demont *et al.*, 2012), il serait intéressant

d'étudier le rôle de cette kinase dans ce mécanisme de transphosphorylation par des approches de siRNA.

La difficulté des études sur les effets du proNGF résulte dans le fait de la pluralité des récepteurs mis en jeu. Ainsi les effets du proNGF ont le plus souvent été associés à l'activation d'un complexe sortiline / p75^{NTR} (Skeldal *et al.*, 2012). Ce complexe est associé à l'induction de la mort cellulaire. Nous avons, pour notre part, démontré qu'il existe également la formation d'un complexe sortiline / TrkA qui est responsable d'une activité pro-tumorale (Demont *et al.*, 2012). Comme évoqué précédemment, le laboratoire a mis en évidence que ce complexe, sortiline / TrkA, permet le recrutement d'un autre récepteur indépendamment de l'activation du domaine kinase de TrkA. Ce dernier permet donc l'échappement aux thérapies dirigées contre TrkA par l'activation d'autres voies de signalisation oncogéniques. Dans mes travaux, j'ai démontré que c'est par la sortiline et non pas par p75^{NTR} ou par TrkA que le proNGF permet la régulation de l'axe EGF / EGFR. Ceci souligne le rôle essentiel de la sortiline dans les communications croisées entre les récepteurs observées après stimulation par le proNGF.

2. Rôle de la tyrosine 1068 de l'EGFR

La tyrosine 1068, dont la phosphorylation est induite par un traitement au proNGF, est située sur la queue C-terminale du récepteur. Elle est responsable de l'induction de nombreuses voies de signalisation différentes. En effet, une fois phosphorylée, cette tyrosine permet le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2 sans le concours de Shc (Batzer *et al.*, 1994). Cette dernière va alors pouvoir recruter la protéine SOS et activer la voie des MAPK (Buday *et al.*, 1993). La tyrosine 1068 phosphorylée peut également, toujours par l'intermédiaire de Grb2, induire l'activation de la voie PI3-K / Akt *via* Gab1. Cependant, dans notre modèle, l'activation des voies Akt et MAPK ne semble pas dépendante d'un axe proNGF / sortiline / EGFR (données non montrées). Enfin, Grb2 peut recruter Cbl pour induire l'internalisation de l'EGFR. Bien que le recrutement de Cbl reste à confirmer, dans notre modèle, le proNGF semble induire l'internalisation de l'EGFR de manière dépendante de la phosphorylation de cette tyrosine 1068 (Jiang *et al.*, 2003). Des techniques d'immunoprécipitations et l'invalidation de Cbl permettrait de confirmer, ou non, son implication. Enfin, la phospho-tyrosine 1068 peut activer STAT3 (Coffer *et al.*, 1995; Shao *et al.*, 2003), signalisation pro-tumorale centrale dans les cancers des VADS (Mali 2015). Cependant l'activation de cette dernière ne semble possible qu'en l'absence de Grb2 sur la

phospho-tyrosine 1068 (Zhang *et al.*, 2003). L'activation de cette signalisation par un axe proNGF / sortiline / EGFR n'est donc pas une piste privilégiée.

3. Applications cliniques

La transphosphorylation de l'EGFR par le proNGF suscite un intérêt clinique particulier. En effet, la surexpression de l'EGFR est impliquée dans de nombreux cancers (Nicholson *et al.*, 2001). La plupart du temps, cette surexpression conduit à une activation anormale du récepteur. Cette activation constitutive, médiée par la trans-autophosphorylation du domaine tyrosine kinase du récepteur, rend les cellules cancéreuses dépendantes des voies de signalisation sous-jacentes au récepteur. C'est le phénomène de dépendance oncogénique. Basés sur ce principe, de nombreux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR ainsi que des anticorps neutralisants empêchant l'activation de l'EGFR ont été développés. Ces thérapies ciblées ont démontré une certaine efficacité thérapeutique. Néanmoins, les résistances aux anti-EGFR sont régulièrement constatées en clinique. Ces résistances sont plus ou moins tardives. Elles peuvent résulter de l'émergence de certains clones cellulaires exprimant un EGFR muté insensible aux inhibiteurs ou ayant développé des mutations activatrices secondaires dans les voies de signalisation sous-jacentes (Kobayashi *et al.*, 2005; Van Emburgh *et al.*, 2014). La formation, dans la population cellulaire résistante au traitement, d'hétérodimères ou de complexes multimériques entre EGFR et d'autres récepteurs permettant des transactivations croisées est également une hypothèse envisagée (Giles *et al.*, 2013). Cette dernière option pourrait être privilégiée dans les cancers comme les cancers du sein ou les cancers des VADS, où les réponses objectives à ces thérapeutiques sont faibles. En effet, elles présument de la présence d'un mécanisme de résistance innée à ces inhibiteurs (Baselga *et al.*, 2005). Les résultats obtenus au cours de ma thèse renforcent également cette hypothèse. Ainsi, le proNGF semble induire la trans-phosphorylation de réseaux de récepteurs à activité tyrosine kinase dont fait partie EGFR, pouvant être à l'origine de résistances aux thérapies ciblées anti-EGFR. Une autre hypothèse, complémentaire, serait que la down-régulation d'EGFR par le proNGF pourrait empêcher la mise en place d'une dépendance oncogénique à ce récepteur, malgré une surexpression de la protéine. Ce mécanisme rendrait les cellules tumorales insensibles aux thérapies ciblées anti-EGFR. Un mécanisme similaire a, par ailleurs, été décrit concernant une résistance au Cétuximab (anti-EGFR) impliquant l'internalisation (et donc la désensibilisation) du récepteur *via* l'ubiquitine ligase Cbl (Lu *et al.*, 2007). Nous avons également observé qu'en retour, l'EGF diminuerait les effets prolifératifs du proNGF. Ainsi les traitements anti-EGFR pourraient

renforcer les effets du proNGF dans les cellules cancéreuses. Il est donc nécessaire, dans le cadre de l'utilisation des inhibiteurs de l'EGFR, de s'assurer que le proNGF n'est pas présent au niveau des tumeurs. Ainsi, tout comme l'axe TrkA / CD44, la détection du proNGF dans les tumeurs avant la mise en place d'une thérapie ciblée pourrait être un test compagnon prédictif de la réponse au traitement. Peu d'études ont, en effet, quantifié l'expression du proNGF dans les tumeurs. Dans le cancer du sein, nous avons néanmoins démontré que le proNGF est exprimé puis sécrété par les cellules tumorales (Demont *et al.*, 2012). D'autres travaux ont permis d'associer l'expression du proNGF par les cellules tumorales et l'envahissement péri-nerveux de certains cancers comme le cancer de la prostate (Pundavela *et al.*, 2014). Enfin, l'expression du proNGF est probablement sous-estimée car, dans de nombreuses pathologies telles que Alzheimer ou encore le diabète, il a été décrit comme étant un médiateur de l'inflammation (Ali *et al.*, 2011; Capsoni *et al.*, 2011). Il est donc fort possible que le proNGF soit également exprimé dans les tumeurs ayant une forte composante inflammatoire.

Enfin, Wheeler et ses collaborateurs ont démontré dans les cancers des VADS que la phosphorylation de la tyrosine 1068 de l'EGFR est un facteur de mauvais pronostic indépendant de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (Wheeler *et al.*, 2012). Il est tout à fait possible que le caractère indépendant de cette phosphorylation soit une conséquence de la stimulation des cellules cancéreuses par le proNGF. Ainsi, le caractère péjoratif de cette phosphorylation peut être lié soit à la perte de la dépendance oncogénique à l'EGFR, soit à la formation d'autres complexes responsables d'effets pro-tumoraux induits par le proNGF comme le complexe sortiline / TrkA. Il serait donc nécessaire de réévaluer ces études de corrélation à la lueur de nos résultats. Pour cela il est possible de corréler la phosphorylation de la tyrosine 1068 avec la formation du complexe sortiline / EGFR dans les tumeurs visualisée par PLA en parallèle de la détection du complexe sortiline / TrkA. Des expériences sur des échantillons tumoraux d'une première cohorte de 40 patients sont actuellement en cours pour confirmer cette hypothèse.

D'autre part, il serait intéressant de rechercher les mécanismes sous-jacents de la down-régulation croisée observée entre le proNGF et l'EGF. Des analyses protéomiques par spectrométrie de masse après immunoprécipitation de l'EGFR dans des cellules cancéreuses stimulées au proNGF sont donc envisagées afin de déterminer quels sont les interactants responsables de ces signalisations croisées.

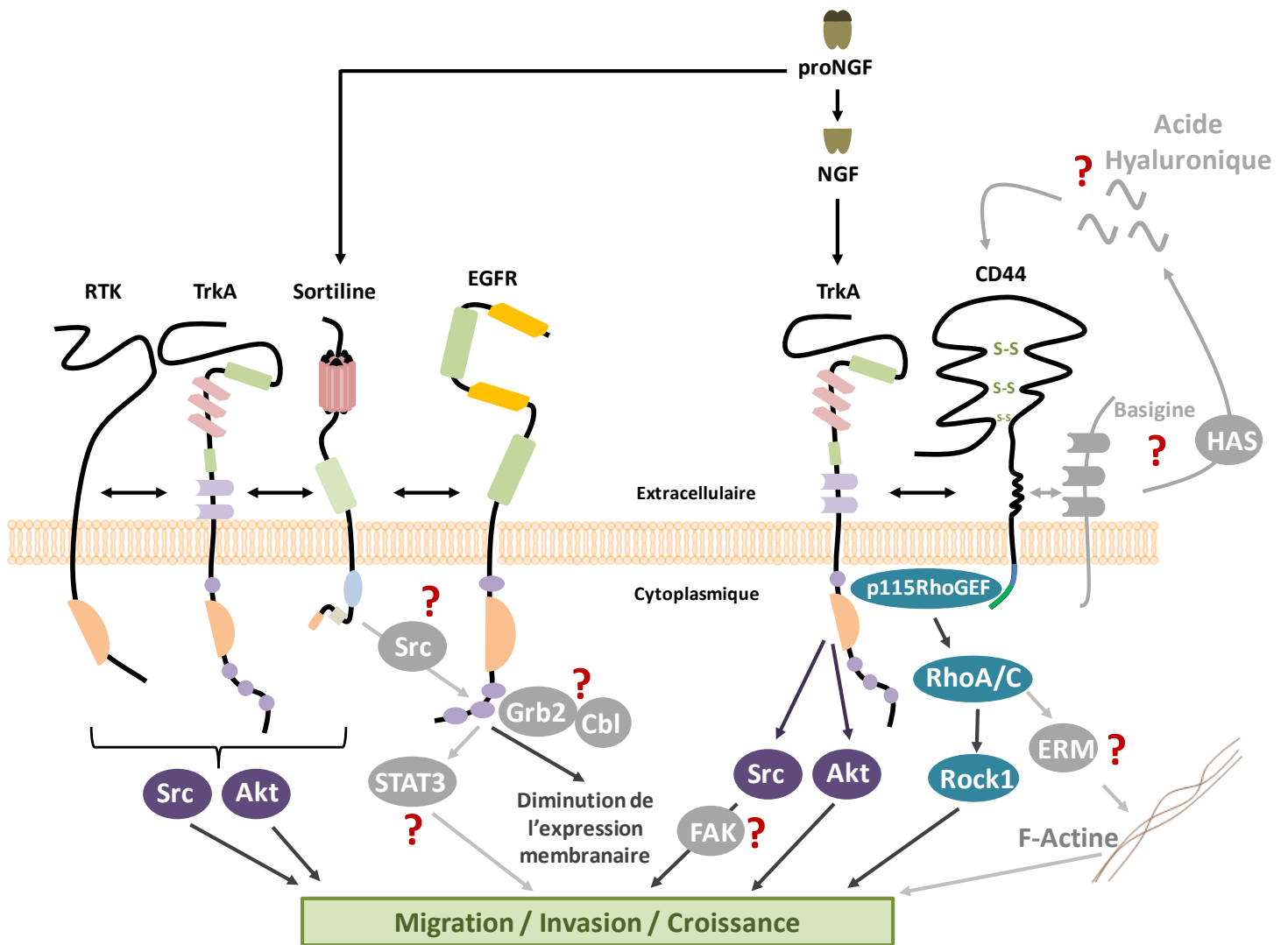


Figure 25 : Schéma récapitulatif des différentes interactions induites par le (pro)NGF et leurs signalisations sous-jacentes.

Associations induites par le (pro)NGF et les signalisations sous-jacentes. Les différentes hypothèses sont représentées en gris. Le proNGF peut induire une interaction entre la sortiline, TrkA et un autre récepteur tyrosine kinase pour activer des cascades de signalisation pro-tumorales. Il peut également favoriser une interaction de la sortiline avec EGFR menant à l'internalisation de ce dernier. Le NGF induit une interaction entre TrkA et CD44. Les activations de Src et d'Akt sont dépendantes de l'activité kinase de TrkA alors que l'activation de la voie des RhoGTPases nécessite la présence de CD44. Les récepteurs disposent de différents domaines fonctionnels extracellulaires (domaine riche en cystéines (vert), riche en leucines (rectangle rouge), Ig-C2 (violet), β -propeller (cylindre rouge), site d'interaction avec le ligand (jaune)), et intracellulaires (site de phosphorylation (rond violet), domaine tyrosine kinase (orange)).

En conclusion, l'ensemble de mes travaux souligne l'importance des interactions croisées entre les récepteurs. La découverte de réseaux de signalisation induits par le NGF et par son précurseur suggère des mécanismes de résistances aux thérapies ciblées anti-cancéreuses jusqu'à présent insoupçonnés. L'identification et le décryptage complet de ces réseaux permettraient de développer de nouveaux tests compagnons prédictifs des réponses aux thérapies ciblées, mais également de développer de nouvelles stratégies de co-inhibition afin de prévenir les rechutes trop fréquemment observées dans cette maladie.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Adams, C. W., D. E. Allison, et al. (2006). "Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab." Cancer Immunol Immunother **55**(6): 717-727.
- Adriaenssens, E., E. Vanhecke, et al. (2008). "Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer." Cancer Res **68**(2): 346-351.
- Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-756.
- Akinleye, A., M. Furqan, et al. (2013). "MEK and the inhibitors: from bench to bedside." J Hematol Oncol **6**: 27.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-3988.
- Al-Shawi, R., A. Hafner, et al. (2008). "Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system." Eur J Neurosci **27**(8): 2103-2114.
- Albanell, J., J. Codony-Servat, et al. (2001). "Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments." Cancer Res **61**(17): 6500-6510.
- Albaugh, P., Y. Fan, et al. (2012). "Discovery of GNF-5837, a Selective TRK Inhibitor with Efficacy in Rodent Cancer Tumor Models." ACS Med Chem Lett **3**(2): 140-145.
- Alderson, R. F., R. Curtis, et al. (2000). "Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro." Brain Res **871**(2): 210-222.
- Alexander, S. and P. Friedl (2012). "Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure." Trends Mol Med **18**(1): 13-26.
- Ali, T. K., M. M. Al-Gayyar, et al. (2011). "Diabetes-induced peroxynitrite impairs the balance of pro-nerve growth factor and nerve growth factor, and causes neurovascular injury." Diabetologia **54**(3): 657-668.
- Allen, J., F. Khwaja, et al. (2005). "The p75NTR mediates a bifurcated signal transduction cascade through the NF kappa B and JNK pathways to inhibit cell survival." Exp Cell Res **304**(1): 69-80.
- Allison, M. (2010). "Turning the tide in lung cancer." Nat Biotechnol **28**(10): 999-1002.
- Ancot, F., B. Foveau, et al. (2009). "Proteolytic cleavages give receptor tyrosine kinases the gift of ubiquity." Oncogene **28**(22): 2185-2195.
- Ang, K. K., B. A. Berkey, et al. (2002). "Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma." Cancer Res **62**(24): 7350-7356.
- Angeletti, R. H. and R. A. Bradshaw (1971). "Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(10): 2417-2420.
- Ardini, E., R. Bosotti, et al. (2014). "The TPM3-NTRK1 rearrangement is a recurring event in colorectal carcinoma and is associated with tumor sensitivity to TRKA kinase inhibition." Mol Oncol **8**(8): 1495-1507.
- Arevalo, J. C., B. Conde, et al. (2000). "TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor." Mol Cell Biol **20**(16): 5908-5916.
- Arevalo, J. C., D. B. Pereira, et al. (2006). "Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **281**(2): 1001-1007.
- Arevalo, J. C., J. Waite, et al. (2006). "Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination." Neuron **50**(4): 549-559.

