

50376  
2000  
129

N° d'ordre : 2737

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

Option : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

**Simon DESCAMPS**



**MISE EN EVIDENCE DU ROLE DU NERVE GROWTH  
FACTOR DANS LE CANCER DU SEIN :**

**EFFETS BIOLOGIQUES ET SIGNALISATION INTRACELLULAIRE**

Soutenue le 31 Mai 2000 devant la commission d'examen :

Président : Pr Bénoni Boilly, Université de Lille I, Villeneuve d'Ascq

Rapporteurs : Pr Denis Barritault, Université Paris XII, Créteil

Pr Victor Nurcombe, University of Queensland, Australie

Examinateurs : Dr Jean Djiane, INRA, Jouy-en-Josas

Dr Gilles Freiss, INSERM, Montpellier

Dr Jean-Philippe Peyrat, Centre Oscar Lambret, Lille

Directeur de thèse : Pr Hubert Hondermarck, Université de Lille I, Villeneuve d'Ascq

*A Papa, Maman, Valérie et...*

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur Hubert HONDERMARCK dans l'UPRES EA 1033 de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Il a bénéficié d'une allocation de recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, d'une bourse d'étude de l'Association pour la Recherche sur le Cancer et d'un financement de la Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Nord).

## *Avant-propos*

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Bénoni BOILLY qui m'a accueilli dans son laboratoire et a bien voulu me faire l'honneur de présider cette thèse. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur le Professeur Hubert HONDERMARCK de m'avoir encadré, soutenu et accordé sa confiance au cours de mon DEA et de ces années de thèse. Merci beaucoup.

Je remercie également Monsieur le Professeur Victor NURCOMBE pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail et pour avoir consacré du temps à la lecture et à la critique de cette thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Denis BARRITAULT qui, malgré ses nombreuses occupations, a accepté d'être rapporteur de cette thèse et de consacrer du temps à l'analyse et à la critique de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Docteur Jean-Philippe PEYRAT qui a bien voulu être examinateur de cette thèse. Je le remercie de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fait bénéficier de sa collaboration.

Je remercie également Monsieur le Docteur Jean DJIANE ainsi que Monsieur le Docteur Gilles FREISS pour m'avoir fait l'honneur d'être examinateurs de cette thèse et de porter un intérêt à mes travaux.

Je remercie également tout ceux qui ont, de près ou de loin, participé à la réalisation de ce travail:

Anne-Sophie et Valérie pour leur amitié, leur gentillesse et leur aide.

Eric et Robert-Alain pour leur aide scientifique.

Sylviane pour le soutien qu'elle apporte à ses "petits".

Et pour leur sympathie et leur soutien (scientifique, technique ou moral), les anciens et les jeunes du SN3 et du LOMH: Maryse, William, Ikram, Séverine, Isabelle, Laurent, Sébastien, Xuefen, Louis, Alain, Joëlle, Marie-Michèle, Valérie, Françoise...

Merci à tous.

# SOMMAIRE

<i>Abréviations</i> .....	4
<i>Résumé</i> .....	6
<i>Introduction</i> .....	7
<i>Généralités</i> .....	10
<b>I – Caractéristiques structurales du NGF et de ses récepteurs</b> .....	11
<b>I.1. – STRUCTURE DU NGF</b> .....	11
<b>I.2. – Le récepteur tyrosine kinase TrkA</b> .....	14
1) Introduction .....	14
2) Caractéristiques structurales .....	14
3) Interactions NGF/TrkA .....	15
4) Autophosphorylation de TrkA .....	18
5) Voie Ras/Raf/MAPK .....	19
6) Voie PI3-kinase/Akt .....	22
7) Voie PLC $\gamma$ /PKC .....	22
<b>I.3. - Le récepteur des neurotrophines p75</b> .....	23
1) Caractéristiques structurales .....	23
2) Interactions NGF/p75 <sup>NTR</sup> .....	26
3) Le domaine de mort .....	28
4) Molécules interagissant avec le domaine intracellulaire de p75 <sup>NTR</sup> .....	28
5) Voie des céramides .....	29
6) Voie NF- $\kappa$ B .....	30
<b>I.4. - Interactions entre TrkA et p75, conséquences sur l'affinité des récepteurs pour le NGF</b> .....	31
1) Modulation de l'affinité des récepteurs pour le NGF .....	31
2) Modulations fonctionnelles .....	32
3) Interactions directes TrkA/p75 .....	33
<b>II - Effets biologiques du NGF</b> .....	34
<b>I.1. – Effets neurotrophiques</b> .....	34
<b>II.2. – Effets neuroendocrines</b> .....	37
<b>II.3. – Autres effets du NGF sur :</b> .....	38
1) La prolifération .....	38
2) L'apoptose .....	40
3) La migration .....	41

<b>II.4. – NGF et cancer .....</b>	41
<b>III - Cancer du sein .....</b>	45
<b>III.1. – Introduction .....</b>	45
<b>III.2. – Développement et structure de la glande mammaire.....</b>	45
1) Développement de la glande mammaire.....	45
2) Structure et histologie de la glande mammaire.....	48
<b>III.3. – Types de cancer du sein.....</b>	50
<b>III.4. – Marqueurs utilisés .....</b>	51
1) Facteurs pronostiques dans les cancers du sein. ....	51
2) Gènes impliqués dans la carcinogenèse mammaire. ....	52
<b>III.5. – Croissance des cellules de cancer du sein .....</b>	56
<b><i>Travaux personnels .....</i></b>	62
<b>I - Le nerve growth factor est mitogène pour les cellules épithéliales mammaires humaines cancéreuses, mais pas pour les cellules normales.....</b>	63
<b>I.1. - Introduction .....</b>	63
<b>I.2. – Article 1 .....</b>	64
<b>I.3. – Article 2 .....</b>	69
<b>I.4. - Conclusion .....</b>	72
<b>II - Le nerve growth factor stimule la prolifération et la survie des cellules de cancer du sein par deux voies de signalisation distinctes .....</b>	73
<b>II.1. – Introduction .....</b>	73
<b>II.2. - Article 3 .....</b>	74
<b>II.3. - Conclusion .....</b>	104
<b>III - Etude de l'expression des ARNm des récepteurs du NGF dans les biopsies de cancer du sein, intérêt pronostique .....</b>	105
<b>III.1. – Introduction .....</b>	105
<b>III.2. – Article 4 .....</b>	106
<b>III.3. - Conclusion.....</b>	130

<i>Conclusion générale .....</i>	131
<i>Bibliographie.....</i>	137
<i>Annexes .....</i>	170
<b>Annexe 1 : Matériels et Méthodes.....</b>	<b>169</b>
<b>I - Matériels.....</b>	<b>170</b>
<b>II - Méthodes.....</b>	<b>174</b>
<b>Annexe 2 : Article 5.....</b>	<b>186</b>

## *Abréviations*

<b>ADN</b>	:	Acide Désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	:	ADN complémentaire
<b>ARN</b>	:	Acide Ribonucléique
<b>ARNm</b>	:	ARN messager
<b>BDNF</b>	:	Brain-derived neurotrophic factor
<b>CNTF</b>	:	Ciliary neurotrophic factor
<b>EDTA</b>	:	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
<b>EGF</b>	:	Epidermal Growth Factor
<b>ERK</b>	:	Extracellular signal-Regulated protein Kinase
<b>FADD</b>	:	Fas-associated death domain
<b>FGF</b>	:	Fibroblast Growth Factor
<b>FRS2</b>	:	phenylalanyl-tRNA synthetase
<b>GDNF</b>	:	Glia-derived neurotrophic factor
<b>Ig</b>	:	Immunoglobuline
<b>IGF</b>	:	Insulin-like Growth Factor
<b>IKK</b>	:	I-κB kinase
<b>I-κB</b>	:	inhibiteur de NF-κB
<b>JNK</b>	:	c-jun N-terminal kinase
<b>kb</b>	:	Kilobase
<b>Kd</b>	:	Constante de Dissociation
<b>kDa</b>	:	Kilodalton
<b>MAPK</b>	:	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MAPKAP kinase 2</b>	:	MAPK-activated protein kinase 2
<b>NGF</b>	:	Nerve Growth Factor
<b>NIK</b>	:	NF-κB inducing kinase
<b>NP40</b>	:	nonidet P40
<b>NRIF</b>	:	NT receptor interacting factor
<b>NT</b>	:	Neurotrophin
<b>PARP</b>	:	Poly(ADP-ribose) polymérase
<b>pb</b>	:	Paire de Bases
<b>PBS</b>	:	Phosphate Buffer Saline
<b>PCNA</b>	:	Proliferating Cell Nuclear Antigen
<b>PDGF</b>	:	Platelet Derived Growth Factor
<b>PMSF</b>	:	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluorure
<b>PSD</b>	:	post-synaptic density protein
<b>qsp</b>	:	quantité suffisante pour
<b>Rb</b>	:	Retinoblastoma Gene Product
<b>RE</b>	:	récepteurs des oestrogènes
<b>RIP</b>	:	ribosome-inactivating protein
<b>RPg</b>	:	récepteurs de la progestérone
<b>RSK</b>	:	pp90 ribosomal S6 kinase (Ser/Thr kinase)
<b>SAB</b>	:	sérumalbumine bovine
<b>SAPK</b>	:	stress-activated protein kinase
<b>SDS</b>	:	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>SDS-PAGE</b>	:	Electrophorèse en Gel de PolyAcrylamide en présence de SDS
<b>SHP-2</b>	:	(SH2-containing tyr)-1 phosphatase

<b>SNT</b>	:	Suc1-associated neurotrophic factor target
<b>SOS</b>	:	son of sevenless
<b>SVF</b>	:	Serum de Veau Fœtal
<b>TBS</b>	:	Tris Buffer Saline
<b>TBS-T</b>	:	Tris Buffer Saline-Tween
<b>TGF</b>	:	Transforming Growth Factor
<b>TNF</b>	:	Tumor Necrosis Factor
<b>TRADD</b>	:	TNFR associated death domain
<b>TRAF</b>	:	TNFR associated factor
<b>Tris</b>	:	Tris (hydroxymethyl) aminométhane

## **Résumé**

Le nerve growth factor (NGF) est le facteur de croissance neurotrophique par excellence. Nous avons démontré que le NGF est un puissant mitogène pour les cellules de cancer du sein mais qu'il n'a pas d'effet sur la croissance des cellules épithéliales mammaires normales. Nous avons également mis en évidence l'activité anti-apoptotique du NGF sur les cellules mammaires cancéreuses. Nous avons ensuite étudié les mécanismes de signalisations responsables de l'effet mitogène et de l'effet anti-apoptotique du NGF. Nos résultats démontrent que le NGF active les récepteurs TrkA et les MAP-kinases pour stimuler la prolifération et active p75 et le facteur de transcription NF-κB pour inhiber l'apoptose. Nous avons donc démontré que le NGF emprunte deux voies de signalisation bien distinctes pour aboutir à ces deux effets biologiques. Nous avons enfin mesuré par RT-PCR quantitative en temps réel, l'expression des ARNm des récepteurs du NGF, TrkA et p75, sur une série de biopsies de cancers du sein. Nos résultats montrent que l'expression importante du récepteur TrkA est associée à une survie prolongée des patientes. L'ensemble de notre travail montre pour la première fois que le NGF est impliqué dans le développement du cancer du sein et ouvre de nouvelles perspectives pour le pronostic et le traitement de cette pathologie.

## *Introduction*

---

Le nerve growth factor (NGF) est connu pour son implication dans le développement, la différenciation et la régénération du système nerveux. Depuis sa découverte en 1951, le NGF fait l'objet de nombreuses études qui ont progressivement permis sa purification et son séquençage en 1962, le séquençage du premier de ses récepteurs en 1986 et l'identification du récepteur tyrosine kinase Trk en 1991. Il est actuellement beaucoup étudié dans le cadre des maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer ou Parkinson. Cependant, le NGF possède également des activités non neurotrophiques telles qu'une régulation de la prolifération, de la migration ou de la survie de quelques types cellulaires non neuronaux.

L'implication du NGF dans la croissance des tumeurs extérieures au système nerveux a été étudiée presque exclusivement dans le cancer de la prostate. Les exemples d'études du NGF dans la glande mammaire sont très peu nombreux. Wright et Gaull (1983) ont montré la présence de NGF dans le lait humain et on retrouve également le NGF dans le sein autour des implants mammaires (Lossing et Hansson, 1992).

Chez la femme, le cancer du sein est de loin le plus important avec 25 à 30 000 nouveaux cas et 10 000 décès par an en France. De nombreux facteurs pronostiques ont été associés à cette pathologie, parmi lesquels la présence d'oncogènes mutés ou amplifiés qui correspondent souvent à des gènes codant pour des facteurs de croissance et leurs récepteurs. Ces modifications géniques peuvent être à l'origine de la rupture de l'équilibre existant entre prolifération et mort cellulaire dans la glande mammaire normale et au dérèglement de la croissance cellulaire observés dans le cancer.

Un aspect essentiel des recherches réalisées dans le domaine du cancer du sein concerne le diagnostic. En effet, la stabilisation de la mortalité observée ces dernières années est due au dépistage de plus en plus précoce qui permet une prise en charge rapide. Les objectifs de recherche principaux dans le traitement du cancer sont d'augmenter la réponse immune contre les cellules tumorales, d'inhiber l'angiogenèse, de normaliser le cycle cellulaire et donc la prolifération, et d'induire spécifiquement l'apoptose des cellules cancéreuses.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons recherché dans un premier temps quels étaient les effets biologiques du NGF sur les cellules de cancer du sein, en mettant en évidence, dans un second temps, les voies de signalisation empruntées par le NGF pour aboutir à son action mitogène ainsi qu'à son effet anti-apoptotique. Enfin, nous nous sommes attachés à

déterminer les variations d'expression des ARN messagers des récepteurs du NGF dans une série de 363 biopsies de cancers du sein ainsi que dans des cellules cancéreuses en culture afin de mieux connaître le mécanisme d'action du NGF et son influence sur le développement du cancer du sein.

L'ensemble de ce travail a permis de mettre en évidence pour la première fois le rôle du NGF et de ses récepteurs dans le cancer du sein, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour le diagnostic/pronostic ainsi que pour le traitement de cette pathologie.

Ces travaux ont fait l'objet des communications et publications suivantes :

### **Communications orales :**

**Descamps S., Lebourhis X., Delehedde M., Boilly B. Hondermarck H.** "Le NGF est mitogène pour les cellules épithéliales mammaires cancéreuses humaines, mais pas pour les cellules normales".

Club "Facteurs de Croissance" (Société Française du Cancer), Villejuif, 27 janvier 1999 :

**Descamps S., Lebourhis X., Pawlowski V., Boilly B., Peyrat J.P., Hondermarck H.** "Effet mitogène du Nerve Growth Factor sur les cellules de cancer du sein".

Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et Biologie Moléculaire, Nice, 21-23 juin 1999

### **Posters :**

**Descamps S., Lebourhis X., Boilly B. Hondermarck H.** "Mitogenic effect of Nerve Growth Factor for human breast cancer cells".

FEBS'99, Nice, 19-24 juin 1999.

**Descamps S., Lebourhis X., Boilly B. Hondermarck H.** "Le nerve growth factor est mitogène pour les cellules decancer du sein".

Association pour la Recherche contre le Cancer, Journée des Boursiers, Villejuif, 16 Novembre 1999.

**Descamps S., Pawlowski V., Hornez L., Révillion F., Boilly B., Hondermarck H., Peyrat J.P.** "Expression of nerve growth factor receptors in breast cancer cells and biopsies".

American Association for Cancer Research, 91<sup>st</sup> Annual Meeting, San Francisco, 1-5 Avril 2000.

### **Publications :**

**Descamps S., Lebourhis X., Delehedde M., Boilly B., and Hondermarck H.** (1998). Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 273(27) : 16659-16662.

Hondermarck H., Lebourhis X., Boilly B., **Descamps S.** (1998). Le NGF fait son entrée dans le cancer du sein. *Médecine Sciences* 14 : 1125-1126.

**Descamps S., Toillon R., Adriaenssens E., Pawlowski V., Boilly B., Peyrat J.P., Hondermarck H.** (2000). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of breast cancer cells through two distinct signaling pathways. Soumis dans *J. Biol. Chem.*

**Descamps S., Pawlowski V., Hornez L., Révillion F., Hebbar M., Boilly B., Hondermarck H., Peyrat J.P.** (2000). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. Soumis dans *Cancer Res.*

## *Généralités*

---

Le facteur de croissance du nerf ou nerve growth factor (NGF), mis en évidence en 1951 et séquencé en 1962, est le premier facteur de croissance à avoir été caractérisé et a valu à Rita Levi-Montalcini le prix Nobel de physiologie et médecine en 1986. C'est un facteur neurotrophique, ce qui signifie, d'après la définition classique, qu'il s'agit d'une protéine soluble endogène qui régule la survie à long terme et la différenciation des neurones (Barde, 1989). Les facteurs neurotrophiques sont des molécules de signalisation importantes à la fois pour le développement et pour le maintien de l'intégrité structurale des systèmes nerveux central et périphérique, ce qui en fait de bons candidats comme agents thérapeutiques dans les maladies neurodégénératives. Plus récemment, des effets non neurotrophiques du NGF ont également été reportés et concernent la régulation de la prolifération, de la survie et de la migration cellulaires. Nous présentons ici les connaissances actuelles concernant la structure du NGF et de ses récepteurs et les voies de signalisation. Nous décrirons ensuite les différents effets biologiques du NGF ainsi que l'implication de ce facteur dans les processus de cancérisation. Enfin, nous nous intéresserons à la glande mammaire normale et cancéreuse qui constituera le modèle sur lequel les travaux de cette thèse ont été réalisés.