BIBLIOGRAPHIE

- Arevalo, J. C., H. Yano, et al. (2004). "A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein." *EMBO J* **23**(12): 2358-2368.
- Argiris, A., M. Ghebremichael, et al. (2013). "Phase III randomized, placebo-controlled trial of docetaxel with or without gefitinib in recurrent or metastatic head and neck cancer: an eastern cooperative oncology group trial." *J Clin Oncol* **31**(11): 1405-1414.
- Armugam, A., D. C. Koh, et al. (2012). "Pro-domain in precursor nerve growth factor mediates cell death." *Neurochem Int* **60**(8): 852-863.
- Arpaia, E., H. Blaser, et al. (2012). "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* **31**(7): 884-896.
- Arpin, M., D. Chirivino, et al. (2011). "Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration." *Cell Adh Migr* **5**(2): 199-206.
- Arrighi, N., S. Bodei, et al. (2010). "Nerve growth factor signaling in prostate health and disease." *Growth Factors* **28**(3): 191-201.
- Aruffo, A., I. Stamenkovic, et al. (1990). "CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate." *Cell* **61**(7): 1303-1313.
- Aswini, Y. B. (2009). "The genomics of oral cancer and wound healing." *J Indian Soc Pedod Prev Dent* **27**(1): 2-5.
- Aubert, L., M. Guilbert, et al. (2015). "NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib." *Oncotarget* **6**(12): 9807-9819.
- Aurikko, J. P., B. T. Ruotolo, et al. (2005). "Characterization of symmetric complexes of nerve growth factor and the ectodomain of the pan-neurotrophin receptor, p75NTR." *J Biol Chem* **280**(39): 33453-33460.
- Bachelot, T., J. A. Garcia-Saenz, et al. (2014). "Sunitinib in combination with trastuzumab for the treatment of advanced breast cancer: activity and safety results from a phase II study." *BMC Cancer* **14**: 166.
- Bachman, K. E., P. Argani, et al. (2004). "The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers." *Cancer Biol Ther* **3**(8): 772-775.
- Baldwin, A. N. and E. M. Shooter (1995). "Zone mapping of the binding domain of the rat low affinity nerve growth factor receptor by the introduction of novel N-glycosylation sites." *J Biol Chem* **270**(9): 4594-4602.
- Barde, Y. A. (1994). "Neurotrophic factors: an evolutionary perspective." *J Neurobiol* **25**(11): 1329-1333.
- Barde, Y. A., D. Edgar, et al. (1982). "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain." *EMBO J* **1**(5): 549-553.
- Barker, P. A. (2007). "High affinity not in the vicinity?" *Neuron* **53**(1): 1-4.
- Barker, P. A., G. Barbee, et al. (1994). "The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279." *J Biol Chem* **269**(48): 30645-30650.
- Barker, P. A., C. Lomen-Hoerth, et al. (1993). "Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor." *J Biol Chem* **268**(20): 15150-15157.
- Barker, P. A. and E. M. Shooter (1994). "Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells." *Neuron* **13**(1): 203-215.
- Barnes, C. J., K. Ohshiro, et al. (2007). "Insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in head and neck cancer." *Clin Cancer Res* **13**(14): 4291-4299.
- Bartholomeusz, C., A. M. Gonzalez-Angulo, et al. (2012). "High ERK protein expression levels correlate with shorter survival in triple-negative breast cancer patients." *Oncologist* **17**(6): 766-774.
- Baselga, J., J. Albanell, et al. (2005). "Phase II and tumor pharmacodynamic study of gefitinib in patients with advanced breast cancer." *J Clin Oncol* **23**(23): 5323-5333.

BIBLIOGRAPHIE

- Baselga, J., I. Bradbury, et al. (2012). "Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial." Lancet **379**(9816): 633-640.
- Baselga, J., M. Campone, et al. (2012). "Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer." N Engl J Med **366**(6): 520-529.
- Baselga, J., F. Costa, et al. (2013). "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., P. Gomez, et al. (2013). "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." J Clin Oncol **31**(20): 2586-2592.
- Batzer, A. G., D. Rotin, et al. (1994). "Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor." Mol Cell Biol **14**(8): 5192-5201.
- Bazley, L. A. and W. J. Gullick (2005). "The epidermal growth factor receptor family." Endocr Relat Cancer **12 Suppl 1**: S17-27.
- Bazzola, L., C. Foroni, et al. (2015). "Combination of letrozole, metronomic cyclophosphamide and sorafenib is well-tolerated and shows activity in patients with primary breast cancer." Br J Cancer **112**(1): 52-60.
- Beattie, E. C., C. L. Howe, et al. (2000). "NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking." J Neurosci **20**(19): 7325-7333.
- Beattie, M. S., A. W. Harrington, et al. (2002). "ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury." Neuron **36**(3): 375-386.
- Belrose, J. C., R. Masoudi, et al. (2014). "Increased pro-nerve growth factor and decreased brain-derived neurotrophic factor in non-Alzheimer's disease tauopathies." Neurobiol Aging **35**(4): 926-933.
- Benedetti, M., A. Levi, et al. (1993). "Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(16): 7859-7863.
- Bennett, C., I. M. Paterson, et al. (1989). "Expression of growth factor and epidermal growth factor receptor encoded transcripts in human gastric tissues." Cancer Res **49**(8): 2104-2111.
- Bennett, K. L., D. G. Jackson, et al. (1995). "CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor." J Cell Biol **128**(4): 687-698.
- Berkemeier, L. R., J. W. Winslow, et al. (1991). "Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB." Neuron **7**(5): 857-866.
- Berns, K., H. M. Horlings, et al. (2007). "A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer." Cancer Cell **12**(4): 395-402.
- Berx, G. and F. Van Roy (2001). "The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression." Breast Cancer Res **3**(5): 289-293.
- Bibel, M., E. Hoppe, et al. (1999). "Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR." EMBO J **18**(3): 616-622.
- Bierl, M. A., E. E. Jones, et al. (2005). "'Mature' nerve growth factor is a minor species in most peripheral tissues." Neurosci Lett **380**(1-2): 133-137.
- Bilderback, T. R., V. R. Gazula, et al. (2001). "Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways." J Neurochem **76**(5): 1540-1551.
- Bilderback, T. R., V. R. Gazula, et al. (1999). "Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways." J Biol Chem **274**(1): 257-263.

BIBLIOGRAPHIE

- Bilderback, T. R., R. J. Grigsby, et al. (1997). "Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae." J Biol Chem **272**(16): 10922-10927.
- Birge, R. B., C. Kalodimos, et al. (2009). "Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling." Cell Commun Signal **7**: 13.
- Blackwell, K. L., H. J. Burstein, et al. (2010). "Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer." J Clin Oncol **28**(7): 1124-1130.
- Blobel, C. P. (2005). "ADAMs: key components in EGFR signalling and development." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 32-43.
- Bloch, A., L. Blumenstein, et al. (2004). "Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75." Eur J Neurosci **20**(9): 2321-2335.
- Bloom, A. P., J. M. Jimenez-Andrade, et al. (2011). "Breast cancer-induced bone remodeling, skeletal pain, and sprouting of sensory nerve fibers." J Pain **12**(6): 698-711.
- Bloom, H. J. and W. W. Richardson (1957). "Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years." Br J Cancer **11**(3): 359-377.
- Blot, W. J., W. H. Chow, et al. (1997). "Wood dust and nasal cancer risk. A review of the evidence from North America." J Occup Environ Med **39**(2): 148-156.
- Boldin, M. P., E. E. Varfolomeev, et al. (1995). "A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain." J Biol Chem **270**(14): 7795-7798.
- Bonnetterre, V., E. Deschamps, et al. (2007). "Sino-nasal cancer and exposure to leather dust." Occup Med (Lond) **57**(6): 438-443.
- Bosco, E. E. and E. S. Knudsen (2007). "RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis and treatment." Cell Cycle **6**(6): 667-671.
- Bose, C. K. (2005). "Role of nerve growth factor and FSH receptor in epithelial ovarian cancer." Reprod Biomed Online **11**(2): 194-197.
- Boulbes, D. R., G. B. Chauhan, et al. (2015). "CD44 expression contributes to trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat **151**(3): 501-513.
- Bourguignon, L. Y. (2008). "Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression." Semin Cancer Biol **18**(4): 251-259.
- Bourguignon, L. Y., K. Peyrollier, et al. (2008). "Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells." J Biol Chem **283**(25): 17635-17651.
- Bourguignon, L. Y., P. A. Singleton, et al. (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." J Biol Chem **278**(32): 29420-29434.
- Bourguignon, L. Y., G. Wong, et al. (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." J Biol Chem **285**(47): 36721-36735.
- Bourguignon, L. Y., H. Zhu, et al. (1999). "Rho-kinase (ROK) promotes CD44v(3,8-10)-ankyrin interaction and tumor cell migration in metastatic breast cancer cells." Cell Motil Cytoskeleton **43**(4): 269-287.
- Bourguignon, L. Y., H. Zhu, et al. (2001). "Hyaluronan promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185(HER2) and induces Rac1 and Ras signaling during ovarian tumor cell migration and growth." J Biol Chem **276**(52): 48679-48692.
- Brennan, C., K. Rivas-Plata, et al. (1999). "The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons in vivo." Nat Neurosci **2**(8): 699-705.

BIBLIOGRAPHIE

- Bresnahan, P. A., R. Leduc, et al. (1990). "Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo." *J Cell Biol* **111**(6 Pt 2): 2851-2859.
- Breuzza, L., M. Garcia, et al. (2002). "Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells." *Exp Cell Res* **273**(2): 178-186.
- Brown, M. S., J. Ye, et al. (2000). "Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans." *Cell* **100**(4): 391-398.
- Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-868.
- Bruno, M. A. and A. C. Cuello (2006). "Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6735-6740.
- Buchanan, F. G., D. L. Gorden, et al. (2006). "Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1492-1497.
- Buday, L. and J. Downward (1993). "Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor." *Cell* **73**(3): 611-620.
- Burris, H. A., 3rd, J. Tibbitts, et al. (2011). "Trastuzumab emtansine (T-DM1): a novel agent for targeting HER2+ breast cancer." *Clin Breast Cancer* **11**(5): 275-282.
- Burtness, B., J. P. Bourhis, et al. (2014). "Afinib versus placebo as adjuvant therapy after chemoradiation in a double-blind, phase III study (LUX-Head & Neck 2) in patients with primary unresected, clinically intermediate-to-high-risk head and neck cancer: study protocol for a randomized controlled trial." *Trials* **15**: 469.
- Butowt, R. and C. S. von Bartheld (2009). "Fates of neurotrophins after retrograde axonal transport: phosphorylation of p75NTR is a sorting signal for delayed degradation." *J Neurosci* **29**(34): 10715-10729.
- Butte, M. J., P. K. Hwang, et al. (1998). "Crystal structure of neurotrophin-3 homodimer shows distinct regions are used to bind its receptors." *Biochemistry* **37**(48): 16846-16852.
- Butti, M. G., I. Bongarzone, et al. (1995). "A sequence analysis of the genomic regions involved in the rearrangements between TPM3 and NTRK1 genes producing TRK oncogenes in papillary thyroid carcinomas." *Genomics* **28**(1): 15-24.
- Cabrera, N., E. Diaz-Rodriguez, et al. (1996). "TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment." *J Cell Biol* **132**(3): 427-436.
- Cameron, D., M. Casey, 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 Res Treat* **112**(3): 533-543.
- Campagnolo, L., G. Costanza, et al. (2014). "Sortilin expression is essential for pro-nerve growth factor-induced apoptosis of rat vascular smooth muscle cells." *PLoS One* **9**(1): e84969.
- Campane, M., I. Bondarenko, 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." *Ann Oncol* **23**(3): 610-617.
- Campos, X., Y. Munoz, et al. (2007). "Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer." *Gynecol Oncol* **104**(1): 168-175.
- Canuel, M., N. Bhattacharyya, et al. (2009). "Sortilin and prosaposin localize to detergent-resistant membrane microdomains." *Exp Cell Res* **315**(2): 240-247.
- Canuel, M., S. Lefrancois, et al. (2008). "AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes." *Biochem Biophys Res Commun* **366**(3): 724-730.

BIBLIOGRAPHIE

- Cao, X. X., J. D. Xu, et al. (2011). "RACK1 promotes breast carcinoma migration/metastasis via activation of the RhoA/Rho kinase pathway." *Breast Cancer Res Treat* **126**(3): 555-563.
- Capsoni, S., R. Brandi, et al. (2011). "A dual mechanism linking NGF/proNGF imbalance and early inflammation to Alzheimer's disease neurodegeneration in the AD11 anti-NGF mouse model." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **10**(5): 635-647.
- Cardoso, F., L. Van't Veer, et al. (2008). "Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial." *J Clin Oncol* **26**(5): 729-735.
- Carey, L. A., H. S. Rugo, et al. (2012). "TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer." *J Clin Oncol* **30**(21): 2615-2623.
- Carpenter, G., L. King, Jr., et al. (1978). "Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro." *Nature* **276**(5686): 409-410.
- Casaccia-Bonnet, P., B. D. Carter, et al. (1996). "Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75." *Nature* **383**(6602): 716-719.
- Castren, E., H. Thoenen, et al. (1995). "Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus." *Neuroscience* **64**(1): 71-80.
- Ceccatelli, S., P. Ernfors, et al. (1991). "Expanded distribution of mRNA for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the rat brain after colchicine treatment." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10352-10356.
- Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." *Nat Rev Neurosci* **4**(4): 299-309.
- Chao, M. V., M. A. Bothwell, et al. (1986). "Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor." *Science* **232**(4749): 518-521.
- Chari, R. V. (2008). "Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs." *Acc Chem Res* **41**(1): 98-107.
- Chen, B., R. T. Bronson, et al. (2000). "Mice mutant for Egfr and Shp2 have defective cardiac semilunar valvulogenesis." *Nat Genet* **24**(3): 296-299.
- Chen, J., C. X. Tian, et al. (2014). "Efficacy and Safety Profile of Combining Sorafenib with Chemotherapy in Patients with HER2-Negative Advanced Breast Cancer: A Meta-analysis." *J Breast Cancer* **17**(1): 61-68.
- Chen, Z., L. D. Ke, et al. (2000). "Correlation of cisplatin sensitivity with differential alteration of EGFR expression in head and neck cancer cells." *Anticancer Res* **20**(2A): 899-902.
- Chen, Z. Y., A. Ieraci, et al. (2005). "A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors." *Mol Biol Cell* **16**(12): 5761-5772.
- Chen, Z. Y., A. Ieraci, et al. (2005). "Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway." *J Neurosci* **25**(26): 6156-6166.
- Cheng, H., J. Kartenbeck, et al. (2002). "Stress kinase p38 mediates EGFR transactivation by hyperosmolar concentrations of sorbitol." *J Cell Physiol* **192**(2): 234-243.
- Cheung, Z. H. and N. Y. Ip (2009). "Endophilin B1: Guarding the gate to destruction." *Commun Integr Biol* **2**(2): 130-132.
- Chiaromello, A., K. Neuman, et al. (1995). "Helix-loop-helix transcription factors mediate activation and repression of the p75LNGFR gene." *Mol Cell Biol* **15**(11): 6036-6044.
- Choong, N. W., M. Kozloff, et al. (2010). "Phase II study of sunitinib malate in head and neck squamous cell carcinoma." *Invest New Drugs* **28**(5): 677-683.
- Chuan, Y. C., S. T. Pang, et al. (2006). "Androgen induction of prostate cancer cell invasion is mediated by ezrin." *J Biol Chem* **281**(40): 29938-29948.
- Clary, D. O. and L. F. Reichardt (1994). "An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23): 11133-11137.

BIBLIOGRAPHIE

- Clewes, O., M. S. Fahey, et al. (2008). "Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin." *J Neurochem* **107**(4): 1124-1135.
- Clump, D. A., J. E. Bauman, et al. (2015). "Cancer of the Oropharynx." *Surg Oncol Clin N Am* **24**(3): 509-520.
- Coffer, P. J. and W. Kruijer (1995). "EGF receptor deletions define a region specifically mediating STAT transcription factor activation." *Biochem Biophys Res Commun* **210**(1): 74-81.
- Cohen, R. B. (2014). "Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)- and ErbB family-targeted agents in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)." *Cancer Treat Rev* **40**(4): 567-577.
- Cohen, S., R. Levi-Montalcini, et al. (1954). "A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcoma as 37 and 180." *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**(10): 1014-1018.
- Collins, C., M. A. Carducci, et al. (2007). "Preclinical and clinical studies with the multi-kinase inhibitor CEP-701 as treatment for prostate cancer demonstrate the inadequacy of PSA response as a primary endpoint." *Cancer Biol Ther* **6**(9): 1360-1367.
- Colombo, P. E., F. Milanezi, et al. (2011). "Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction." *Breast Cancer Res* **13**(3): 212.
- Com, E., C. Lagadec, et al. (2007). "Nerve growth factor receptor TrkA signaling in breast cancer cells involves Ku70 to prevent apoptosis." *Mol Cell Proteomics* **6**(11): 1842-1854.
- Combaret, V., N. Gross, et al. (1997). "Clinical relevance of TRKA expression on neuroblastoma: comparison with N-MYC amplification and CD44 expression." *Br J Cancer* **75**(8): 1151-1155.
- Corbit, K. C., D. A. Foster, et al. (1999). "Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells." *Mol Cell Biol* **19**(6): 4209-4218.
- Cordon-Cardo, C., P. Tapley, et al. (1991). "The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3." *Cell* **66**(1): 173-183.
- Corkery, B., J. Crown, et al. (2009). "Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer." *Ann Oncol* **20**(5): 862-867.
- Coulson, E. J., K. Reid, et al. (2000). "Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death." *J Biol Chem* **275**(39): 30537-30545.
- Covaceuszach, S., P. V. Konarev, et al. (2015). "The conundrum of the high-affinity NGF binding site formation unveiled?" *Biophys J* **108**(3): 687-697.
- Creancier, L., I. Vandenberghe, et al. (2015). "Chromosomal rearrangements involving the NTRK1 gene in colorectal carcinoma." *Cancer Lett*.
- Crowley, C., S. D. Spencer, et al. (1994). "Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons." *Cell* **76**(6): 1001-1011.
- Crown, J., J. O'Shaughnessy, et al. (2012). "Emerging targeted therapies in triple-negative breast cancer." *Ann Oncol* **23 Suppl 6**: vi56-65.
- Crown, J. P., V. Dieras, 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." *J Clin Oncol* **31**(23): 2870-2878.
- Cunningham, M. E., R. M. Stephens, et al. (1997). "Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor." *J Biol Chem* **272**(16): 10957-10967.
- Curtis, C., S. P. Shah, et al. (2012). "The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups." *Nature* **486**(7403): 346-352.
- Curtis, J. and S. Finkbeiner (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." *J Neurosci Res* **58**(1): 88-95.

BIBLIOGRAPHIE

- Dang, C., Y. Zhang, et al. (2006). "Expression of nerve growth factor receptors is correlated with progression and prognosis of human pancreatic cancer." *J Gastroenterol Hepatol* **21**(5): 850-858.
- Dassonville, O., J. L. Formento, et al. (1993). "Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer." *J Clin Oncol* **11**(10): 1873-1878.
- Datta, S. R., H. Dudek, et al. (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." *Cell* **91**(2): 231-241.
- Daubisse-Marliac, L., P. Delafosse, et al. (2011). "Breast cancer incidence and time trend in France from 1990 to 2007: a population-based study from two French cancer registries." *Ann Oncol* **22**(2): 329-334.
- Davidson, B., R. Reich, et al. (2004). "Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma." *Breast Cancer Res Treat* **83**(2): 119-128.
- Davidson, B., R. Reich, et al. (2003). "Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma." *Clin Cancer Res* **9**(6): 2248-2259.
- Dawson, S. J., O. M. Rueda, et al. (2013). "A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications." *EMBO J* **32**(5): 617-628.
- De Luca, A., M. R. Maiello, et al. (2012). "The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches." *Expert Opin Ther Targets* **16 Suppl 2**: S17-27.
- Deak, M., A. D. Clifton, et al. (1998). "Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB." *EMBO J* **17**(15): 4426-4441.
- Dechant, G. and Y. A. Barde (1997). "Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR." *Curr Opin Neurobiol* **7**(3): 413-418.
- Delcroix, J. D., J. S. Valletta, et al. (2003). "NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals." *Neuron* **39**(1): 69-84.
- Delsite, R. and D. Djakiew (1996). "Anti-proliferative effect of the kinase inhibitor K252a on human prostatic carcinoma cell lines." *J Androl* **17**(5): 481-490.
- Delsite, R. and D. Djakiew (1999). "Characterization of nerve growth factor precursor protein expression by human prostate stromal cells: a role in selective neurotrophin stimulation of prostate epithelial cell growth." *Prostate* **41**(1): 39-48.
- Demont, Y., C. Corbet, et al. (2012). "Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein." *J Biol Chem* **287**(3): 1923-1931.
- Descamps, S., X. Lebourhis, et al. (1998). "Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells." *J Biol Chem* **273**(27): 16659-16662.
- Descamps, S., V. Pawlowski, et al. (2001). "Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer." *Cancer Res* **61**(11): 4337-4340.
- Descamps, S., R. A. Toillon, et al. (2001). "Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways." *J Biol Chem* **276**(21): 17864-17870.
- Diaz, L. A., Jr., R. T. Williams, et al. (2012). "The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers." *Nature* **486**(7404): 537-540.
- Dikic, I., A. G. Batzer, et al. (1995). "Shc binding to nerve growth factor receptor is mediated by the phosphotyrosine interaction domain." *J Biol Chem* **270**(25): 15125-15129.
- Dionne, C. A., A. M. Camoratto, et al. (1998). "Cell cycle-independent death of prostate adenocarcinoma is induced by the trk tyrosine kinase inhibitor CEP-751 (KT6587)." *Clin Cancer Res* **4**(8): 1887-1898.
- Djakiew, D. (1992). "Role of nerve growth factor-like protein in the paracrine regulation of prostate growth." *J Androl* **13**(6): 476-487.

BIBLIOGRAPHIE

- Djakiew, D., B. R. Pflug, et al. (1993). "Chemotaxis and chemokinesis of human prostate tumor cell lines in response to human prostate stromal cell secretory proteins containing a nerve growth factor-like protein." *Cancer Res* **53**(6): 1416-1420.
- Dobrowsky, R. T., M. H. Werner, et al. (1994). "Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor." *Science* **265**(5178): 1596-1599.
- Dolle, L., E. Adriaenssens, et al. (2004). "Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer." *Curr Cancer Drug Targets* **4**(6): 463-470.
- Dolle, L., I. El Yazidi-Belkoura, et al. (2003). "Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells." *Oncogene* **22**(36): 5592-5601.
- Domeniconi, M., B. L. Hempstead, et al. (2007). "Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death." *Mol Cell Neurosci* **34**(2): 271-279.
- Donnerer, J., R. Schuligoi, et al. (1992). "Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo." *Neuroscience* **49**(3): 693-698.
- Dubus, P., M. Parrens, et al. (2000). "Identification of novel trkA variants with deletions in leucine-rich motifs of the extracellular domain." *J Neuroimmunol* **107**(1): 42-49.
- Duffy, M. J., P. M. McGowan, et al. (2012). "Targeted therapy for triple-negative breast cancer: where are we?" *Int J Cancer* **131**(11): 2471-2477.
- Eccles, S. A. (2011). "The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology." *Int J Dev Biol* **55**(7-9): 685-696.
- Eibl, J. K., B. C. Strasser, et al. (2012). "Structural, biological, and pharmacological strategies for the inhibition of nerve growth factor." *Neurochem Int* **61**(8): 1266-1275.
- El Yazidi-Belkoura, I., E. Adriaenssens, et al. (2003). "Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells." *J Biol Chem* **278**(19): 16952-16956.
- Elkabes, S., C. F. Dreyfus, et al. (1994). "Embryonic sensory development: local expression of neurotrophin-3 and target expression of nerve growth factor." *J Comp Neurol* **341**(2): 204-213.
- Ellis, I. R., A. M. Schor, et al. (2007). "EGF AND TGF-alpha motogenic activities are mediated by the EGF receptor via distinct matrix-dependent mechanisms." *Exp Cell Res* **313**(4): 732-741.
- Elser, C., L. L. Siu, et al. (2007). "Phase II trial of sorafenib in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or nasopharyngeal carcinoma." *J Clin Oncol* **25**(24): 3766-3773.
- Engelman, J. A. (2009). "Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations." *Nat Rev Cancer* **9**(8): 550-562.
- Ernfors, P., C. Wetmore, et al. (1990). "Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family." *Neuron* **5**(4): 511-526.
- Esposito, D., P. Patel, et al. (2001). "The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor." *J Biol Chem* **276**(35): 32687-32695.
- Fahnestock, M., B. Michalski, et al. (2001). "The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease." *Mol Cell Neurosci* **18**(2): 210-220.
- Fahnestock, M., G. Yu, et al. (2004). "The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor." *J Neurochem* **89**(3): 581-592.
- Fang, L., Z. Berekati, et al. (2011). "Targeted therapy in breast cancer: what's new?" *Swiss Med Wkly* **141**: w13231.
- Farmer, P., H. Bonnefoi, et al. (2005). "Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis." *Oncogene* **24**(29): 4660-4671.

BIBLIOGRAPHIE

- Faux, C., M. Hawadle, et al. (2007). "PTPsigma binds and dephosphorylates neurotrophin receptors and can suppress NGF-dependent neurite outgrowth from sensory neurons." Biochim Biophys Acta **1773**(11): 1689-1700.
- Fehon, R. G., A. I. McClatchey, et al. (2010). "Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(4): 276-287.
- Feller, L., R. Chandran, et al. (2013). "Alcohol and oral squamous cell carcinoma." SADJ **68**(4): 176-180.
- Feng, D., T. Kim, et al. (2010). "Molecular and structural insight into proNGF engagement of p75NTR and sortilin." J Mol Biol **396**(4): 967-984.
- Festuccia, C., G. L. Gravina, et al. (2009). "Her2 crosstalks with TrkA in a subset of prostate cancer cells: rationale for a guided dual treatment." Prostate **69**(4): 337-345.
- Festuccia, C., P. Muzi, et al. (2007). "Tyrosine kinase inhibitor CEP-701 blocks the NTRK1/NGF receptor and limits the invasive capability of prostate cancer cells in vitro." Int J Oncol **30**(1): 193-200.
- Finn, R. S., C. Bengala, et al. (2011). "Dasatinib as a single agent in triple-negative breast cancer: results of an open-label phase 2 study." Clin Cancer Res **17**(21): 6905-6913.
- Foehr, E. D., X. Lin, et al. (2000). "NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells." J Neurosci **20**(20): 7556-7563.
- Fornier, M. N., P. G. Morris, et al. (2011). "A phase I study of dasatinib and weekly paclitaxel for metastatic breast cancer." Ann Oncol **22**(12): 2575-2581.
- Franken, N. A., H. M. Rodermond, et al. (2006). "Clonogenic assay of cells in vitro." Nat Protoc **1**(5): 2315-2319.
- Friedman, W. J. and L. A. Greene (1999). "Neurotrophin signaling via Trks and p75." Exp Cell Res **253**(1): 131-142.
- Friedman, W. J., L. Olson, et al. (1991). "Cells that Express Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA in the Developing Postnatal Rat Brain." Eur J Neurosci **3**(7): 688-697.
- Fury, M. G., H. Xiao, et al. (2015). "A phase II trial of bevacizumab + cetuximab + cisplatin with concurrent intensity modulated radiation therapy (IMRT) for patients with stage III/IVB head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)." Head Neck.
- Gaese, F., R. Kolbeck, et al. (1994). "Sensory ganglia require neurotrophin-3 early in development." Development **120**(6): 1613-1619.
- Galer, C. E., C. L. Corey, et al. (2011). "Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor I: reduction of angiogenesis and tumor growth in cutaneous squamous cell carcinoma." Head Neck **33**(2): 189-198.
- Gall, C. M., S. J. Gold, et al. (1992). "Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs are expressed in ventral midbrain regions containing dopaminergic neurons." Mol Cell Neurosci **3**(1): 56-63.
- Gallatin, W. M., I. L. Weissman, et al. (1983). "A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes." Nature **304**(5921): 30-34.
- Gargano, N., A. Levi, et al. (1997). "Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA receptors." J Neurosci Res **50**(1): 1-12.
- Garrett, J. T. and C. L. Arteaga (2011). "Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications." Cancer Biol Ther **11**(9): 793-800.
- George, D. J., C. A. Dionne, et al. (1999). "Sustained in vivo regression of Dunning H rat prostate cancers treated with combinations of androgen ablation and Trk tyrosine kinase inhibitors, CEP-751 (KT-6587) or CEP-701 (KT-5555)." Cancer Res **59**(10): 2395-2401.
- Geyer, C. E., J. Forster, et al. (2006). "Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer." N Engl J Med **355**(26): 2733-2743.