# I – Caractéristiques structurales du NGF et de ses récepteurs

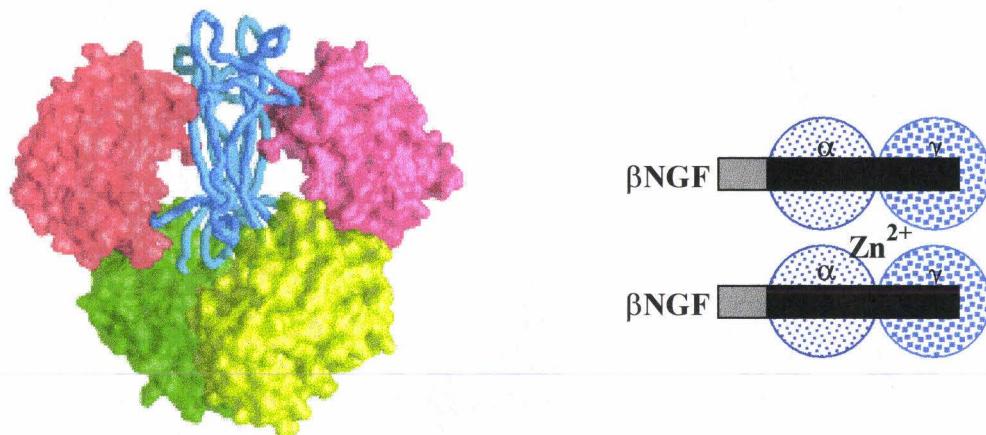
## I.1. – STRUCTURE DU NGF

Les facteurs de croissance de la famille des neurotrophines sont des molécules apparentées structurellement et fonctionnellement au NGF. A l'heure actuelle, six membres ont été identifiés. Il s'agit du NGF, du brain-derived growth factor (BDNF), et des neurotrophines (NT) 3, 4/5, 6 et 7 qui ont en commun environ 50 % de leur séquence en acides aminés. Chacun des gènes des neurotrophines code pour une séquence mature d'approximativement 120 acides aminés, riche en résidus basiques (Gotz *et al.*, 1994 ; Angeletti et Bradshaw, 1971 ; Hohn *et al.*, 1990 ; Leibrock *et al.*, 1989 ; Maisonpierre *et al.*, 1990). Sur les 24 séquences de neurotrophines qui ont pu être déterminées, seuls 28 acides aminés sont invariants (Bradshaw *et al.*, 1994). Ce sont des molécules qui agissent en activant des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase. Trois récepteurs Trk ont été isolés chez les vertébrés ainsi que de nombreux variants structuraux (Barbacid, 1994). Chaque neurotrophine se lie préférentiellement à son récepteur spécifique mais peut également interagir avec d'autres membres de la famille Trk (Chao, 1992). Le NGF se lie à TrkA, le BDNF et la NT-4/5 sont les ligands privilégiés de TrkB (Klein *et al.*, 1992), la NT-3 est le ligand de TrkC, mais la NT-3 et la NT-4/5 peuvent aussi se lier à TrkA (Ip *et al.*, 1993, Berkemeier, 1991). (figure 1). Toutes les neurotrophines peuvent également se lier au récepteur p75 (Rodriguez-Tebar *et al.*, 1992).

Dans la glande sous-maxillaire de souris, le NGF actif (beta-NGF) fait partie d'un complexe protéique plus important, le NGF 7S. Ce complexe possède une stochiométrie de type alpha<sub>2</sub> betagamma<sub>2</sub> (+ 1 ou 2 ions zinc) (figure 2) ou les sous-unités alpha et gamma sont des séries protéases de la famille des kallikréines glandulaires ayant chacune une masse moléculaire d'environ 26000 kDa. Les sous-unités alpha et gamma inhibent l'action du β-NGF et doivent être dissociées pour permettre son activité biologique. Cependant, ce complexe 7S n'a pu être observé dans aucun autre tissu murin ni chez d'autre espèces, probablement parce que les sous-unités alpha et gamma qui appartiennent à une grande famille de kallikréines n'ont qu'une expression très restreinte. Ces sous-unités alpha et gamma ont des séquences en acides aminés très proches, mais seule la sous-unité gamma

possède une activité catalytique. La sous-unité alpha a subi plusieurs mutations qui empêchent cette activité, notamment la perte du site de clivage nécessaire à la maturation du zymogène en forme active. Le NGF 2,5S est un dimère constitué de deux sous-unités identiques de  $\beta$ NGF liées par des ponts non covalents et d'une masse moléculaire d'environ 26 kDa (Bocchini et Angeletti, 1996).

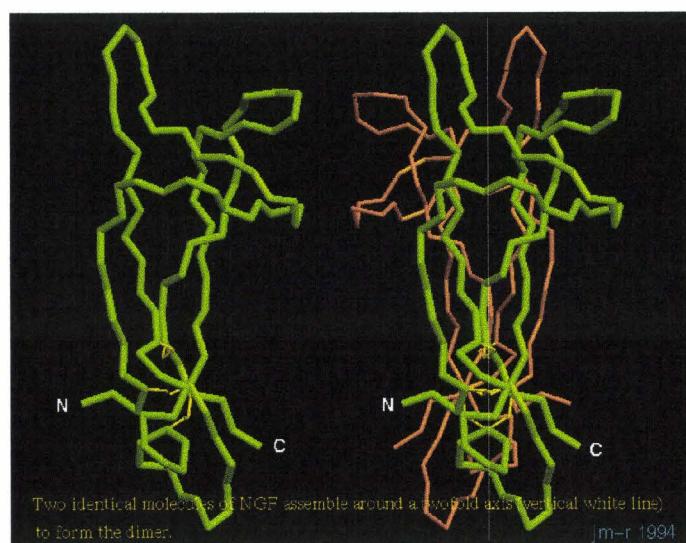
La séquence en acides aminés et la structure du NGF ont été caractérisées (Hogue-Angeletti et Bradshaw, 1971) et montrent que cette neurotrophine est une molécule très conservée qui possède une grande homologie d'une espèce à l'autre (Gotz et Schartl, 1994). Un certain nombre d'études a montré que le gène du NGF se trouve sur le bras court du chromosome 1 chez l'homme (Francke *et al.*, 1983 ; Scott *et al.*, 1983)



**Figure 2 :** Le NGF 7S. A) Structure du complexe cristallisé (d'après Murray-Rust, <http://www.cryst.bbk.ac.uk/>). B) Représentation schématique des NGF  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  associés en complexe (D'après Drinkwater *et al.*, 1988).

La structure cristallisée du NGF 7S a été mise en évidence par Bax *et al.* (1997). Le dimère de  $\beta$ NGF est associé selon une symétrie axiale. Les sous-unités alpha sont en contact avec les sous-unités beta et gamma, mais pas entre elles. Les sous-unités gamma sont très largement en contact l'une avec l'autre et chacune d'elles entre en contact avec une sous-unité alpha par l'intermédiaire d'un ion zinc. La partie C-terminale de chaque sous-unité beta est liée au site actif de la sous-unité gamma. Bien qu'elles aient des séquences très proches, les sous-unité alpha et gamma ne sont pas interchangeables dans le complexe.

La caractérisation moléculaire initiale de la sous-unité beta du NGF a permis de montrer l'organisation de la sous-unité et la séquence en acides aminés du protomère. Le polypeptide le plus long a avoir été isolé possède 118 acides aminés et trois ponts disulfures intrachâînes, mais des chaînes plus courtes tronquées aux deux extrémités ont également été identifiées. Ces formes résultent essentiellement de l'élimination d'un octapeptide amino-terminal (par une autre kallikréine de la glande sous-maxillaire) et d'un résidu arginine C-terminal. Cette modification a aussi pour effet de supprimer les interactions entre sous-unités beta et gamma. Les deux sous-unités beta forment alors un dimère possédant une constante de dissociation ( $K_d$ ) d'environ  $10^{-13}$  M (Figure 3). Le  $\beta$ NGF dimérique possède une structure tertiaire (plissure) qui résulte en une molécule plutôt assymétrique avec des dimensions d'environ  $60 \times 25 \times 30 \text{ \AA}$  (McDonald *et al.*, 1991). Chaque monomère de  $\beta$ NGF comporte 2 paires de feuillets  $\beta$  anti-parallèles qui contribuent à la forme aplatie et allongée de la molécule (Figure 4). Ces feuillets  $\beta$  sont connectés à une extrémité du protomère par 3 petites boucles qui sont connues pour être très flexibles au niveau de leur conformation (McDonald *et al.*, 1991 ; Holland *et al.*, 1994). Vers l'extrémité opposée du protomère, les trois ponts disulfures sont groupés et procure une certaine rigidité à cette portion de la molécule. L'arrangement topologique des ponts disulfures est assez inhabituel. Deux des ponts forment avec les résidus alentours une structure en anneau ( $\text{Cys}^{58}\text{-Cys}^{108}$ ,  $\text{Cys}^{68}\text{-Cys}^{110}$ ) à travers laquelle passe le troisième pont ( $\text{Cys}^{15}\text{-Cys}^{80}$ ) pour former un motif compact riche en cystine(cystine knot) (revue dans McDonald et Chao, 1995).



**Figure 3:** Les monomères de  $\beta$ NGF (à gauche) s'associent selon une symétrie axiale (axe vertical blanc) pour former un dimère (à droite). (D'après Murray-Rust, <http://www.cryst.bbk.ac.uk/>).