BIBLIOGRAPHIE

- Ghilardi, J. R., K. T. Freeman, et al. (2010). "Administration of a tropomyosin receptor kinase inhibitor attenuates sarcoma-induced nerve sprouting, neuroma formation and bone cancer pain." Mol Pain **6**: 87.
- Giles, K. M., F. C. Kalinowski, et al. (2013). "Axl mediates acquired resistance of head and neck cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib." Mol Cancer Ther **12**(11): 2541-2558.
- Gillett, C., V. Fantl, et al. (1994). "Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining." Cancer Res **54**(7): 1812-1817.
- Gillies, R. J., D. Verduzco, et al. (2012). "Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work." Nat Rev Cancer **12**(7): 487-493.
- Goldhirsch, A., W. C. Wood, et al. (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." Ann Oncol **22**(8): 1736-1747.
- Gong, Y., P. Cao, et al. (2008). "Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex." Nature **454**(7205): 789-793.
- Gonzalez-Angulo, A. M., A. Akcakanat, 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 women with triple receptor-negative breast cancer." Ann Oncol **25**(6): 1122-1127.
- Goretzki, P. E., R. A. Wahl, et al. (1987). "Nerve growth factor (NGF) sensitizes human medullary thyroid carcinoma (hMTC) cells for cytostatic therapy in vitro." Surgery **102**(6): 1035-1042.
- Goyal, L., M. D. Muzumdar, et al. (2013). "Targeting the HGF/c-MET pathway in hepatocellular carcinoma." Clin Cancer Res **19**(9): 2310-2318.
- Grandis, J. R., S. D. Drenning, et al. (2000). "Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4227-4232.
- Grandis, J. R. and D. J. Tweardy (1993). "Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer." Cancer Res **53**(15): 3579-3584.
- Grandis, R. J., D. J. Tweardy, et al. (1998). "Asynchronous modulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor protein expression in progression of premalignant lesions to head and neck squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **4**(1): 13-20.
- Grimes, M. L., J. Zhou, et al. (1996). "Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes." J Neurosci **16**(24): 7950-7964.
- Grunwald, V., U. Keilholz, et al. (2015). "TEMHEAD: a single-arm multicentre phase II study of temsirolimus in platin- and cetuximab refractory recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) of the German SCCHN Group (AIO)." Ann Oncol **26**(3): 561-567.
- Guarino, M. (2010). "Src signaling in cancer invasion." J Cell Physiol **223**(1): 14-26.
- Guengerich, F. P. and T. Shimada (1998). "Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes." Mutat Res **400**(1-2): 201-213.
- Guilluy, C., R. Garcia-Mata, et al. (2011). "Rho protein crosstalk: another social network?" Trends Cell Biol **21**(12): 718-726.
- Guiton, M., F. J. Gunn-Moore, et al. (1995). "Naturally occurring tyrosine kinase inserts block high affinity binding of phospholipase C gamma and Shc to TrkC and neurotrophin-3 signaling." J Biol Chem **270**(35): 20384-20390.
- Gupta, A. K., W. G. McKenna, et al. (2002). "Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction." Clin Cancer Res **8**(3): 885-892.
- Gusenbauer, S., P. Vlaicu, et al. (2013). "HGF induces novel EGFR functions involved in resistance formation to tyrosine kinase inhibitors." Oncogene **32**(33): 3846-3856.

BIBLIOGRAPHIE

- Guthrie, K. M. and C. M. Gall (1991). "Differential expression of mRNAs for the NGF family of neurotrophic factors in the adult rat central olfactory system." *J Comp Neurol* **313**(1): 95-102.
- Haapasalo, A., E. Koponen, et al. (2001). "Truncated trkB.T1 is dominant negative inhibitor of trkB.TK+-mediated cell survival." *Biochem Biophys Res Commun* **280**(5): 1352-1358.
- Hagag, N., S. Halegoua, et al. (1986). "Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21." *Nature* **319**(6055): 680-682.
- Hahn, W. C. and R. A. Weinberg (2002). "Modelling the molecular circuitry of cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(5): 331-341.
- Hallbook, F. (1999). "Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families." *Curr Opin Neurobiol* **9**(5): 616-621.
- Hallbook, F., C. F. Ibanez, et al. (1991). "Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary." *Neuron* **6**(5): 845-858.
- Hamanoue, M., G. Middleton, et al. (1999). "p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor." *Mol Cell Neurosci* **14**(1): 28-40.
- Hampe, W., M. Rezaoui, et al. (2001). "The genes for the human VPS10 domain-containing receptors are large and contain many small exons." *Hum Genet* **108**(6): 529-536.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hansen, L. A., N. Alexander, et al. (1997). "Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development." *Am J Pathol* **150**(6): 1959-1975.
- Haraldsdottir, S. and T. Bekaii-Saab (2013). "Integrating anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer." *J Gastrointest Oncol* **4**(3): 285-298.
- Harbeck, N., M. W. Beckmann, et al. (2013). "HER2 Dimerization Inhibitor Pertuzumab - Mode of Action and Clinical Data in Breast Cancer." *Breast Care (Basel)* **8**(1): 49-55.
- Harmer, M. (1958). "The British clinical staging of breast cancer." *Br Med J* **1**(5073): 767-769.
- Harrington, K. J., I. A. El-Hariry, et al. (2009). "Phase I study of lapatinib in combination with chemoradiation in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck." *J Clin Oncol* **27**(7): 1100-1107.
- Harris, L., H. Fritsche, et al. (2007). "American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer." *J Clin Oncol* **25**(33): 5287-5312.
- Hartmann, A., H. Blaszyk, et al. (1997). "The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer." *Trends Genet* **13**(1): 27-33.
- Hasan, W., T. Pedchenko, et al. (2003). "Sympathetic neurons synthesize and secrete pro-nerve growth factor protein." *J Neurobiol* **57**(1): 38-53.
- Hassiotou, F. and D. Geddes (2013). "Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge." *Clin Anat* **26**(1): 29-48.
- Hauburger, A., M. Kliemann, et al. (2007). "Oxidative folding of nerve growth factor can be mediated by the pro-peptide of neurotrophin-3." *FEBS Lett* **581**(22): 4159-4164.
- He, D., V. Natarajan, et al. (2008). "Lysophosphatidic acid-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E(2) release via C/EBPbeta in human bronchial epithelial cells." *Biochem J* **412**(1): 153-162.
- Head, J. and S. R. Johnston (2004). "New targets for therapy in breast cancer: farnesyltransferase inhibitors." *Breast Cancer Res* **6**(6): 262-268.
- Hempstead, B. L., D. Martin-Zanca, et al. (1991). "High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor." *Nature* **350**(6320): 678-683.
- Henderson, C. E., W. Camu, et al. (1993). "Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud." *Nature* **363**(6426): 266-270.

BIBLIOGRAPHIE

- Herrera-Gayol, A. and S. Jothy (1999). "Adhesion proteins in the biology of breast cancer: contribution of CD44." *Exp Mol Pathol* **66**(2): 149-156.
- Herrero, R., X. Castellsague, et al. (2003). "Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study." *J Natl Cancer Inst* **95**(23): 1772-1783.
- Herrup, K. and E. M. Shooter (1973). "Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(12): 3884-3888.
- Higuchi, H., T. Yamashita, et al. (2003). "PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts." *EMBO J* **22**(8): 1790-1800.
- Hirsch, F. R., M. Varella-Garcia, et al. (2003). "Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis." *J Clin Oncol* **21**(20): 3798-3807.
- Hochgrafe, F., L. Zhang, et al. (2010). "Tyrosine phosphorylation profiling reveals the signaling network characteristics of Basal breast cancer cells." *Cancer Res* **70**(22): 9391-9401.
- Hoek, K. S., N. C. Schlegel, et al. (2008). "Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy." *Pigment Cell Melanoma Res* **21**(6): 665-676.
- Hohn, A., J. Leibrock, et al. (1990). "Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family." *Nature* **344**(6264): 339-341.
- Holgado-Madruga, M., D. K. Moscatello, et al. (1997). "Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12419-12424.
- Holz, M. S., A. Janning, et al. (2013). "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* **12**(2): 173-183.
- Hsu, H. W., R. de Necochea-Campion, et al. (2014). "Linifanib (ABT-869), enhances cytotoxicity with poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, veliparib (ABT-888), in head and neck carcinoma cells." *Oral Oncol* **50**(7): 662-669.
- Hu, Z., C. Fan, et al. (2006). "The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms." *BMC Genomics* **7**: 96.
- Huber, L. J. and M. V. Chao (1995). "A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation." *J Neurosci Res* **40**(4): 557-563.
- Ip, N. Y., C. F. Ibanez, et al. (1992). "Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7): 3060-3064.
- Irie, S., T. Hachiya, et al. (1999). "Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation." *FEBS Lett* **460**(2): 191-198.
- Iulita, M. F., S. Do Carmo, et al. (2014). "Nerve growth factor metabolic dysfunction in Down's syndrome brains." *Brain* **137**(Pt 3): 860-872.
- Ivanisevic, L., W. Zheng, et al. (2007). "TrkA receptor "hot spots" for binding of NT-3 as a heterologous ligand." *J Biol Chem* **282**(23): 16754-16763.
- Jadhav, T., T. Geetha, et al. (2008). "Identification of a consensus site for TRAF6/p62 polyubiquitination." *Biochem Biophys Res Commun* **371**(3): 521-524.
- Jalas, J. R., S. S. Hecht, et al. (2005). "Cytochrome P450 enzymes as catalysts of metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco specific carcinogen." *Chem Res Toxicol* **18**(2): 95-110.
- Jemal, A., F. Bray, et al. (2011). "Global cancer statistics." *CA Cancer J Clin* **61**(2): 69-90.
- Jiang, X., F. Huang, et al. (2003). "Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits." *Mol Biol Cell* **14**(3): 858-870.
- Johnson, D., A. Lanahan, et al. (1986). "Expression and structure of the human NGF receptor." *Cell* **47**(4): 545-554.
- Johnson, E. M., Jr., P. D. Gorin, et al. (1980). "Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure in utero to maternal antibody to nerve growth factor." *Science* **210**(4472): 916-918.

BIBLIOGRAPHIE

- Jones, K. R. and L. F. Reichardt (1990). "Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(20): 8060-8064.
- Jullien, J., V. Guili, et al. (2003). "Trafficking of TrkA-green fluorescent protein chimerae during nerve growth factor-induced differentiation." J Biol Chem **278**(10): 8706-8716.
- Jung, K. M., S. Tan, et al. (2003). "Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor." J Biol Chem **278**(43): 42161-42169.
- Junttila, T. T., R. W. Akita, 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**(5): 429-440.
- Kalcheim, C., C. Carmeli, et al. (1992). "Neurotrophin 3 is a mitogen for cultured neural crest cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1661-1665.
- Kalcheim, C. and M. Gendreau (1988). "Brain-derived neurotrophic factor stimulates survival and neuronal differentiation in cultured avian neural crest." Brain Res **469**(1-2): 79-86.
- Kalyankrishna, S. and J. R. Grandis (2006). "Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer." J Clin Oncol **24**(17): 2666-2672.
- Kanning, K. C., M. Hudson, et al. (2003). "Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability." J Neurosci **23**(13): 5425-5436.
- Kao, S., R. K. Jaiswal, et al. (2001). "Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells." J Biol Chem **276**(21): 18169-18177.
- Keely, P. J., E. V. Rusyn, et al. (1999). "R-Ras signals through specific integrin alpha cytoplasmic domains to promote migration and invasion of breast epithelial cells." J Cell Biol **145**(5): 1077-1088.
- Kenchappa, R. S., N. Zampieri, et al. (2006). "Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons." Neuron **50**(2): 219-232.
- Khursigara, G., J. Bertin, et al. (2001). "A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2." J Neurosci **21**(16): 5854-5863.
- Khwaja, F., A. Tabassum, et al. (2006). "The p75(NTR) tumor suppressor induces cell cycle arrest facilitating caspase mediated apoptosis in prostate tumor cells." Biochem Biophys Res Commun **341**(4): 1184-1192.
- Kim, H. S., H. J. Kwon, et al. (2015). "Phase II clinical and exploratory biomarker study of dacomitinib in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of head and neck." Clin Cancer Res **21**(3): 544-552.
- Kim, M. J., E. Kim, et al. (2000). "The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation." Exp Mol Med **32**(3): 101-109.
- Kim, T. and B. L. Hempstead (2009). "NRH2 is a trafficking switch to regulate sortilin localization and permit proneurotrophin-induced cell death." EMBO J **28**(11): 1612-1623.
- Kim, Y., Y. S. Lee, et al. (2008). "CD44-epidermal growth factor receptor interaction mediates hyaluronic acid-promoted cell motility by activating protein kinase C signaling involving Akt, Rac1, Phox, reactive oxygen species, focal adhesion kinase, and MMP-2." J Biol Chem **283**(33): 22513-22528.
- Kimura, M. T., S. Irie, et al. (2001). "14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction." J Biol Chem **276**(20): 17291-17300.
- Kinoshita, J., K. Kitamura, et al. (2001). "Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **66**(2): 159-164.
- Klein, R., S. Q. Jing, et al. (1991). "The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor." Cell **65**(1): 189-197.

BIBLIOGRAPHIE

- Klein, R., F. Lamballe, et al. (1992). "The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4." Neuron **8**(5): 947-956.
- Klein, R., V. Nanduri, et al. (1991). "The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3." Cell **66**(2): 395-403.
- Klein, R., L. F. Parada, et al. (1989). "trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development." EMBO J **8**(12): 3701-3709.
- Kliemann, M., R. Golbik, et al. (2007). "The pro-peptide of proNGF: structure formation and intramolecular association with NGF." Protein Sci **16**(3): 411-419.
- Kliemann, M., A. Rattenholl, et al. (2004). "The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide." FEBS Lett **566**(1-3): 207-212.
- Knowles, L. M., L. P. Stabile, et al. (2009). "HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer." Clin Cancer Res **15**(11): 3740-3750.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-823.
- Kobayashi, S., T. J. Boggon, et al. (2005). "EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib." N Engl J Med **352**(8): 786-792.
- Kogner, P., G. Barbany, et al. (1993). "Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis." Cancer Res **53**(9): 2044-2050.
- Kolokythas, A., D. P. Cox, et al. (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**(6): 1290-1295.
- Kong, H., J. Boulter, et al. (2001). "An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors." J Neurosci **21**(1): 176-185.
- Korhonen, J. M., F. A. Said, et al. (1999). "Gab1 mediates neurite outgrowth, DNA synthesis, and survival in PC12 cells." J Biol Chem **274**(52): 37307-37314.
- Korobova, F. and T. Svitkina (2008). "Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells." Mol Biol Cell **19**(4): 1561-1574.
- Korsching, S., G. Auburger, et al. (1985). "Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation." EMBO J **4**(6): 1389-1393.
- Korte, M., P. Carroll, et al. (1995). "Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8856-8860.
- Kouniavsky, G. and M. A. Zeiger (2010). "Thyroid tumorigenesis and molecular markers in thyroid cancer." Curr Opin Oncol **22**(1): 23-29.
- Kozasa, T., X. Jiang, et al. (1998). "p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13." Science **280**(5372): 2109-2111.
- Kramer, K., N. K. Cheung, et al. (1997). "Correlation of MYCN amplification, Trk-A and CD44 expression with clinical stage in 250 patients with neuroblastoma." Eur J Cancer **33**(12): 2098-2100.
- Kruser, T. J., D. L. Wheeler, et al. (2010). "Augmentation of radiation response by motesanib, a multikinase inhibitor that targets vascular endothelial growth factor receptors." Clin Cancer Res **16**(14): 3639-3647.
- Kucera, J., G. Fan, et al. (1995). "Dependence of developing group Ia afferents on neurotrophin-3." J Comp Neurol **363**(2): 307-320.
- Kumar, V. and B. A. Mahal (2012). "NGF - the TrkA to successful pain treatment." J Pain Res **5**: 279-287.
- Kuruvilla, R., L. S. Zweifel, et al. (2004). "A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling." Cell **118**(2): 243-255.

BIBLIOGRAPHIE

- Lacey, J. V., Jr., A. R. Kreimer, 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., D. J. Belliveau, et al. (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**(3): 861-871.
- Lad, S. P., D. A. Peterson, et al. (2003). "Individual and combined effects of TrkA and p75NTR nerve growth factor receptors. A role for the high affinity receptor site." J Biol Chem **278**(27): 24808-24817.
- Lagadec, C., S. Meignan, et al. (2009). "TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells." Oncogene **28**(18): 1960-1970.
- Lagadec, C., R. Romon, et al. (2010). "Ku86 is important for TrkA overexpression-induced breast cancer cell invasion." Proteomics Clin Appl **4**(6-7): 580-590.
- Lamballe, F., R. Klein, et al. (1991). "trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3." Cell **66**(5): 967-979.
- Landi, S. (2000). "Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review." Mutat Res **463**(3): 247-283.
- Lange, C. A. and D. Yee (2011). "Killing the second messenger: targeting loss of cell cycle control in endocrine-resistant breast cancer." Endocr Relat Cancer **18**(4): C19-24.
- Large, T. H., G. Weskamp, et al. (1989). "Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system." Neuron **2**(2): 1123-1134.
- Larsen, J. V., M. Hansen, et al. (2010). "Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer." Mol Cell Biol **30**(17): 4175-4187.
- Lauring, J., B. H. Park, et al. (2013). "The phosphoinositide-3-kinase-Akt-mTOR pathway as a therapeutic target in breast cancer." J Natl Compr Canc Netw **11**(6): 670-678.
- Lauterborn, J. C., P. J. Isackson, et al. (1991). "Nerve growth factor mRNA-containing cells are distributed within regions of cholinergic neurons in the rat basal forebrain." J Comp Neurol **306**(3): 439-446.
- Lauterborn, J. C., P. J. Isackson, et al. (1994). "Cellular localization of NGF and NT-3 mRNAs in postnatal rat forebrain." Mol Cell Neurosci **5**(1): 46-62.
- Lee, F. S. and M. V. Chao (2001). "Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3555-3560.
- Lee, F. S., R. Rajagopal, et al. (2002). "Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors." Cytokine Growth Factor Rev **13**(1): 11-17.
- Lee, F. S., R. Rajagopal, et al. (2002). "Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides." J Biol Chem **277**(11): 9096-9102.
- Lee, R., P. Kermani, et al. (2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." Science **294**(5548): 1945-1948.
- Lee, Y. C., P. Boffetta, et al. (2008). "Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **17**(8): 1974-1981.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **141**(7): 1117-1134.
- Levi-Montalcini, R. and V. Hamburger (1951). "Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo." J Exp Zool **116**(2): 321-361.
- Lewin, G. R. and L. M. Mendell (1993). "Nerve growth factor and nociception." Trends Neurosci **16**(9): 353-359.
- Lewin, G. R., A. Rueff, et al. (1994). "Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia." Eur J Neurosci **6**(12): 1903-1912.

BIBLIOGRAPHIE

- Li, J., Z. J. Liu, et al. (2007). "Regulatory module network of basic/helix-loop-helix transcription factors in mouse brain." Genome Biol **8**(11): R244.
- Li, Q. Q., W. J. Wang, et al. (2007). "Up-regulation of CD147 and matrix metalloproteinase-2, -9 induced by P-glycoprotein substrates in multidrug resistant breast cancer cells." Cancer Sci **98**(11): 1767-1774.
- Li, Y., T. Zhang, et al. (2009). "New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential." Drug Resist Updat **12**(1-2): 17-27.
- Liedtke, C. and L. Kiesel (2012). "Breast cancer molecular subtypes--modern therapeutic concepts for targeted therapy of a heterogeneous entity." Maturitas **73**(4): 288-294.
- Liepinsh, E., L. L. Ilag, et al. (1997). "NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor." EMBO J **16**(16): 4999-5005.
- Limaye, S., S. Riley, et al. (2013). "A randomized phase II study of docetaxel with or without vandetanib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN)." Oral Oncol **49**(8): 835-841.
- Lin, B. Z., P. F. Pilch, et al. (1997). "Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles." J Biol Chem **272**(39): 24145-24147.
- Lin, D. C., C. Quevedo, et al. (2006). "APPL1 associates with TrkA and GIPC1 and is required for nerve growth factor-mediated signal transduction." Mol Cell Biol **26**(23): 8928-8941.
- Linderholm, B. K., H. Hellborg, 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." Ann Oncol **20**(10): 1639-1646.
- Liska, D., C. T. Chen, et al. (2011). "HGF rescues colorectal cancer cells from EGFR inhibition via MET activation." Clin Cancer Res **17**(3): 472-482.
- Liu, Y., H. Chen, et al. (2015). "Molecular mechanisms of ethanol-associated oro-esophageal squamous cell carcinoma." Cancer Lett **361**(2): 164-173.
- Lobo, N. A., Y. Shimono, et al. (2007). "The biology of cancer stem cells." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 675-699.
- Lohi, O., A. Poussu, et al. (2002). "VHS domain -- a longshoreman of vesicle lines." FEBS Lett **513**(1): 19-23.
- Lokeshwar, V. B., N. Fregien, et al. (1994). "Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function." J Cell Biol **126**(4): 1099-1109.
- Lonze, B. E. and D. D. Ginty (2002). "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system." Neuron **35**(4): 605-623.
- Lopes, C. F., B. B. de Angelis, et al. (2012). "Concomitant consumption of marijuana, alcohol and tobacco in oral squamous cell carcinoma development and progression: recent advances and challenges." Arch Oral Biol **57**(8): 1026-1033.
- Louderbough, J. M. and J. A. Schroeder (2011). "Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression." Mol Cancer Res **9**(12): 1573-1586.
- Lozano-Ondoua, A. N., A. M. Symons-Liguori, et al. (2013). "Cancer-induced bone pain: Mechanisms and models." Neurosci Lett **557 Pt A**: 52-59.
- Lu, B., P. T. Pang, et al. (2005). "The yin and yang of neurotrophin action." Nat Rev Neurosci **6**(8): 603-614.
- Lu, Y., X. Li, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) ubiquitination as a mechanism of acquired resistance escaping treatment by the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab." Cancer Res **67**(17): 8240-8247.
- Luetke, N. C., H. K. Phillips, et al. (1994). "The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase." Genes Dev **8**(4): 399-413.
- Ma, W. Y., E. Murata, et al. (2010). "A synthetic cell-penetrating peptide antagonizing TrkA function suppresses neuropathic pain in mice." J Pharmacol Sci **114**(1): 79-84.
- Machiels, J. P., S. Subramanian, et al. (2011). "Zalutumumab plus best supportive care versus best supportive care alone in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of

BIBLIOGRAPHIE

- the head and neck after failure of platinum-based chemotherapy: an open-label, randomised phase 3 trial." Lancet Oncol **12**(4): 333-343.
- Macias, H. and L. Hinck (2012). "Mammary gland development." Wiley Interdiscip Rev Dev Biol **1**(4): 533-557.
- Mackey, J., K. Gelmon, 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." Clin Breast Cancer **9**(4): 258-261.
- Magne, N., C. Chargari, et al. (2010). "[Mechanisms of resistance to molecular targeted therapies in breast cancer: update and future]." Bull Cancer **97**(3): 385-395.
- Mahadeo, D., L. Kaplan, et al. (1994). "High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors." J Biol Chem **269**(9): 6884-6891.
- Maisonpierre, P. C., L. Belluscio, et al. (1990). "NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression." Neuron **5**(4): 501-509.
- Maisonpierre, P. C., L. Belluscio, et al. (1990). "Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF." Science **247**(4949 Pt 1): 1446-1451.
- Maisonpierre, P. C., M. M. Le Beau, et al. (1991). "Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations." Genomics **10**(3): 558-568.
- Makkerh, J. P., C. Ceni, et al. (2005). "p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation." EMBO Rep **6**(10): 936-941.
- Mali, S. B. (2015). "Review of STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) in head and neck cancer." Oral Oncol **51**(6): 565-569.
- Mamidipudi, V., C. Lin, et al. (2004). "Regulation of interleukin receptor-associated kinase (IRAK) phosphorylation and signaling by iota protein kinase C." J Biol Chem **279**(6): 4161-4165.
- Mansell, J., I. J. Monypenny, et al. (2009). "Patterns and predictors of early recurrence in postmenopausal women with estrogen receptor-positive early breast cancer." Breast Cancer Res Treat **117**(1): 91-98.
- Marchesi, F., L. Piemonti, et al. (2010). "Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis." Cytokine Growth Factor Rev **21**(1): 77-82.
- Marieb, E. A., A. Zoltan-Jones, et al. (2004). "Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production." Cancer Res **64**(4): 1229-1232.
- Marone, R., V. Cmiljanovic, et al. (2008). "Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy." Biochim Biophys Acta **1784**(1): 159-185.
- Marsh, H. N., C. I. Dubreuil, et al. (2003). "SHP-1 negatively regulates neuronal survival by functioning as a TrkA phosphatase." J Cell Biol **163**(5): 999-1010.
- Marshall, J. L., H. Kindler, et al. (2005). "Phase I trial of orally administered CEP-701, a novel neurotrophin receptor-linked tyrosine kinase inhibitor." Invest New Drugs **23**(1): 31-37.
- Martin-Zanca, D., S. H. Hughes, et al. (1986). "A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences." Nature **319**(6056): 743-748.
- Martin-Zanca, D., R. Oskam, et al. (1989). "Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene." Mol Cell Biol **9**(1): 24-33.
- Martin, S., E. Dicou, et al. (2005). "Neurotensin and the neurotensin receptor-3 in microglial cells." J Neurosci Res **81**(3): 322-326.
- Martin, S., J. P. Vincent, et al. (2003). "Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia." J Neurosci **23**(4): 1198-1205.
- Martin, T. A., G. Harrison, et al. (2003). "The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis." Crit Rev Oncol Hematol **46**(2): 165-186.

BIBLIOGRAPHIE

- Martins, R. G., U. Parvathaneni, et al. (2013). "Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial." J Clin Oncol **31**(11): 1415-1421.
- Martoglio, B. (2003). "Intramembrane proteolysis and post-targeting functions of signal peptides." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1243-1247.
- Masoudi, R., M. S. Ioannou, et al. (2009). "Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors." J Biol Chem **284**(27): 18424-18433.
- Massarelli, E., H. Lin, et al. (2015). "Phase II trial of everolimus and erlotinib in patients with platinum-resistant recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma." Ann Oncol.
- Mates, M., G. G. Fletcher, et al. (2015). "Systemic targeted therapy for her2-positive early female breast cancer: a systematic review of the evidence for the 2014 Cancer Care Ontario systemic therapy guideline." Curr Oncol **22**(Suppl 1): S114-122.
- Matsui, T., M. Maeda, et al. (1998). "Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association." J Cell Biol **140**(3): 647-657.
- Matsui, T., S. Yonemura, et al. (1999). "Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidyl-inositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases." Curr Biol **9**(21): 1259-1262.
- Matsuura, S., K. Shinmura, et al. (2013). "CD74-ROS1 fusion transcripts in resected non-small cell lung carcinoma." Oncol Rep **30**(4): 1675-1680.
- Matzke, A., P. Herrlich, et al. (2005). "A five-amino-acid peptide blocks Met- and Ron-dependent cell migration." Cancer Res **65**(14): 6105-6110.
- Matzke, A., V. Sargsyan, et al. (2007). "Haploinsufficiency of c-Met in cd44^{-/-} mice identifies a collaboration of CD44 and c-Met in vivo." Mol Cell Biol **27**(24): 8797-8806.
- Mayer, E. L. and I. E. Krop (2010). "Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies." Clin Cancer Res **16**(14): 3526-3532.
- Mazella, J. (2001). "Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking?" Cell Signal **13**(1): 1-6.
- Mazella, J., N. Zsurger, et al. (1998). "The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor." J Biol Chem **273**(41): 26273-26276.
- Mazzoni, I. E., F. A. Said, et al. (1999). "Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway." J Neurosci **19**(22): 9716-9727.
- McAllister, A. K., L. C. Katz, et al. (1999). "Neurotrophins and synaptic plasticity." Annu Rev Neurosci **22**: 295-318.
- McCarthy, C. and E. Walker (2014). "Tropomyosin receptor kinase inhibitors: a patent update 2009 - 2013." Expert Opin Ther Pat **24**(7): 731-744.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, 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**(10): 1068-1111.
- McDonald, N. Q. and W. A. Hendrickson (1993). "A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif." Cell **73**(3): 421-424.
- McDonald, N. Q., R. Lapatto, et al. (1991). "New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor." Nature **354**(6352): 411-414.
- McFarlane, S., J. A. Coulter, et al. (2015). "CD44 increases the efficiency of distant metastasis of breast cancer." Oncotarget **6**(13): 11465-11476.
- McGregor, L. M., S. B. Baylin, et al. (1994). "Molecular cloning of the cDNA for human TrkC (NTRK3), chromosomal assignment, and evidence for a splice variant." Genomics **22**(2): 267-272.
- McKelvey, L., G. D. Shorten, et al. (2013). "Nerve growth factor-mediated regulation of pain signalling and proposed new intervention strategies in clinical pain management." J Neurochem **124**(3): 276-289.

BIBLIOGRAPHIE

- McVeigh, T. P., L. M. Hughes, et al. (2014). "The impact of Oncotype DX testing on breast cancer management and chemotherapy prescribing patterns in a tertiary referral centre." Eur J Cancer **50**(16): 2763-2770.
- Melck, D., L. De Petrocellis, et al. (2000). "Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation." Endocrinology **141**(1): 118-126.
- Mellor, H. R., A. R. Bell, et al. (2011). "Cardiotoxicity associated with targeting kinase pathways in cancer." Toxicol Sci **120**(1): 14-32.
- Metsis, M. (2001). "Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation." Cell Mol Life Sci **58**(8): 1014-1020.
- Metsis, M., T. Timmusk, et al. (1992). "Regulatory elements and transcriptional regulation by testosterone and retinoic acid of the rat nerve growth factor receptor promoter." Gene **121**(2): 247-254.
- Mijatovic, T., P. Gailly, et al. (2007). "Neurotensin is a versatile modulator of in vitro human pancreatic ductal adenocarcinoma cell (PDAC) migration." Cell Oncol **29**(4): 315-326.
- Miki, Y., J. Swensen, et al. (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." Science **266**(5182): 66-71.
- Miknyoczki, S. J., H. Chang, et al. (1999). "The Trk tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits significant antitumor efficacy in preclinical xenograft models of human pancreatic ductal adenocarcinoma." Clin Cancer Res **5**(8): 2205-2212.
- Miknyoczki, S. J., A. J. Klein-Szanto, et al. (1996). "Neurotrophin-Trk receptor interactions in neoplasia: a possible role in interstitial and perineural invasion in ductal pancreatic cancer." Crit Rev Oncog **7**(1-2): 89-100.
- Miknyoczki, S. J., W. Wan, et al. (2002). "The neurotrophin-trk receptor axes are critical for the growth and progression of human prostatic carcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts in nude mice." Clin Cancer Res **8**(6): 1924-1931.
- Miranda Romero, P. and R. Marin Gil (2015). "Trastuzumab emtansine in locally advanced or metastatic HER2 positive breast cancer; GENESIS-SEFH drug evaluation report." Farm Hosp **39**(n03): 171-175.
- Mirnics, Z. K., C. Yan, et al. (2005). "P75 neurotrophin receptor regulates expression of neural cell adhesion molecule 1." Neurobiol Dis **20**(3): 969-985.
- Misra, S., S. Ghatak, et al. (2003). "Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan." J Biol Chem **278**(28): 25285-25288.
- Modi, S., A. Stopeck, 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." Clin Cancer Res **17**(15): 5132-5139.
- Mohamed, A., K. Krajewski, et al. (2013). "Targeted therapy for breast cancer." Am J Pathol **183**(4): 1096-1112.
- Molloy, N. H., D. E. Read, et al. (2011). "Nerve growth factor in cancer cell death and survival." Cancers (Basel) **3**(1): 510-530.
- Montano, X. (2009). "Repression of SHP-1 expression by p53 leads to trkA tyrosine phosphorylation and suppression of breast cancer cell proliferation." Oncogene **28**(43): 3787-3800.
- Moreno-Aspitia, A. (2010). "Clinical overview of sorafenib in breast cancer." Future Oncol **6**(5): 655-663.
- Morinville, A., S. Martin, et al. (2004). "Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells." Int J Biochem Cell Biol **36**(11): 2153-2168.
- Munck Petersen, C., M. S. Nielsen, et al. (1999). "Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding." EMBO J **18**(3): 595-604.
- Murai, T., T. Miyauchi, et al. (2006). "Epidermal growth factor-regulated activation of Rac GTPase enhances CD44 cleavage by metalloproteinase disintegrin ADAM10." Biochem J **395**(1): 65-71.