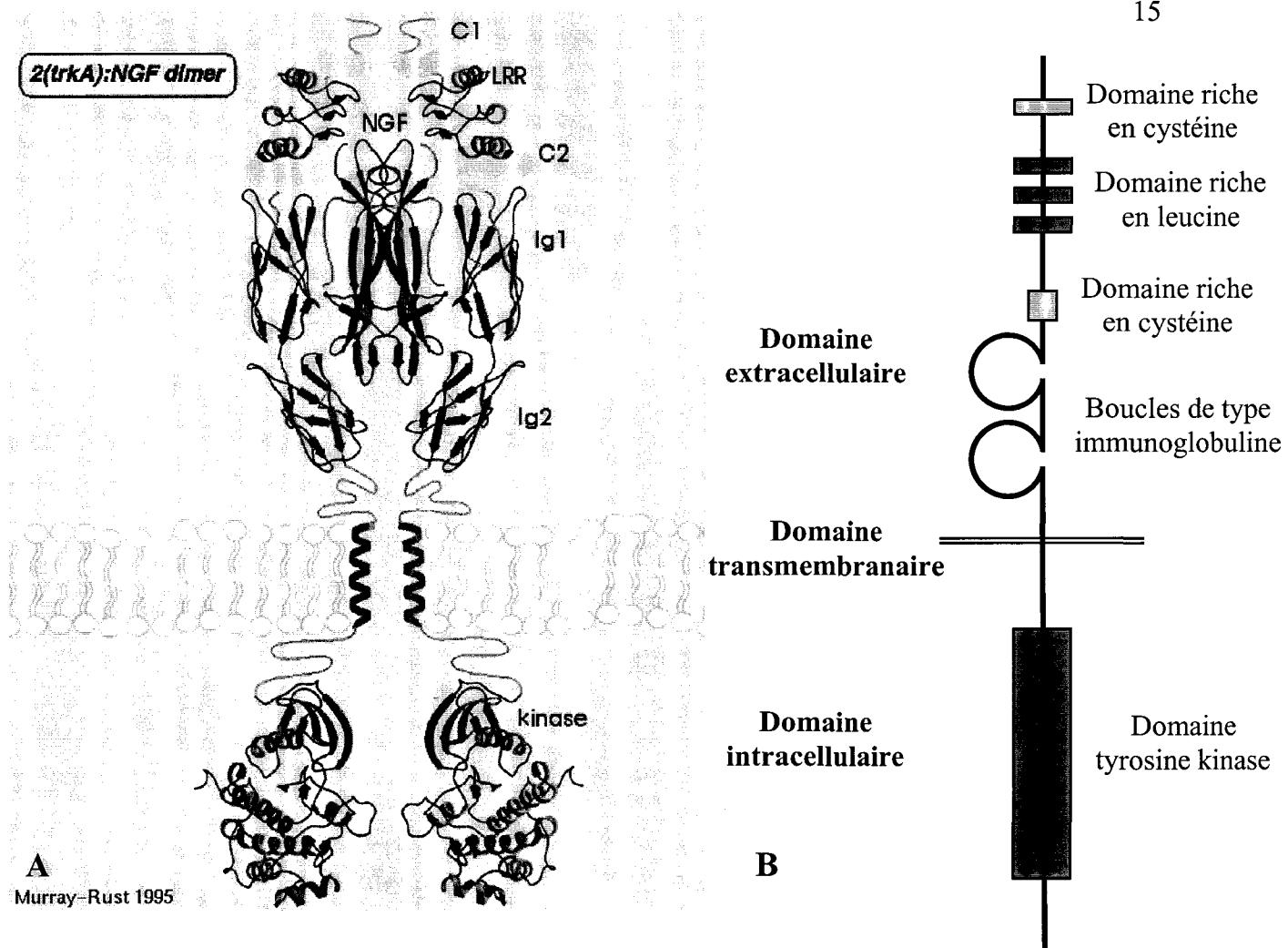
## I.2 – Le récepteur tyrosine kinase TrkA

### 1) Introduction

TrkA est membre de la superfamille des récepteurs tyrosine kinase (RTK). A l'origine, il a été mis en évidence sous la forme d'une protéine de fusion dans laquelle les 392 résidus N-terminaux étaient remplacés par des séquences de la tropomyosine conduisant à une activation constitutive. Les analyses moléculaires ont par la suite révélé que le gène humain normal codait pour un RTK glycosylé de 790 acides aminés considéré longtemps comme un récepteur orphelin. Ce n'est qu'en 1991, que son activation par le NGF fut mise en évidence dans les cellules de phaeochromocytome de rat PC12 et des fibroblastes transfectés avec TrkA (Kaplan *et al.*, 1991 ; Klein *et al.*, 1991).

### 2) Caractéristiques structurales

Le domaine extracellulaire de TrkA contient un domaine riche en leucine (domaine 2) pris en sandwich entre deux domaines riches en cystéines, suivis de deux domaines de type immunoglobuline (Ig; domaines 4 et 5) (Schneider et Schweiger, 1991). TrkA comprend également un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire constitué d'un domaine tyrosine kinase typique des RTK incluant un petit insert et une petite queue C-terminale de 15 résidus. Le domaine extracellulaire de TrkA contient également plusieurs sites de glycosylation (Barbacid, 1995 ; Watson *et al.*, 1999 ; revue dans Bradshaw et Hondermarck, 1996). La protéine TrkA non glycosylée n'atteint pas la surface cellulaire et peut être autoactivée, ce qui n'induit cependant pas la différenciation neuronale. La glycosylation semble donc réguler à la fois la localisation membranaire de TrkA et son activation spontanée (Watson *et al.*, 1999) (figure 5). Les trois loci de *trk* peuvent donner naissance à des isoformes par splicing alternatif (figure 1). Le locus *trkA* code pour deux isoformes qui diffèrent seulement d'une insertion de 18 bp dans le domaine extracellulaire. Après transfection dans des fibroblastes, la présence (*trkA* II) ou l'absence (*trkA* I) de l'insert de 6 acides aminés n'affecte ni la liaison du NGF ni la capacité de transduction du récepteur. L'isoforme *trkA* II est exclusivement exprimé dans le système nerveux, alors que les tissus non-neuronaux expriment les deux isoformes (Barker *et al.*, 1993). Contrairement à *trkA*, les loci *trkB* et *trkC* codent pour des récepteurs qui diffèrent au niveau de leur domaine cytoplasmique (Valenzuela *et al.*, 1993 ; Middlemas *et al.*, 1991).



**Figure 5 :** Le récepteur tyrosine kinase du NGF, TrkA. A) Modélisation du dimère formé en présence de NGF (d'après Murray-Rust, <http://www.cryst.bbk.ac.uk/>). B) Structure schématique de TrkA.

### 3) Interactions NGF/TrkA

Il a été suggéré que les domaines de type IgG de TrkA portent les déterminants de liaison au NGF (Urfer *et al.*, 1995 ; Pérez *et al.*, 1995) et le domaine Ig2 peut lier le NGF avec une affinité similaire à celle du récepteur natif. De plus, le domaine Ig2 est suffisant pour une activation neurotrophine-dépendante du domaine kinase intracellulaire (Urfer *et al.*, 1995). Une étude par mutagenèse a également permis l'identification de résidus de la région amino-terminale du NGF nécessaires à sa liaison au récepteur TrkA et à son activité biologique (Shih *et al.*, 1994).

Au contraire, très peu de mutations ponctuelles à l'intérieur du NGF perturbent la liaison à TrkA, ce qui suggère que cette interaction implique un grand nombre de contacts (Ibanez *et al.*, 1993 ; Bradshaw *et al.*, 1994 ; Urfer *et al.*, 1994). Les études menées avec des NGF tronqués dans leur domaine N-terminal (Kahle *et al.*, 1992), des NGF portant des mutations site-spécifiques (Shih *et al.*, 1994) et de nouvelles neurotrophines chimères (Ibanez *et al.*, 1993 ; Treanor *et al.*, 1995) ont permis de montrer l'importance du domaine N-terminal dans la liaison du NGF à TrkA. De la même manière, on a montré que les résidus 112-118 du domaine C-terminal du NGF joueraient un rôle moins spécifique dans la liaison à TrkA (Ibanez *et al.*, 1993 ; Drinkwater *et al.*, 1993). Des expériences analogues menées avec des neurotrophines chimères de BDNF et NT-3 ont au contraire démontré que leur domaine N-terminal n'est pas essentiel à la liaison à leur récepteurs (Ibanez *et al.*, 1993 ; Urfer *et al.*, 1994). D'autres points de contact existent entre le NGF et TrkA au niveau des boucles en épingle à cheveux  $\beta$  du NGF, avec les résidus 31 et 40-49 (en particulier Glu<sup>41</sup> et Asn<sup>45</sup>) ainsi que les résidus 91-97 (Ibanez *et al.*, 1993 ; Ilag *et al.*, 1994). La flexibilité intrinsèque de ces boucles ainsi que les domaines N- et C-terminaux du NGF et leur apparente importance pour les interactions avec TrkA (McDonald *et al.*, 1991 ; Holland *et al.*, 1994) suggèrent que des changements conformationnels interviennent lors de la formation du complexe NGF-TrkA actif. D'autres régions moins flexibles de la structure du NGF sont également importantes, en particulier plusieurs résidus accessibles de la surface du NGF à l'intérieur des feuillets  $\beta$  3 et 4 de la structure principale du NGF (Ibanez *et al.*, 1993).