BIBLIOGRAPHIE

- Musumeci, G., P. Castrogiovanni, et al. (2015). "Mammary gland: From embryogenesis to adult life." Acta Histochem.
- Nahta, R. and F. J. Esteva (2007). "Trastuzumab: triumphs and tribulations." Oncogene **26**(25): 3637-3643.
- Nahta, R. and R. M. O'Regan (2010). "Evolving strategies for overcoming resistance to HER2-directed therapy: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway." Clin Breast Cancer **10 Suppl 3**: S72-78.
- Nakagawara, A., M. Arima-Nakagawara, et al. (1993). "Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma." N Engl J Med **328**(12): 847-854.
- Nakagawara, A., M. Arima, et al. (1992). "Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas." Cancer Res **52**(5): 1364-1368.
- Nakagawara, A., C. G. Azar, et al. (1994). "Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas." Mol Cell Biol **14**(1): 759-767.
- Nakagawara, A. and G. M. Brodeur (1997). "Role of neurotrophins and their receptors in human neuroblastomas: a primary culture study." Eur J Cancer **33**(12): 2050-2053.
- Nalbandian, A. and D. Djakiew (2006). "The p75(NTR) metastasis suppressor inhibits urokinase plasminogen activator, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in PC-3 prostate cancer cells." Clin Exp Metastasis **23**(2): 107-116.
- Naor, D., R. V. Sionov, et al. (1997). "CD44: structure, function, and association with the malignant process." Adv Cancer Res **71**: 241-319.
- Naor, D., S. B. Wallach-Dayana, et al. (2008). "Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination." Semin Cancer Biol **18**(4): 260-267.
- Naveilhan, P., I. Neveu, et al. (1996). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of the low-affinity neurotrophin receptor." Brain Res Mol Brain Res **41**(1-2): 259-268.
- Nicholson, R. I., J. M. Gee, et al. (2001). "EGFR and cancer prognosis." Eur J Cancer **37 Suppl 4**: S9-15.
- Nielsen, M. S., C. Gustafsen, et al. (2007). "Sorting by the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein binding receptor SorLA." Mol Cell Biol **27**(19): 6842-6851.
- Nielsen, M. S., C. Jacobsen, et al. (1999). "Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase." J Biol Chem **274**(13): 8832-8836.
- Nielsen, M. S., P. Madsen, et al. (2001). "The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein." EMBO J **20**(9): 2180-2190.
- Nielsen, T. O., F. D. Hsu, et al. (2004). "Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma." Clin Cancer Res **10**(16): 5367-5374.
- Nilsson, S. K., S. Christensen, et al. (2008). "Endocytosis of apolipoprotein A-V by members of the low density lipoprotein receptor and the VPS10p domain receptor families." J Biol Chem **283**(38): 25920-25927.
- Nimnual, A. S., B. A. Yatsula, et al. (1998). "Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos." Science **279**(5350): 560-563.
- Nkondjock, A. and P. Ghadirian (2005). "Associated nutritional risk of breast and colon cancers: a population-based case-control study in Montreal, Canada." Cancer Lett **223**(1): 85-91.
- Nkondjock, A. and P. Ghadirian (2005). "[Risk factors and risk reduction of breast cancer]." Med Sci (Paris) **21**(2): 175-180.
- Normanno, N., A. Morabito, et al. (2009). "Target-based therapies in breast cancer: current status and future perspectives." Endocr Relat Cancer **16**(3): 675-702.
- Nykjaer, A., R. Lee, et al. (2004). "Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death." Nature **427**(6977): 843-848.
- Nykjaer, A. and T. E. Willnow (2012). "Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function." Trends Neurosci **35**(4): 261-270.
- Nykjaer, A., T. E. Willnow, et al. (2005). "p75NTR--live or let die." Curr Opin Neurobiol **15**(1): 49-57.
- Obermeier, A., R. A. Bradshaw, et al. (1994). "Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma." EMBO J **13**(7): 1585-1590.

BIBLIOGRAPHIE

- Obermeier, A., H. Halfter, et al. (1993). "Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction." *EMBO J* **12**(3): 933-941.
- Obermeier, A., R. Lammers, et al. (1993). "Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex." *J Biol Chem* **268**(31): 22963-22966.
- Odegaard, E., A. C. Staff, et al. (2007). "The activated nerve growth factor receptor p-TrkA is selectively expressed in advanced-stage ovarian carcinoma." *Hum Pathol* **38**(1): 140-146.
- Ohira, K., K. Shimizu, et al. (2005). "Differential expression of the truncated TrkB receptor, T1, in the primary motor and prefrontal cortices of the adult macaque monkey." *Neurosci Lett* **385**(2): 105-109.
- Ohmichi, M., S. J. Decker, et al. (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**(4): 769-777.
- Ohrt, T., A. Mancini, et al. (2004). "c-Cbl binds to tyrosine-phosphorylated neurotrophin receptor p75 and induces its ubiquitination." *Cell Signal* **16**(11): 1291-1298.
- Okada, Y., G. Eibl, et al. (2004). "Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells." *Clin Exp Metastasis* **21**(4): 285-292.
- Okamoto, I., Y. Kawano, et al. (1999). "CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration." *Oncogene* **18**(7): 1435-1446.
- Olayioye, M. A., R. M. Neve, et al. (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." *EMBO J* **19**(13): 3159-3167.
- Olsson, E., G. Honeth, et al. (2011). "CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers." *BMC Cancer* **11**: 418.
- Ongkeko, W. M., X. Altuna, et al. (2005). "Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas." *Am J Clin Pathol* **124**(1): 71-76.
- Orian-Rousseau, V. (2010). "CD44, a therapeutic target for metastasising tumours." *Eur J Cancer* **46**(7): 1271-1277.
- Orian-Rousseau, V., L. Chen, et al. (2002). "CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling." *Genes Dev* **16**(23): 3074-3086.
- Orian-Rousseau, V., H. Morrison, et al. (2007). "Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin." *Mol Biol Cell* **18**(1): 76-83.
- Orian-Rousseau, V. and H. Ponta (2008). "Adhesion proteins meet receptors: a common theme?" *Adv Cancer Res* **101**: 63-92.
- Paez Pereda, M., C. Missale, et al. (2000). "Nerve growth factor and retinoic acid inhibit proliferation and invasion in thyroid tumor cells." *Mol Cell Endocrinol* **167**(1-2): 99-106.
- Paget-Bailly, S., D. Cyr, et al. (2012). "Occupational exposures to asbestos, polycyclic aromatic hydrocarbons and solvents, and cancers of the oral cavity and pharynx: a quantitative literature review." *Int Arch Occup Environ Health* **85**(4): 341-351.
- Paiardini, A. and V. Caputo (2008). "Insights into the interaction of sortilin with proneurotrophins: a computational approach." *Neuropeptides* **42**(2): 205-214.
- Palko, M. E., V. Coppola, et al. (1999). "Evidence for a role of truncated trkC receptor isoforms in mouse development." *J Neurosci* **19**(2): 775-782.
- Paoletti, F., S. Covaceuszach, et al. (2009). "Intrinsic structural disorder of mouse proNGF." *Proteins* **75**(4): 990-1009.
- Paoletti, F., F. Malerba, et al. (2011). "Conformational plasticity of proNGF." *PLoS One* **6**(7): e22615.
- Papatsoris, A. G., D. Liolitsa, et al. (2007). "Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer." *Expert Opin Investig Drugs* **16**(3): 303-309.
- Pazyra-Murphy, M. F., A. Hans, et al. (2009). "A retrograde neuronal survival response: target-derived neurotrophins regulate MEF2D and bcl-w." *J Neurosci* **29**(20): 6700-6709.
- Peach, R. J., D. Hollenbaugh, et al. (1993). "Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44." *J Cell Biol* **122**(1): 257-264.

BIBLIOGRAPHIE

- Pearson, J., E. M. Johnson, et al. (1983). "Effects of antibodies to nerve growth factor on intrauterine development of derivatives of cranial neural crest and placode in the guinea pig." Dev Biol **96**(1): 32-36.
- Peiro, S., J. X. Comella, et al. (2000). "PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation." J Biol Chem **275**(48): 37846-37852.
- Pellikainen, J. M., K. M. Ropponen, et al. (2004). "Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis." Clin Cancer Res **10**(22): 7621-7628.
- Perez, P., P. M. Coll, et al. (1995). "NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains." Mol Cell Neurosci **6**(2): 97-105.
- Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature **406**(6797): 747-752.
- Persson, H., C. Ayer-Le Lievre, et al. (1990). "Expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in Sertoli cells downregulated by testosterone." Science **247**(4943): 704-707.
- Petersen, C. M., M. S. Nielsen, et al. (1997). "Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography." J Biol Chem **272**(6): 3599-3605.
- Petersson, F. (2015). "Nasopharyngeal carcinoma: a review." Semin Diagn Pathol **32**(1): 54-73.
- Philippidou, P., G. Valdez, et al. (2011). "Trk retrograde signaling requires persistent, Pincher-directed endosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(2): 852-857.
- Phillips, H. S., J. M. Hains, et al. (1990). "Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons." Science **250**(4978): 290-294.
- Pierotti, M. A. and A. Greco (2006). "Oncogenic rearrangements of the NTRK1/NGF receptor." Cancer Lett **232**(1): 90-98.
- Piiper, A., I. Dikic, et al. (2002). "Cyclic AMP induces transactivation of the receptors for epidermal growth factor and nerve growth factor, thereby modulating activation of MAP kinase, Akt, and neurite outgrowth in PC12 cells." J Biol Chem **277**(46): 43623-43630.
- Pimenta, A. C., D. F. Dourado, et al. (2014). "Dynamic structure of NGF and proNGF complexed with p75NTR: pro-peptide effect." J Chem Inf Model **54**(7): 2051-2067.
- Pinco, O., C. Carmeli, et al. (1993). "Neurotrophin-3 affects proliferation and differentiation of distinct neural crest cells and is present in the early neural tube of avian embryos." J Neurobiol **24**(12): 1626-1641.
- Plo, I., F. Bono, et al. (2004). "Nerve growth factor-induced protein kinase C stimulation contributes to TrkA-dependent inhibition of p75 neurotrophin receptor sphingolipid signaling." J Neurosci Res **77**(4): 465-474.
- Pollock, N., L. Wang, et al. (2015). "Increased expression of HER2, HER3, and HER2:HER3 heterodimers in HPV-positive HNSCC using a novel proximity-based assay: Implications for targeted therapies." Clin Cancer Res.
- Ponta, H., D. Wainwright, et al. (1998). "The CD44 protein family." Int J Biochem Cell Biol **30**(3): 299-305.
- Poo, M. M. (2001). "Neurotrophins as synaptic modulators." Nat Rev Neurosci **2**(1): 24-32.
- Postigo, A., A. M. Calella, et al. (2002). "Distinct requirements for TrkB and TrkC signaling in target innervation by sensory neurons." Genes Dev **16**(5): 633-645.
- Powell, J. C., C. Twomey, et al. (2009). "Association between Presenilin-1 and TRAF6 modulates regulated intramembrane proteolysis of the p75NTR neurotrophin receptor." J Neurochem **108**(1): 216-230.
- Prabhu, A., K. O. Obi, et al. (2014). "The synergistic effects of alcohol and tobacco consumption on the risk of esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis." Am J Gastroenterol **109**(6): 822-827.

BIBLIOGRAPHIE

- Prat, A., J. S. Parker, et al. (2010). "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer." *Breast Cancer Res* **12**(5): R68.
- Puertollano, R., R. C. Aguilar, et al. (2001). "Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs." *Science* **292**(5522): 1712-1716.
- Pundavela, J., Y. Demont, et al. (2014). "ProNGF correlates with Gleason score and is a potential driver of nerve infiltration in prostate cancer." *Am J Pathol* **184**(12): 3156-3162.
- Purves, D. and A. Nja (1976). "Effect of nerve growth factor on synaptic depression after axotomy." *Nature* **260**(5551): 535-536.
- Qiu, M. S. and S. H. Green (1991). "NGF and EGF rapidly activate p21ras in PC12 cells by distinct, convergent pathways involving tyrosine phosphorylation." *Neuron* **7**(6): 937-946.
- Quistgaard, E. M., P. Madsen, et al. (2009). "Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain." *Nat Struct Mol Biol* **16**(1): 96-98.
- Rajagopal, R. and M. V. Chao (2006). "A role for Fyn in Trk receptor transactivation by G-protein-coupled receptor signaling." *Mol Cell Neurosci* **33**(1): 36-46.
- Ramos, A., W. C. Ho, et al. (2007). "Hypo-osmolar stress induces p75NTR expression by activating Sp1-dependent transcription." *J Neurosci* **27**(6): 1498-1506.
- Rattenholl, A., H. Lilie, et al. (2001). "The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from Escherichia coli inclusion bodies." *Eur J Biochem* **268**(11): 3296-3303.
- Rattenholl, A., M. Ruoppolo, et al. (2001). "Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor." *J Mol Biol* **305**(3): 523-533.
- Reis-Filho, J. S. and A. N. Tutt (2008). "Triple negative tumours: a critical review." *Histopathology* **52**(1): 108-118.
- Rhodes, N., D. A. Heering, et al. (2008). "Characterization of an Akt kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity." *Cancer Res* **68**(7): 2366-2374.
- Robert, N. J., V. Dieras, 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." *J Clin Oncol* **29**(10): 1252-1260.
- Robinson, R. C., C. Radziejewski, et al. (1999). "The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site." *Protein Sci* **8**(12): 2589-2597.
- Rocca, A., A. Farolfi, et al. (2014). "Palbociclib (PD 0332991) : targeting the cell cycle machinery in breast cancer." *Expert Opin Pharmacother* **15**(3): 407-420.
- Rodriguez-Tebar, A., G. Dechant, et al. (1990). "Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor." *Neuron* **4**(4): 487-492.
- Rodriguez-Tebar, A., G. Dechant, et al. (1992). "Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor." *EMBO J* **11**(3): 917-922.
- Rogers, M. L., S. Bailey, et al. (2010). "ProNGF mediates death of Natural Killer cells through activation of the p75NTR-sortilin complex." *J Neuroimmunol* **226**(1-2): 93-103.
- Romon, R., E. Adriaenssens, et al. (2010). "Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways." *Mol Cancer* **9**: 157.
- Rosario, M., R. Franke, et al. (2007). "The neurite outgrowth multiadaptor RhoGAP, NOMA-GAP, regulates neurite extension through SHP2 and Cdc42." *J Cell Biol* **178**(3): 503-516.
- Rosenthal, A., D. V. Goeddel, et al. (1990). "Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor." *Neuron* **4**(5): 767-773.
- Rothman, K. and A. Keller (1972). "The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx." *J Chronic Dis* **25**(12): 711-716.
- Roux, P. P. and P. A. Barker (2002). "Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor." *Prog Neurobiol* **67**(3): 203-233.