L'activation de la voie de signalisation de TrkA suit le schéma classique des récepteurs tyrosine kinase (revue dans Ullrich et Schlessinger, 1990). Dimérisation du récepteur induite par le ligand, activation initiale de l'activité kinase et phosphorylation de résidus tyrosine dans la boucle d'activation (activation loop) suivies de l'activation complète de la kinase et de la phosphorylation des résidus kinase à l'extérieur de la boucle d'activation. Les molécules de signalisation se lient ensuite aux résidus dernièrement phosphorylés avant d'être phosphorylées et activées pour propager le signal par des mécanismes qui font entrer les molécules activées par les récepteurs dans des cascades des voies de signalisation indépendantes des récepteurs (figure 6).

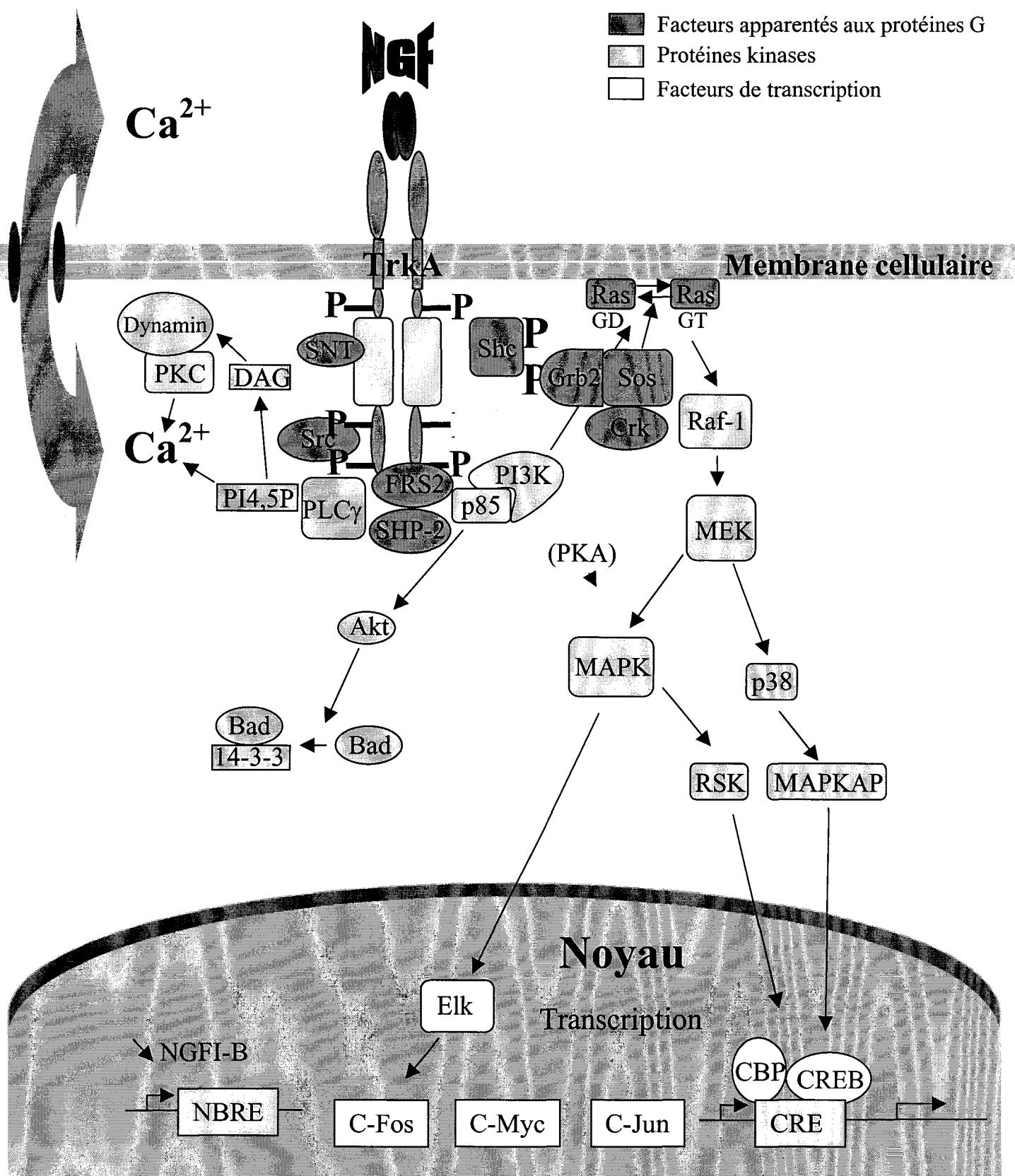


Figure 6 : Principales voies de signalisation du NGF médiées par TrkA.

#### 4) Autophosphorylation de TrkA

Les expériences menées avec des formes de récepteurs TrkA dominant-négatifs à kinase inactive ont montré la nécessité des interactions Trk-Trk induites par le ligand (Jing *et al.*, 1992). On ne sait cependant pas si ce mécanisme implique la formation de dimères *de novo* et/ou le changement de conformation de dimères préexistant pour permettre l'autophosphorylation des récepteurs. La symétrie du NGF est supposée regrouper des récepteurs isolés afin de permettre leur dimérisation et leur activation par un mécanisme d'autophosphorylation (Jing, *et al.*, 1992 ; Kaplan et Stephens, 1994). Cette dimérisation de TrkA semble requérir les domaines de type immunoglobulines extracellulaires qui sont également nécessaires à la liaison du NGF (Perez *et al.*, 1995 ; Urfer *et al.*, 1995). L'activité tyrosine kinase de TrkA et des autres membres de la famille Trk peut être inhibée par l'alkaloïde K-252a et ses dérivés (Tapley *et al.*, 1991 ; Camoratto *et al.*, 1997).

TrkA semble avoir une capacité d'activation indépendante du ligand assez forte, probablement due à des interactions spontanées. Ainsi, la surexpression de TrkA entraîne son autophosphorylation en l'absence de neurotrophine (Hempstead *et al.*, 1992). De plus, des glycolipides tels que les gangliosides, qui sont des sphingolipides contenant des acides sialiques et sont des composants de la membrane plasmique de beaucoup de cellules de vertébrés, de même que les céramides, qui sont des dérivés métaboliques de la sphingomyéline, semblent pouvoir induire une autophosphorylation de TrkA indépendante du ligand en augmentant les interactions Trk-Trk (Ferrari *et al.*, 1995 ; Mutoh *et al.*, 1995 ; MacPhee et Barker, 1999). Une étude récente suggère également que des gangliosides endogènes seraient nécessaires à l'activation ligand-dépendante de TrkA. L'inhibition de la glucosylcéramide synthase, qui prive la cellule de glycosphingolipides, résulte en la perte de la signalisation de TrkA dans les cellules PC12 et est annulée par l'ajout de monosialoganglioside GM1 exogène (Mutoh *et al.*, 1998).

Des études menées avec des formes mutées de TrkA humain ont montré que l'activation maximale suivant la liaison du ligand nécessite l'autophosphorylation des résidus tyrosine 670, 674 et 675 (Cunningham *et al.*, 1997) qui se trouvent dans la boucle d'activation. Cunningham et Greene (1998) suggèrent un modèle structure-fonction pour l'activation de TrkA : dans l'état non lié au ligand, la boucle d'activation bloque l'accès des substrats aux sites actifs du domaine kinase. La liaison du ligand permettrait l'autophosphorylation des résidus tyrosines de la boucle d'activation. Une fois phosphorylée, chacune de ces tyrosines va interagir avec les charges positives alentour et stabiliser la boucle

d'activation dans une conformation "ouverte" qui libère l'accès des substrats au domaine kinase. Cette conformation ouverte permet effectivement la phosphorylation de cibles inter- et intramoléculaires. Trois résidus tyrosines semblent essentiels aux interactions de TrkA avec les substrats qu'il active. Il s'agit de Y490, Y785 et Y751 qui interagissent avec des cibles spécifiques, induisant des voies de signalisation différentes.

### 5) Voie Ras/Raf/MAPK

De nombreuses molécules interviennent dans la mise en place du complexe qui se forme lors de l'activation d'un récepteur tyrosine kinase. Les molécules suivantes sont impliquées dans l'activation par le NGF de la voie MAP-kinase.