BIBLIOGRAPHIE

- Rowinsky, E. K. (2004). "The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors." Annu Rev Med **55**: 433-457.
- Ruiz, P., C. Schwarzler, et al. (1995). "CD44 isoforms during differentiation and development." Bioessays **17**(1): 17-24.
- Russell, J. P., D. J. Powell, et al. (2000). "The TRK-T1 fusion protein induces neoplastic transformation of thyroid epithelium." Oncogene **19**(50): 5729-5735.
- Ryden, M., B. Hempstead, et al. (1997). "Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor." J Biol Chem **272**(26): 16322-16328.
- Ryden, M., J. Murray-Rust, et al. (1995). "Functional analysis of mutant neurotrophins deficient in low-affinity binding reveals a role for p75LNGFR in NT-4 signalling." EMBO J **14**(9): 1979-1990.
- Sahai, E. and C. J. Marshall (2003). "Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis." Nat Cell Biol **5**(8): 711-719.
- Sakamoto, Y., Y. Kitajima, et al. (2001). "Expression of Trk tyrosine kinase receptor is a biologic marker for cell proliferation and perineural invasion of human pancreatic ductal adenocarcinoma." Oncol Rep **8**(3): 477-484.
- Salama, J. K., D. J. Haraf, et al. (2011). "A randomized phase II study of 5-fluorouracil, hydroxyurea, and twice-daily radiotherapy compared with bevacizumab plus 5-fluorouracil, hydroxyurea, and twice-daily radiotherapy for intermediate-stage and T4N0-1 head and neck cancers." Ann Oncol **22**(10): 2304-2309.
- Salas, C., M. Julio-Pieper, et al. (2006). "Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion." J Clin Endocrinol Metab **91**(6): 2396-2403.
- Salehi, A. H., S. Xanthoudakis, et al. (2002). "NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway." J Biol Chem **277**(50): 48043-48050.
- Santini, J., J. L. Formento, et al. (1991). "Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas." Head Neck **13**(2): 132-139.
- Sargent, E. R., L. G. Gomella, et al. (1989). "Epidermal growth factor receptor gene expression in normal human kidney and renal cell carcinoma." J Urol **142**(5): 1364-1368.
- Sasich, L. D. and S. R. Sukkari (2012). "The US FDA's withdrawal of the breast cancer indication for Avastin (bevacizumab)." Saudi Pharm J **20**(4): 381-385.
- Scaltriti, M. and J. Baselga (2006). "The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy." Clin Cancer Res **12**(18): 5268-5272.
- Scheving, L. A., M. C. Stevenson, et al. (2002). "Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation." Biochem Biophys Res Commun **290**(1): 197-203.
- Schiller, M. R. (2006). "Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases--GEFs what's the link." Cell Signal **18**(11): 1834-1843.
- Schneider, R. and M. Schweiger (1991). "A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors." Oncogene **6**(10): 1807-1811.
- Screaton, G. R., M. V. Bell, et al. (1992). "Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 12160-12164.
- Sehgal, A., N. Patil, et al. (1988). "A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene." Mol Cell Biol **8**(8): 3160-3167.

BIBLIOGRAPHIE

- Seidah, N. G., S. Benjannet, et al. (1996). "Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases." *Biochem J* **314** (Pt 3): 951-960.
- Seitz, H. K., S. Matsuzaki, et al. (2001). "Alcohol and cancer." *Alcohol Clin Exp Res* **25**(5 Suppl ISBRA): 137S-143S.
- Seiwert, T., J. Sarantopoulos, et al. (2013). "Phase II trial of single-agent foretinib (GSK1363089) in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck." *Invest New Drugs* **31**(2): 417-424.
- Seiwert, T. Y. and E. E. Cohen (2008). "Targeting angiogenesis in head and neck cancer." *Semin Oncol* **35**(3): 274-285.
- Seroogy, K. B., K. H. Lundgren, et al. (1994). "Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs." *J Comp Neurol* **342**(3): 321-334.
- Serup Andersen, O., P. Boisguerin, et al. (2010). "Identification of a linear epitope in sortilin that partakes in pro-neurotrophin binding." *J Biol Chem* **285**(16): 12210-12222.
- Shamovsky, I. L., G. M. Ross, et al. (1999). "The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study." *Protein Sci* **8**(11): 2223-2233.
- Shao, H., H. Y. Cheng, et al. (2003). "Identification and characterization of signal transducer and activator of transcription 3 recruitment sites within the epidermal growth factor receptor." *Cancer Res* **63**(14): 3923-3930.
- Shastry, M. and D. A. Yardley (2013). "Updates in the treatment of basal/triple-negative breast cancer." *Curr Opin Obstet Gynecol* **25**(1): 40-48.
- Shelton, D. L. and L. F. Reichardt (1984). "Expression of the beta-nerve growth factor gene correlates with the density of sympathetic innervation in effector organs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(24): 7951-7955.
- Shelton, D. L. and L. F. Reichardt (1986). "Studies on the expression of the beta nerve growth factor (NGF) gene in the central nervous system: level and regional distribution of NGF mRNA suggest that NGF functions as a trophic factor for several distinct populations of neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(8): 2714-2718.
- Shelton, D. L., J. Sutherland, et al. (1995). "Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins." *J Neurosci* **15**(1 Pt 2): 477-491.
- Shen, J. and I. N. Maruyama (2011). "Nerve growth factor receptor TrkA exists as a preformed, yet inactive, dimer in living cells." *FEBS Lett* **585**(2): 295-299.
- Shen, W. R., Y. P. Wang, et al. (2014). "Perineural invasion and expression of nerve growth factor can predict the progression and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma." *J Oral Pathol Med* **43**(4): 258-264.
- Sherman, L., D. Wainwright, et al. (1998). "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* **12**(7): 1058-1071.
- Shi, G. X., L. Jin, et al. (2010). "Src-dependent TrkA transactivation is required for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38-mediated Rit activation and neuronal differentiation." *Mol Biol Cell* **21**(9): 1597-1608.
- Shintani, T., N. Maeda, et al. (2001). "Receptor-like protein tyrosine phosphatase gamma (RPTPgamma), but not PTPzeta/RPTPbeta, inhibits nerve-growth-factor-induced neurite outgrowth in PC12D cells." *Dev Neurosci* **23**(1): 55-69.
- Shintani, T. and M. Noda (2008). "Protein tyrosine phosphatase receptor type Z dephosphorylates TrkA receptors and attenuates NGF-dependent neurite outgrowth of PC12 cells." *J Biochem* **144**(2): 259-266.
- Shonukan, O., I. Bagayogo, et al. (2003). "Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin." *Oncogene* **22**(23): 3616-3623.

BIBLIOGRAPHIE

- Sibilia, M. and E. F. Wagner (1995). "Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor." *Science* **269**(5221): 234-238.
- Sieber-Blum, M. (1991). "Role of the neurotrophic factors BDNF and NGF in the commitment of pluripotent neural crest cells." *Neuron* **6**(6): 949-955.
- Silvestrini, R., S. Veneroni, et al. (1994). "The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients." *J Natl Cancer Inst* **86**(7): 499-504.
- Simard, E. P., L. A. Torre, et al. (2014). "International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site." *Oral Oncol* **50**(5): 387-403.
- Simpson, D. R., L. K. Mell, et al. (2015). "Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck." *Oral Oncol* **51**(4): 291-298.
- Singer, W. D., H. A. Brown, et al. (1997). "Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D." *Annu Rev Biochem* **66**: 475-509.
- Skeldal, S., D. Matusica, et al. (2011). "Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75(NTR)." *Bioessays* **33**(8): 614-625.
- Skeldal, S., A. M. Sykes, 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." *J Biol Chem* **287**(52): 43798-43809.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, et al. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." *Science* **235**(4785): 177-182.
- Somai, S., A. Gompel, et al. (2002). "Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **295**(2): 482-488.
- Song, W., M. Volosin, et al. (2010). "ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons." *J Neurosci* **30**(46): 15608-15615.
- Soppet, D., E. Escandon, et al. (1991). "The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor." *Cell* **65**(5): 895-903.
- Sorlie, T. (2004). "Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities." *Eur J Cancer* **40**(18): 2667-2675.
- Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10869-10874.
- Sorlie, T., R. Tibshirani, et al. (2003). "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8418-8423.
- Sortino, M. A., F. Condorelli, 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**(1): 124-136.
- Sotiriou, C., S. Y. Neo, et al. (2003). "Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(18): 10393-10398.
- Sotiriou, C. and L. Pusztai (2009). "Gene-expression signatures in breast cancer." *N Engl J Med* **360**(8): 790-800.
- Spandidos, D. A. and M. L. Anderson (1989). "Oncogenes and onco-suppressor genes: their involvement in cancer." *J Pathol* **157**(1): 1-10.
- Spano, J. P., C. Lagorce, et al. (2005). "Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival." *Ann Oncol* **16**(1): 102-108.
- Sparano, J. A., S. Moulder, et al. (2009). "Phase II trial of tipifarnib plus neoadjuvant doxorubicin-cyclophosphamide in patients with clinical stage IIB-IIIC breast cancer." *Clin Cancer Res* **15**(8): 2942-2948.
- Spillantini, M. G., L. Aloe, et al. (1989). "Nerve growth factor mRNA and protein increase in hypothalamus in a mouse model of aggression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(21): 8555-8559.

BIBLIOGRAPHIE

- Srinivasan, B., C. H. Roque, et al. (2004). "Microglia-derived pronerve growth factor promotes photoreceptor cell death via p75 neurotrophin receptor." *J Biol Chem* **279**(40): 41839-41845.
- Stein, R. C. (2001). "Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment." *Endocr Relat Cancer* **8**(3): 237-248.
- Stemke-Hale, K., A. M. Gonzalez-Angulo, et al. (2008). "An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer." *Cancer Res* **68**(15): 6084-6091.
- Stephens, R. M., D. M. Loeb, et al. (1994). "Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses." *Neuron* **12**(3): 691-705.
- Sternlicht, M. D. (2006). "Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis." *Breast Cancer Res* **8**(1): 201.
- Stevenson, R. P., D. Veltman, et al. (2012). "Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance." *J Cell Sci* **125**(Pt 5): 1073-1079.
- Stewart, B. W., C. Wild, et al. (2014). *World cancer report 2014*.
- Stewart, J. R. and C. A. O'Brian (2005). "Protein kinase C- α mediates epidermal growth factor receptor transactivation in human prostate cancer cells." *Mol Cancer Ther* **4**(5): 726-732.
- Stoilov, P., E. Castren, et al. (2002). "Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism." *Biochem Biophys Res Commun* **290**(3): 1054-1065.
- Sun, Z., A. Prat, et al. (2015). "Chemotherapy benefit for 'ER-positive' breast cancer and contamination of nonluminal subtypes-waiting for TAILORx and RxPONDER." *Ann Oncol* **26**(1): 70-74.
- Suter, U., J. V. Heymach, Jr., et al. (1991). "Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF." *EMBO J* **10**(9): 2395-2400.
- Sutter, A., R. J. Riopelle, et al. (1979). "Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells." *J Biol Chem* **254**(13): 5972-5982.
- Suzuki, R., A. J. Atherton, et al. (2000). "Proliferation and differentiation in the human breast during pregnancy." *Differentiation* **66**(2-3): 106-115.
- Swain, S. M., J. Baselga, et al. (2015). "Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer." *N Engl J Med* **372**(8): 724-734.
- Sykes, A. M., N. Palstra, et al. (2012). "The effects of transmembrane sequence and dimerization on cleavage of the p75 neurotrophin receptor by gamma-secretase." *J Biol Chem* **287**(52): 43810-43824.
- Tacconelli, A., A. R. Farina, et al. (2007). "TrkAIII expression in the thymus." *J Neuroimmunol* **183**(1-2): 151-161.
- Tacconelli, A., A. R. Farina, et al. (2004). "TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma." *Cancer Cell* **6**(4): 347-360.
- Tacconelli, A., A. R. Farina, et al. (2005). "Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma." *Future Oncol* **1**(5): 689-698.
- Tai, J., M. Yang, et al. (2010). "Genetic polymorphisms in cytochrome P450 genes are associated with an increased risk of squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx in a Chinese population." *Cancer Genet Cytogenet* **196**(1): 76-82.
- Takahashi, Y., N. Shimokawa, et al. (2011). "Ligand-induced downregulation of TrkA is partly regulated through ubiquitination by Cbl." *FEBS Lett* **585**(12): 1741-1747.
- Tang, F., D. Wang, et al. (2009). "Berberine inhibits metastasis of nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells by targeting Rho kinase-mediated Ezrin phosphorylation at threonine 567." *J Biol Chem* **284**(40): 27456-27466.
- Tang, Y., L. Olufemi, et al. (2008). "Role of Rho GTPases in breast cancer." *Front Biosci* **13**: 759-776.

BIBLIOGRAPHIE

- Tatematsu, T., H. Sasaki, 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." *Mol Clin Oncol* **2**(5): 725-730.
- Tauris, J., L. Ellgaard, et al. (1998). "The carboxy-terminal domain of the receptor-associated protein binds to the Vps10p domain of sortilin." *FEBS Lett* **429**(1): 27-30.
- Teng, H. K., K. K. Teng, et al. (2005). "ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin." *J Neurosci* **25**(22): 5455-5463.
- Teng, K. K., S. Felice, et al. (2010). "Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges." *Dev Neurobiol* **70**(5): 350-359.
- Tessarollo, L., P. Tsoulfas, et al. (1993). "trkC, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues." *Development* **118**(2): 463-475.
- Tessarollo, L., K. S. Vogel, et al. (1994). "Targeted mutation in the neurotrophin-3 gene results in loss of muscle sensory neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25): 11844-11848.
- Thomas, S. M., F. M. Coppelli, et al. (2003). "Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma." *Cancer Res* **63**(17): 5629-5635.
- Thress, K., T. Macintyre, et al. (2009). "Identification and preclinical characterization of AZ-23, a novel, selective, and orally bioavailable inhibitor of the Trk kinase pathway." *Mol Cancer Ther* **8**(7): 1818-1827.
- Tijink, B. M., J. Buter, et al. (2006). "A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus." *Clin Cancer Res* **12**(20 Pt 1): 6064-6072.
- Timmusk, T., N. Belluardo, et al. (1993). "Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues." *Eur J Neurosci* **5**(6): 605-613.
- Toillon, R. A., C. Lagadec, et al. (2007). "Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin." *Mol Cell Proteomics* **6**(7): 1239-1247.
- Toole, B. P. and M. G. Slomiany (2008). "Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance." *Drug Resist Updat* **11**(3): 110-121.
- Torre, L. A., F. Bray, et al. (2015). "Global cancer statistics, 2012." *CA Cancer J Clin* **65**(2): 87-108.
- Tremmel, M., A. Matzke, et al. (2009). "A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis." *Blood* **114**(25): 5236-5244.
- Truzzi, F., A. Marconi, et al. (2008). "Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration." *J Invest Dermatol* **128**(8): 2031-2040.
- Tsui-Pierchala, B. A., J. Milbrandt, et al. (2002). "NGF utilizes c-Ret via a novel GFL-independent, inter-RTK signaling mechanism to maintain the trophic status of mature sympathetic neurons." *Neuron* **33**(2): 261-273.
- Ultsch, M. H., C. Wiesmann, et al. (1999). "Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC." *J Mol Biol* **290**(1): 149-159.
- Urfer, R., P. Tsoulfas, et al. (1995). "An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors." *EMBO J* **14**(12): 2795-2805.
- Vaegter, C. B., P. Jansen, et al. (2011). "Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling." *Nat Neurosci* **14**(1): 54-61.
- Vaishnavi, A., M. Capelletti, et al. (2013). "Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer." *Nat Med* **19**(11): 1469-1472.
- Valdez, G., W. Akmentin, et al. (2005). "Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors." *J Neurosci* **25**(21): 5236-5247.
- Valdez, G., P. Philippidou, et al. (2007). "Trk-signaling endosomes are generated by Rac-dependent macroendocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(30): 12270-12275.