La tyrosine phosphorylée Y490 (pY490) est impliquée dans la signalisation directe de TrkA. Ce site induit la liaison de Shc et active sa tyrosine phosphorylation (Stephens *et al.*, 1994 ; Obermeier *et al.*, 1994). Ceci mène à l'interaction de Shc phosphorylé avec le complexe Grb2-Sos qui va lui-même participer à l'activation de Ras (Basu *et al.*, 1994). Bien qu'on ait d'abord pensé que Shc interagissait avec TrkA par l'intermédiaire de son domaine SH2 (Src homology 2), des analyses mutationnelles ont montré que l'interaction se ferait plutôt grâce au domaine PTB (phosphotyrosine binding) de Shc (Dikic *et al.*, 1995). Dans les neurones sensoriels en culture, plusieurs isoformes de ShcA et un isoforme de ShcC sont phosphorylés en réponse au NGF (Ganju *et al.*, 1998) et deux autres analogues de Shc, N-Shc et Sck, semblent participer à la signalisation des neurotrophines dans le cerveau (Nakamura *et al.*, 1998). On ne sait cependant pas si ces différentes formes de Shc et ses analogues ont des fonctionnalités différentes.

La protéine Grb-2 forme un complexe avec la protéine Sos par ses domaines SH3. Lors de l'activation du récepteur TrkA, le complexe cytoplasmique Grb-2/Sos est recruté à la membrane cellulaire et se lie, par l'intermédiaire du domaine SH2 de Grb-2, à la protéine Shc qui se trouve elle-même associée à TrkA. La protéine Sos est un facteur d'échange, activateur de Ras (Kaplan *et al.*, 1994).

La surexpression de la kinase Csk (Csk homologous kinase) qui se lie à la phosphotyrosine pY785 de TrkA augmente l'activation de la voie MAP-kinase induite par le

NGF (Yamashita *et al.*, 1999) et pourrait expliquer la redondance qui existe entre les tyrosines Y490 et Y785 lors de l'activation de la voie Ras par le NGF (Stephens *et al.*, 1994).

Récemment a été identifiée et clonée une nouvelle protéine adaptatrice (FRS2) ancrée à la membrane et tyrosine phosphorylée en réponse au NGF, au FGF (Kouhara *et al.*, 1997) et au BDNF (Easton *et al.*, 1999). La protéine FRS2 phosphorylée semble activer la voie Ras/ERK en formant un complexe avec la tyrosine phosphatase SHP-2, Grb-2/Sos et Crk (Kouhara *et al.*, 1997 ; Xu *et al.*, 1998). Meakin *et al.* (1999) ont récemment montré que FRS2 se liait à la Y490 du TrkA humain, alors que dans le cas du FGF, elle se lierait à un motif juxtamembranaire du récepteur.

TrkA peut aussi stimuler la phosphorylation de substrats qui ne nécessitent pas les phosphotyrosines Y490 et Y785. C'est le cas de la protéine SNT (suc-associated neurotrophic factor-induced tyrosine-phosphorylated target) qui est rapidement phosphorylée en réponse au NGF et ceci même en l'absence des pY490 et pY785 et de leur voies de signalisation associées (Rabin *et al.*, 1993 ; Peng *et al.*, 1995). FRS2 et SNT ont d'abord été décrites comme étant une seule et même protéine (Kouhara *et al.*, 1997) mais SNT semble être essentiellement nucléaire (Rabin *et al.*, 1993) alors que FRS2 est associée à la membrane plasmique. La séquence de SNT n'ayant pas encore été déterminée, on ne connaît pas le degré de parenté entre les deux protéines. Il semblerait que SNT se lie à un domaine juxtamembranaire de TrkA nécessaire à sa phosphorylation et à la croissance des neurites mais indépendant de la PLC $\gamma$ , de la PI3K et de la voie Ras/ERK (Peng *et al.*, 1995).

Deux autres substrats de TrkA contenant un domaine SH-2 sont présents dans les PC12 et les neurones. Ces protéines rAPS et SH2-B, de type adaptatrices, lient Grb2 et permettent l'activation de la voie Ras/ERK ainsi que la différenciation neuronale (Qian *et al.*, 1998). Elles semblent nécessaires au mécanisme de signalisation de TrkA, mais on ne sait pas encore à quel niveau elles interagissent avec le récepteur.

La protéine adaptatrice Crk interagit avec les complexes TrkA en présence de NGF (Torres et Bogenmann, 1996) et est alors tyrosine phosphorylée (Ribon et Saltiel, 1996). On ne sait pas comment Crk s'associe à TrkA, mais une fois activée, elle s'associe à Sos et C3G (Matsuda *et al.*, 1994) et grâce à cette dernière mène à l'activation de la petite protéine G Rap1 (York *et al.*, 1998) qui elle-même va se complexer et activer B-Raf pour activer ERK.

D'autre part, Goldsmith et Koizumi (1997) ont montré que la tyrosine phosphatase SHP-2 est rapidement tyrosine phosphorylée en réponse au NGF, peut-être par l'intermédiaire de FRS2 ou d'une glycoprotéine membranaire tyrosine phosphorylée par le NGF (BIT : brain immunoglobulin-like molecule with tyrosine-based activation motifs) et qui se complexerait à SHP-2 pour l'activer (Ohnishi *et al.*, 1999), ce qui contribue à l'activation de la voie MAPK/ERK (Wright *et al.*, 1997).

Les membres de la famille Src interagissent également avec Trk. Alors que la protéine c-src est tyrosine phosphorylée en présence de NGF dans les cellules PC12 (Sato *et al.*, 1998), dans les lignées cellulaires non neuronales, le NGF stimulerait plutôt une protéine de la même famille appelée c-Yes (Marchetti *et al.*, 1998). La microinjection d'anticorps anti-Src perturbe la croissance de neurites induite par le NGF dans les PC12 ainsi que l'activation de la voie Ras (Kremer *et al.*, 1991). Le site de liaison des protéines de la famille Src sur le récepteur Trk n'est pas encore déterminé.

Le complexe formé par TrkA et les protéines décrites ci-dessus, et en dernier lieu Grb-2 et Sos, conduit à l'activation de la protéine p21<sup>ras</sup> qui joue un rôle central dans la transmission des signaux engendrés par TrkA en réponse au NGF (Kaplan *et al.*, 1994). Ras est activée et stabilisée avec une molécule de GTP (guanosine tri-phosphate) (Qiu et Green, 1991 ; Muroya *et al.*, 1992). Une fois activée, la protéine Ras se lie aux sérine-thréonine kinases de la famille Raf : Raf-1 et B-Raf, provoquant ainsi leur translocation à la membrane plasmique (Vojtek *et al.*, 1993). Les protéines Raf, alors activées, phosphorylent et activent les mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKK ou MEK) qui elles-même phosphorylent et activent les mitogen-activated protein kinases (MAPK) encore appelées extracellular signal-regulated kinases (ERK) (Boulton *et al.*, 1991 ; Oshima *et al.*, 1991 ; Dent *et al.*, 1992 ; Davies, 1993 ; Moodie *et al.*, 1993). La phosphorylation de la MAPK ne conduit pas seulement à son activation mais aussi à sa translocation au noyau où d'autres événements de phosphorylation/activation ont lieu, comme par exemple l'activation de la S6 kinaseII (Scimeca *et al.*, 1992) ou de la p38. Cette voie de signalisation conduit au noyau où elle induit l'expression de gènes et la synthèse de protéines spécifiques. La stimulation par le NGF conduit à l'expression de gène à expression précoce (immediate early genes) tels que *myc*, *fos*,

*jun*, *src* ou d'autres gènes TIS de réponse rapide (primary-response-tetradecanoyl phorbol acetate-inducible sequences-genes) (Greenberg *et al.*, 1985 ; Kujubu *et al.*, 1987 ; Wu *et al.*, 1989 ; Altin *et al.*, 1991) qui ne sont cependant pas spécifiques du NGF.

### 6) Voie PI3-kinase/Akt

Le domaine kinase de TrkA comporte une séquence consensus de liaison de la PI3K aux RTK. Obermeier *et al.* (1993) ont suggéré que cette séquence intervenait dans l'activation de la PI3K induite par le NGF. Cependant, l'autophosphorylation de ce site consensus n'a pas encore pu être montrée et l'activation de la PI3K n'est pas perturbée par sa mutation. Dans les cellules PC12, le NGF stimule la phosphorylation d'une protéine de type IRS (insulin receptor substrate) appelée Grb-associated binder-1 (Gab-1) qui va alors s'associer et activer la PI3K (Rother *et al.*, 1998).

La PI3K est impliquée dans la signalisation des neurotrophines, notamment lors de la croissance de neurites et la survie des neurones sympathiques (Crowder et Freeman, 1998). Dans ce dernier cas, la PI3K active la kinase AKT en phosphorylant l'enzyme sur un résidu sérine ( $\text{Ser}^{473}$ ) (Franke *et al.*, 1997). La sérine/thréonine kinase Akt activée peut phosphoryler ses différents substrats. Parmi eux, le membre de la famille Bcl-2, Bad, une protéine pro-apoptotique qui se lie et inhibe la molécule anti-apoptotique Bcl-2 lorsque Bad n'est pas phosphorylée (Datta *et al.*, 1997). Phosphorylée, Bad est sequestrée dans le cytoplasme sous la forme d'un complexe avec la protéine 14-3-3 (De la Coste et Perret, 1997). Un autre substrat important d'Akt est la protéase de mort caspase-9 (Cardone *et al.*, 1998). La phosphorylation par Akt de la caspase-9 diminue l'apoptose en inhibant directement son activité protéase.

### 7) Voie PLC $\gamma$ /PKC

La pY785 de TrkA se trouve à l'intérieur d'un site consensus de liaison des récepteurs tyrosine kinase au domaine SH2 de la phospholipase C-gamma (PLC $\gamma$ ). Elle est nécessaire à la phosphorylation et à l'activation NGF-dépendante de la PLC $\gamma$  ainsi qu'à son interaction avec TrkA (Obermeier *et al.*, 1994). L'activation de la PLC $\gamma$  par le NGF entraîne des modifications du niveau de Ca $^{2+}$  intracellulaire et de l'activité de la protéine kinase C (PKC).

Dans les cellules PC12, le NGF entraîne en quelques minutes un influx de calcium (Nikodijevic et Guroff, 1991) qui passe par un canal unique sensible au NGF et activé par phosphorylation (Nikodijevic et Guroff, 1992). Kozak *et al.* (1992) ont par ailleurs démontré que l'influx de calcium induit par le NGF dans les PC12 est plus important si le niveau de calcium intracellulaire est bas et qu'il est plus faible si le niveau de calcium intracellulaire est élevé. Le NGF inhibe l'influx de calcium dans des cellules dépolarisées, indiquant que l'effet du NGF sur cet influx de calcium peut être bidirectionnel et qu'il a un rôle de régulateur. Dickens *et al.* (1997) ont montré que la PKC $\alpha$  est responsable de l'influx de calcium induit par le NGF dans les cellules PC12. Enfin, le NGF peut contrôler le niveau de calcium intracellulaire en jouant non seulement sur l'influx calcique mais aussi sur le relargage des stocks intracellulaires (De Bernardi *et al.*, 1996).

L'action du NGF sur les flux calciques peut être modulé par la dynamine. Cette protéine est phosphorylé par la PKC à laquelle elle s'associe dans le cytosol. L'entrée de calcium dans la cellule entraîne une translocation rapide de la dynamine vers la membrane plasmique, ce qui bloquerait le site de phosphorylation de la PKC et la rendrait inactive (Liu *et al.*, 1994 ; revue dans McClure et Robinson, 1996).

### I.3 - Le récepteur des neurotrophines p75

Le récepteur de bas poids moléculaire ou de basse affinité ( $p75^{\text{LNGFR}}$  ou  $p75^{\text{NTR}}$ ) a été le premier récepteur du NGF à avoir été structurellement défini et est généralement exprimé en plus grande quantité que le récepteur TrkA. Au contraire des récepteurs Trk, qui sont spécifiques à leur ligands, le récepteur p75 lie toutes les neurotrophines avec des affinités similaires, mais basses (Rodriguez-Tebas *et al.*, 1992 ; Dechant *et al.*, 1997).

#### 1) Caractéristiques structurales

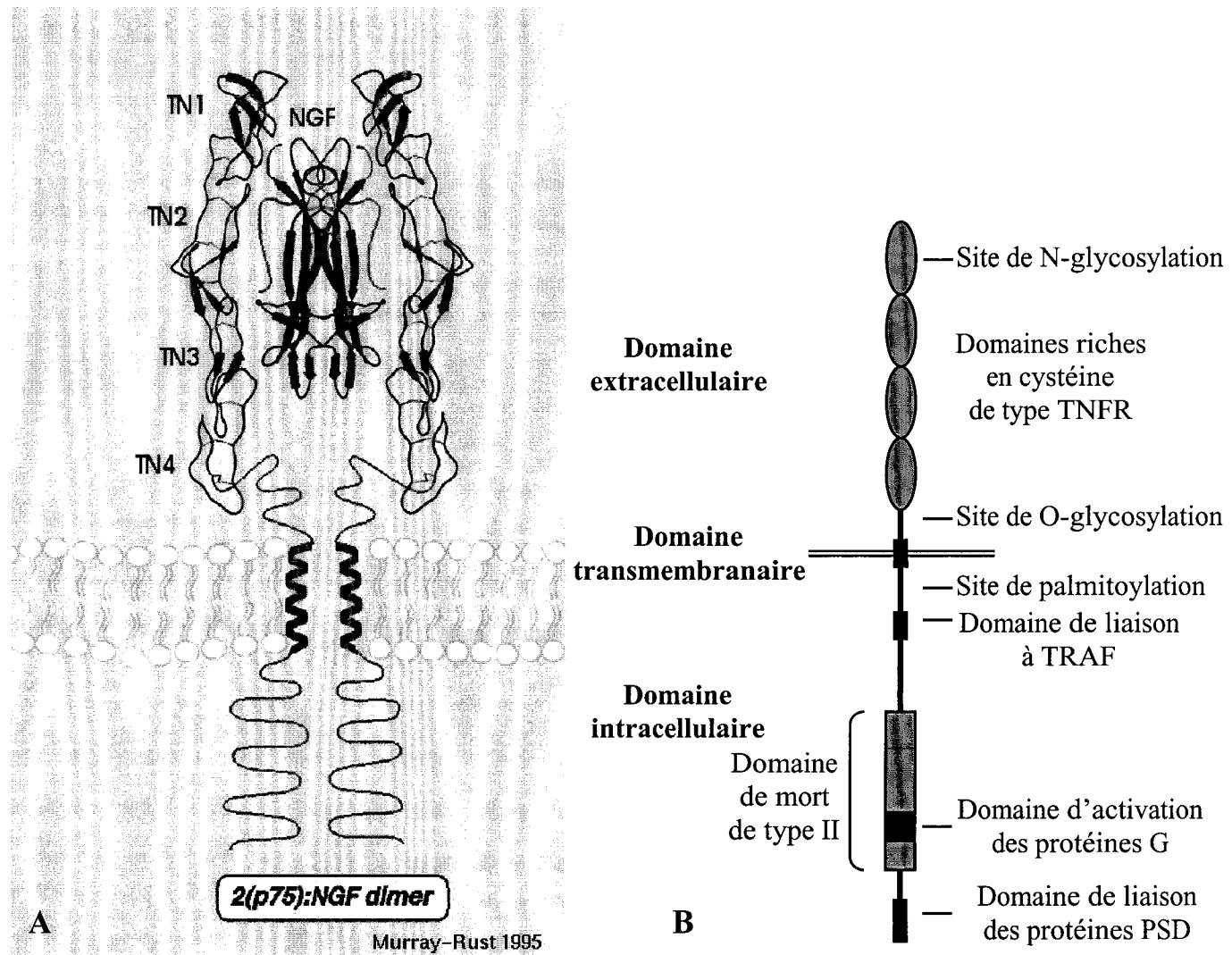
$p75^{\text{NTR}}$  est formé d'une chaîne polypeptidique transmembranaire de 75 kDa. Le domaine extracellulaire possède quatre motifs répétés d'environ 40 acides aminés riches en cystéine caractérisés par trois ponts disulfures (revue dans Bradshaw et Hondermarck, 1996). Ces quatre régions riches en cystéines permettent d'inclure p75NTR dans la superfamille des

récepteurs du TNF (tumor necrosis factor) qui comprend entre autres les récepteurs du TNF de type I et II (TNFRI et TNFRII), l'antigène Fas (connu aussi sous les noms de Apo-1 ou de CD95), CD40, CD30, CD27 et le récepteur de la lymphotoxine  $\beta$  (revue dans Muller et Clos, 1997 ; Baker et Reddy, 1998).

Le domaine intracellulaire de p75 contient une région de 90 résidus dans la queue cytoplasmique appelée domaine de mort (death domain) car ce type de domaine a été d'abord mis en évidence dans le récepteur du TNF ( $p55^{\text{TNFR}}$ ) et Fas, deux récepteurs ayant une activité cytotoxique (Tartaglia *et al.*, 1993). Les alignement de séquences ont permis de séparer les domaines de mort en deux groupes, sur la base d'une homologie dans la première hélice  $\alpha$  et de l'espacement entre les hélices putatives. Le TNF-R1 et Fas font partie du sous-type I et  $p75^{\text{NTR}}$  fait partie du sous-type II (Feinstein *et al.*, 1995). Cette subdivision reflète d'importantes différences structurales : contrairement au domaine de mort du TNF-R1, celui de  $p75^{\text{NTR}}$  ne présente pas d'agrégation ou d'autoassociation (Barker *et al.*, 1995).

Il existe aussi, à l'intérieur de la cinquième hélice du domaine de mort de  $p75^{\text{NTR}}$ , une autre région d'intérêt identifiée par homologie avec le domaine activateur  $G\alpha$  présent dans certain récepteur couplés aux protéines G (Feinstein et Larhammar, 1990 ; Liepinsh *et al.*, 1997). Cependant le rôle joué par ce domaine dans les effets du NGF est controversé. Des peptides représentant cette région peuvent renforcer les effets du NGF, mais peuvent également avoir quelques effets non physiologiques (revue dans Barker, 1998).