BIBLIOGRAPHIE

- van der Voort, R., T. E. Taher, et al. (1999). "Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met." *J Biol Chem* **274**(10): 6499-6506.
- Van Emburgh, B. O., A. Sartore-Bianchi, et al. (2014). "Acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer." *Mol Oncol* **8**(6): 1084-1094.
- Vanhecke, E., E. Adriaenssens, et al. (2011). "Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival." *Clin Cancer Res* **17**(7): 1741-1752.
- Varon, C., C. Basoni, et al. (2006). "TGFbeta1-induced aortic endothelial morphogenesis requires signaling by small GTPases Rac1 and RhoA." *Exp Cell Res* **312**(18): 3604-3619.
- Verbeke, S., S. Meignan, et al. (2010). "Overexpression of p75(NTR) increases survival of breast cancer cells through p21(waf1)." *Cell Signal* **22**(12): 1864-1873.
- Verma, S., D. Miles, et al. (2012). "Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer." *N Engl J Med* **367**(19): 1783-1791.
- Vermorken, J. B., J. Stohlmacher-Williams, et al. (2013). "Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial." *Lancet Oncol* **14**(8): 697-710.
- Vetter, M. L., D. Martin-Zanca, et al. (1991). "Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13): 5650-5654.
- Viale, G., N. Rotmensz, et al. (2009). "Invasive ductal carcinoma of the breast with the "triple-negative" phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity." *Breast Cancer Res Treat* **116**(2): 317-328.
- Viale, G., L. Slaets, et al. (2014). "High concordance of protein (by IHC), gene (by FISH; HER2 only), and microarray readout (by TargetPrint) of ER, PgR, and HER2: results from the EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial." *Ann Oncol* **25**(4): 816-823.
- Vilar, M., I. Charalampopoulos, et al. (2009). "Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers." *Neuron* **62**(1): 72-83.
- Vivanco, I., D. Rohle, et al. (2010). "The phosphatase and tensin homolog regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor response by targeting EGFR for degradation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(14): 6459-6464.
- Vogel, C. L., M. A. Cobleigh, et al. (2002). "Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer." *J Clin Oncol* **20**(3): 719-726.
- Vogel, K. S., M. El-Afandi, et al. (2000). "Neurofibromin negatively regulates neurotrophin signaling through p21ras in embryonic sensory neurons." *Mol Cell Neurosci* **15**(4): 398-407.
- Vogel, U. F. (2010). "Confirmation of a low HER2 positivity rate of breast carcinomas - limitations of immunohistochemistry and in situ hybridization." *Diagn Pathol* **5**: 50.
- Volosin, M., W. Song, et al. (2006). "Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins." *J Neurosci* **26**(29): 7756-7766.
- Von Schack, D., E. Casademunt, et al. (2001). "Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system." *Nat Neurosci* **4**(10): 977-978.
- Vu, T. and F. X. Claret (2012). "Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer." *Front Oncol* **2**: 62.
- Walker, E. H., M. E. Pacold, et al. (2000). "Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine." *Mol Cell* **6**(4): 909-919.
- Wan, J., A. Y. Cheung, et al. (2008). "Endophilin B1 as a novel regulator of nerve growth factor/ TrkA trafficking and neurite outgrowth." *J Neurosci* **28**(36): 9002-9012.

BIBLIOGRAPHIE

- Wang, T., D. Yu, et al. (2009). "Trk kinase inhibitors as new treatments for cancer and pain." Expert Opin Ther Pat **19**(3): 305-319.
- Wang, Y. M., M. L. Seibenhener, et al. (1999). "Atypical PKC zeta is activated by ceramide, resulting in coactivation of NF-kappaB/JNK kinase and cell survival." J Neurosci Res **55**(3): 293-302.
- Warrington, R. J. and K. E. Lewis (2011). "Natural antibodies against nerve growth factor inhibit in vitro prostate cancer cell metastasis." Cancer Immunol Immunother **60**(2): 187-195.
- Watson, F. L., M. A. Porcionatto, et al. (1999). "TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity." J Neurobiol **39**(2): 323-336.
- Weeraratna, A. T., S. L. Dalrymple, et al. (2001). "Pan-trk inhibition decreases metastasis and enhances host survival in experimental models as a result of its selective induction of apoptosis of prostate cancer cells." Clin Cancer Res **7**(8): 2237-2245.
- Wehrman, T., X. He, et al. (2007). "Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors." Neuron **53**(1): 25-38.
- Weigelt, B., J. L. Peterse, et al. (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models." Nat Rev Cancer **5**(8): 591-602.
- Weinstein, I. B. (1987). "Growth factors, oncogenes, and multistage carcinogenesis." J Cell Biochem **33**(3): 213-224.
- Weiss, G. J., M. Hidalgo, 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." Invest New Drugs **30**(6): 2334-2343.
- Wells, A. (1999). "EGF receptor." Int J Biochem Cell Biol **31**(6): 637-643.
- Welslau, M., V. Dieras, 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**(5): 642-651.
- Werkmeister, R., B. Brandt, et al. (2000). "Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas." Oral Oncol **36**(1): 100-105.
- Weskamp, G., J. Schlondorff, et al. (2004). "Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR)." J Biol Chem **279**(6): 4241-4249.
- Wesolowski, R. and B. Ramaswamy (2011). "Gene expression profiling: changing face of breast cancer classification and management." Gene Expr **15**(3): 105-115.
- Westergaard, U. B., E. S. Sorensen, et al. (2004). "Functional organization of the sortilin Vps10p domain." J Biol Chem **279**(48): 50221-50229.
- Wheeler, D. L., S. Huang, et al. (2008). "Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members." Oncogene **27**(28): 3944-3956.
- Wheeler, S., D. R. Siwak, et al. (2012). "Tumor epidermal growth factor receptor and EGFR PY1068 are independent prognostic indicators for head and neck squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **18**(8): 2278-2289.
- Whittemore, S. R., T. Ebendal, et al. (1986). "Development and regional expression of beta nerve growth factor messenger RNA and protein in the rat central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(3): 817-821.
- Whyte, J., O. Bergin, et al. (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 Res **11**(5): 209.
- Wiesmann, C. and A. M. de Vos (2001). "Nerve growth factor: structure and function." Cell Mol Life Sci **58**(5-6): 748-759.
- Wiesmann, C., M. H. Ultsch, et al. (1999). "Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor." Nature **401**(6749): 184-188.
- Williams, R., A. Backstrom, et al. (1993). "Molecular cloning and cellular localization of trkC in the chicken embryo." Brain Res Dev Brain Res **75**(2): 235-252.

BIBLIOGRAPHIE

- Willnow, T. E., C. M. Petersen, et al. (2008). "VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function." *Nat Rev Neurosci* **9**(12): 899-909.
- Wilson, C. M., T. Naves, et al. (2014). "Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors." *J Cell Sci* **127**(Pt 18): 3983-3997.
- Wilson, T. R., J. Fridlyand, et al. (2012). "Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors." *Nature* **487**(7408): 505-509.
- Wobus, M., R. Rangwala, et al. (2002). "CD44 associates with EGFR and erbB2 in metastasizing mammary carcinoma cells." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **10**(1): 34-39.
- Wood, M. D., D. Hunter, et al. (2010). "Heparin-binding-affinity-based delivery systems releasing nerve growth factor enhance sciatic nerve regeneration." *J Biomater Sci Polym Ed* **21**(6): 771-787.
- Woolf, C. J., B. Safieh-Garabedian, et al. (1994). "Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity." *Neuroscience* **62**(2): 327-331.
- Wooster, R., G. Bignell, et al. (1995). "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2." *Nature* **378**(6559): 789-792.
- Wooten, M. W., M. L. Seibenhener, et al. (2001). "The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor." *J Biol Chem* **276**(11): 7709-7712.
- Wooten, M. W., M. L. Seibenhener, et al. (2000). "Mapping of atypical protein kinase C within the nerve growth factor signaling cascade: relationship to differentiation and survival of PC12 cells." *Mol Cell Biol* **20**(13): 4494-4504.
- Wooten, M. W., M. L. Vandenplas, et al. (2001). "Nerve growth factor stimulates multisite tyrosine phosphorylation and activation of the atypical protein kinase C's via a src kinase pathway." *Mol Cell Biol* **21**(24): 8414-8427.
- Wright, E. M., K. S. Vogel, et al. (1992). "Neurotrophic factors promote the maturation of developing sensory neurons before they become dependent on these factors for survival." *Neuron* **9**(1): 139-150.
- Wu, C., C. F. Lai, et al. (2001). "Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes." *J Neurosci* **21**(15): 5406-5416.
- Wu, W., P. A. Wages, et al. (2015). "SRC-mediated EGF receptor activation regulates ozone-induced interleukin 8 expression in human bronchial epithelial cells." *Environ Health Perspect* **123**(3): 231-236.
- Wynder, E. L., M. H. Mushinski, et al. (1977). "Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers." *Cancer* **40**(4 Suppl): 1872-1878.
- Wynne, S. and D. Djakiew (2010). "NSAID inhibition of prostate cancer cell migration is mediated by Nag-1 Induction via the p38 MAPK-p75(NTR) pathway." *Mol Cancer Res* **8**(12): 1656-1664.
- Xing, J., D. D. Ginty, et al. (1996). "Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase." *Science* **273**(5277): 959-963.
- Xu, H., L. P. Stabile, et al. (2011). "Dual blockade of EGFR and c-Met abrogates redundant signaling and proliferation in head and neck carcinoma cells." *Clin Cancer Res* **17**(13): 4425-4438.
- Xu, J., Y. Chen, et al. (2015). "beta-catenin regulates c-Myc and CDKN1A expression in breast cancer cells." *Mol Carcinog*.
- Xu, J., Y. Chen, et al. (2010). "MYC and Breast Cancer." *Genes Cancer* **1**(6): 629-640.
- Yamada, M., H. Ohnishi, et al. (1997). "Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons." *J Biol Chem* **272**(48): 30334-30339.
- Yamamoto, M., G. Sobue, et al. (1996). "Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues." *Neurochem Res* **21**(8): 929-938.

BIBLIOGRAPHIE

- Yan, H. and M. V. Chao (1991). "Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding." *J Biol Chem* **266**(18): 12099-12104.
- Yang, Z. F., D. W. Ho, et al. (2005). "Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* **65**(1): 219-225.
- Yano, H., R. Torkin, et al. (2009). "Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: evidence for retrograde-directed cell killing." *J Neurosci* **29**(47): 14790-14802.
- Ye, X., P. Mehlen, et al. (1999). "TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction." *J Biol Chem* **274**(42): 30202-30208.
- Ye, Y., D. Dang, et al. (2011). "Nerve growth factor links oral cancer progression, pain, and cachexia." *Mol Cancer Ther* **10**(9): 1667-1676.
- Yerushalmi, R., M. M. Hayes, et al. (2009). "Breast carcinoma--rare types: review of the literature." *Ann Oncol* **20**(11): 1763-1770.
- Yin, S. C., W. Guo, et al. (2013). "Picropodophyllin inhibits tumor growth of human nasopharyngeal carcinoma in a mouse model." *Biochem Biophys Res Commun* **439**(1): 1-5.
- Yokotsuka, M., K. Iwaya, et al. (2011). "Overexpression of HER2 signaling to WAVE2-Arp2/3 complex activates MMP-independent migration in breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **126**(2): 311-318.
- Yoon, S. O., P. Casaccia-Bonnel, et al. (1998). "Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival." *J Neurosci* **18**(9): 3273-3281.
- York, R. D., H. Yao, et al. (1998). "Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor." *Nature* **392**(6676): 622-626.
- Yu, E. H., M. T. Lui, et al. (2014). "Oral carcinoma with perineural invasion has higher nerve growth factor expression and worse prognosis." *Oral Dis* **20**(3): 268-274.
- Zagouri, F., T. N. Sergentanis, et al. (2013). "Hsp90 inhibitors in breast cancer: a systematic review." *Breast* **22**(5): 569-578.
- Zampieri, N., C. F. Xu, et al. (2005). "Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains." *J Biol Chem* **280**(15): 14563-14571.
- Zardavas, D., J. Baselga, et al. (2013). "Emerging targeted agents in metastatic breast cancer." *Nat Rev Clin Oncol* **10**(4): 191-210.
- Zardavas, D. and M. Piccart-Gebhart (2015). "Clinical Trials of Precision Medicine through Molecular Profiling: Focus on Breast Cancer." *Am Soc Clin Oncol Educ Book* **35**: e183-190.
- Zardavas, D., L. Pugliano, et al. (2013). "Personalized therapy for breast cancer: a dream or a reality?" *Future Oncol* **9**(8): 1105-1119.
- Zeka, A., R. Gore, et al. (2003). "Effects of alcohol and tobacco on aerodigestive cancer risks: a meta-regression analysis." *Cancer Causes Control* **14**(9): 897-906.
- Zhang, T., J. Ma, et al. (2003). "Grb2 regulates Stat3 activation negatively in epidermal growth factor signalling." *Biochem J* **376**(Pt 2): 457-464.
- Zheng, J., H. Wang, et al. (2014). "More antitumor efficacy of the PI3K inhibitor GDC-0941 in breast cancer with PIK3CA mutation or HER2 amplification status in vitro." *Pharmazie* **69**(1): 38-42.
- Zheng, W. H., S. Kar, et al. (2002). "FKHRL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling." *J Neurochem* **80**(6): 1049-1061.
- Zhu, Z. W., H. Friess, et al. (2001). "Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells." *Clin Cancer Res* **7**(1): 105-112.
- Zoller, M. (2011). "CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule?" *Nat Rev Cancer* **11**(4): 254-267.
- Zoltan-Jones, A., L. Huang, et al. (2003). "Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells." *J Biol Chem* **278**(46): 45801-45810.
- Zwick, E., P. O. Hackel, et al. (1999). "The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems." *Trends Pharmacol Sci* **20**(10): 408-412.

Résumé

Le laboratoire INSERM U908 a montré que le Nerve Growth Factor (NGF) et son précurseur, le proNGF, sont impliqués dans l'agressivité des tumeurs mammaires *via* des effets sur la croissance, l'angiogenèse ou encore la migration / invasion. Pour autant, aucune thérapie ciblée n'a, à ce jour, été approuvée suite à des essais cliniques de traitements visant à inhiber les effets du (pro)NGF et de leurs récepteurs dans les cancers. Ces résultats indiquent que la phosphorylation de TrkA est nécessaire mais pas suffisante pour expliquer le(s) mécanisme(s) par lequel(s) le NGF ou son précurseur participe(nt) au développement tumoral. L'obtention de lignées tumorales résistantes au Lestaurtinib est un phénomène rapide, nous avons donc émis l'hypothèse que la signalisation de TrkA indépendante de sa phosphorylation existe de façon « innée » dans les cellules tumorales. Par l'analyse protéomique, nous avons ainsi découvert que le NGF induit le recrutement de CD44 et d'une cascade de signalisation p115RhoGEF / RhoA et RhoC / ROCK1 (Aubert L*, Guilbert M* et al, Oncotarget, 2015 ; *co-premier auteur). Nous avons ainsi montré que le NGF *via* le complexe TrkA / CD44 induit la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de sein *in vitro*, et augmente la tumorigénicité *in vivo*. Quant au proNGF, j'ai pu observer qu'il induit l'internalisation de l'EGFR par la phosphorylation du résidu Y1068. Il en résulte une diminution des effets prolifératif et pro-invasif de l'EGF dans les cellules tumorales. Ces résultats fondamentaux sont tout à fait intéressants, même s'ils nécessitent leurs consolidations, et doivent permettre de démontrer le caractère pronostique de la détection de TrkA et ses corécepteurs dans le cancer. Ainsi nos études permettront le développement de thérapies ciblées par des firmes pharmaceutiques.