A l'extérieur du domaine de mort, il existe aussi une séquence consensus de liaison aux protéines de type PSD (post-synaptic density protein) dans la partie C-terminale du récepteur (Kornau *et al.*, 1995). Une région qui présente une certaine homologie avec le domaine de TNF-RII, CD30 et CD40 qui médie la liaison aux protéines de la famille TRAF (TNF-R associated factor) a également été décrite dans le domaine juxtamembranaire, (revue dans Barker, 1998 ; figure 7).



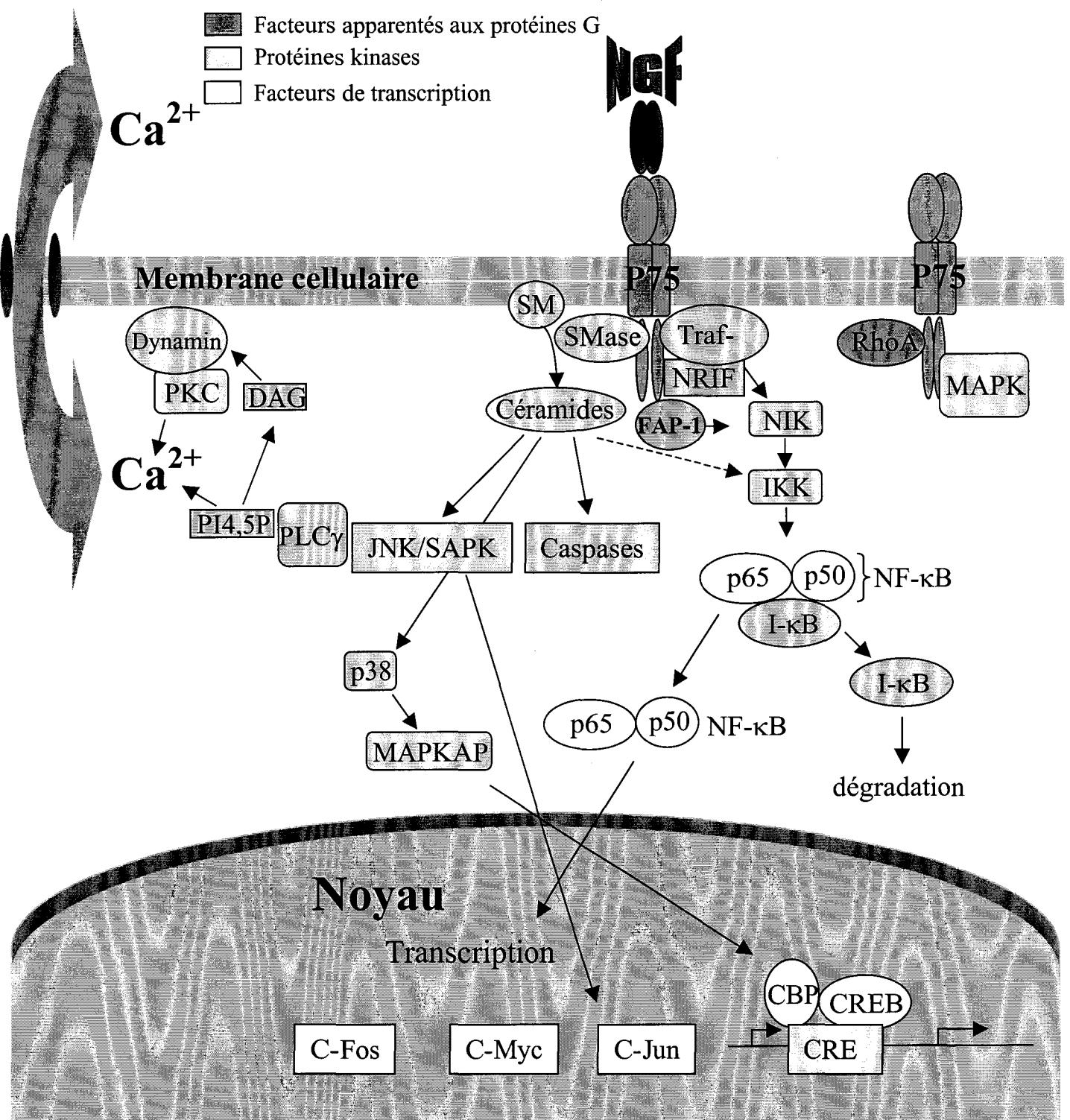
**Figure 7 :** Le récepteur des neurotrophines  $p75^{NTR}$ . A) Modélisation du dimère formé en présence de NGF (d'après Murray-Rust, <http://www.cryst.bbk.ac.uk/>). B) Structure schématique de  $p75^{NTR}$ .

## 2) Interactions NGF/p75<sup>NTR</sup>

Deux épitopes de liaison à p75 ont été identifiés à la surface du NGF (Wiesmann *et al.*, 1999). L'un implique essentiellement des résidus chargés positivement dans les boucles L1 et L4 à la surface proche de la membrane (figure 8) (Ibanez *et al.*, 1992), l'autre contient des résidus hydrophiles dans la boucle très conservée L3 et le domaine C terminal (Urfer *et al.*, 1994 ; Ryden et Ibanez, 1997).

La mutation de trois lysines (Lys<sup>32</sup>, Lys<sup>34</sup> et Lys<sup>95</sup>) en alanine à l'intérieur du NGF entraîne une perte complète de la liaison à p75 mais maintient la liaison à TrkA et une réponse de survie. Ce résultat montre le rôle important des interactions électrostatiques entre le NGF et p75 qui ont des charges globales opposées avec un regroupement des charges positives à la surface du NGF (Ibanez *et al.*, 1992 ; McDonald *et al.*, 1991). Ces trois résidus lysine ne sont pas conservés dans les autres neurotrophines, mais leurs structures suggèrent la conservation d'une charge positive à leur surface dans une région topologiquement similaire à l'intérieur de la famille. La substitution de résidus contribuant à ces régions positivement chargées par des résidus alanine montre leur rôle dans la liaison à p75 (Urfer *et al.*, 1994 ; Ryden *et al.*, 1995). De légères différences structurales pourraient rendre compte des variations de constantes d'association et de dissociation pour p75 d'une neurotrophine à l'autre, mais il est également possible que des résidus spécifiques de chaque neurotrophine participent à la liaison avec p75 (Rodriguez-Tebas *et al.*, 1992 ; Urfer *et al.*, 1994).

Bien que p75<sup>NTR</sup> possède une séquence consensus de liaison potentielle des protéines-G (Feinstein et Larhammar, 1990), il n'existe pas de véritable démonstration de l'existence d'un signal p75-dépendant médié par des protéines-G. Cependant, p75<sup>NTR</sup> pourrait réguler l'activité du NGF. p75<sup>NTR</sup> participe par exemple à la formation de sites de liaison à forte affinité pour le NGF (Loeb *et al.*, 1994 ; Hantzopoulos *et al.*, 1994). De plus un domaine spécifique de p75<sup>NTR</sup> régulerait les effets de l'activité tyrosine kinase de TrkA sur la croissance et la différenciation cellulaires (Verdi *et al.*, 1994).



**Figure 8 :** Principales voies de signalisation du NGF médiées par p75<sup>NTR</sup>. (La flèche en pointillés indique une voie de signalisation encore hypothétique).

### 3) Le domaine de mort

Le domaine de mort de p75 a pu être mis en évidence par homologie avec ceux d'autres membres de la famille du TNF-R. Sa structure a été récemment déterminée par résonnance magnétique nucléaire (Liepinsh *et al.*, 1997). Ce domaine permet l'interaction du récepteur avec d'autres protéines comportant elles aussi un domaine de mort. Dans le cas de p75, on a jusqu'ici pu démontrer une véritable interaction uniquement avec les protéines de la famille TRAF (TNF-R associated protéines) (Ye *et al.*, 1999). Une certaine interaction a été montrée avec la protéine NRIF (neurotrophin receptor interacting factor), mais ne semble pas indispensable à l'activité de p75 (Casademunt *et al.*, 1999).

### 4) Molécules interagissant avec le domaine intracellulaire de p75<sup>NTR</sup>

Khursigara *et al.* (1999) ont montré une interaction spécifique de p75<sup>NTR</sup> avec la protéine TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor-6). Cette interaction est ligand-dépendante puisque qu'elle est maximale à la concentration de 100 ng/ml de NGF. La liaison de TRAF6 se fait au niveau de la région juxtamembranaire de p75. L'association de TRAF6 avec p75 en présence de NGF conduit à l'augmentation de la localisation nucléaire de la sous-unité p65 de NF-κB. Un peu plus récemment, Ye *et al.* (1999) ont montré que p75 pouvait interagir avec les autres membres de la famille TRAF qui sont capables de moduler l'apoptose et l'activation de NF-κB. TRAF2 et TRAF6 facilitent l'activation de NF-κB et favorisent la survie alors que TRAF4 inhibe l'activation de NF-κB. TRAF2 s'associerait à la région C-terminale (death domain) du domaine intracellulaire de p75<sup>NTR</sup> ( $\text{Thr}^{327}$ - $\text{Leu}^{386}$ ) alors que TRAF4 se lierait à la région N-terminale juxtamembranaire ( $\text{Lys}^{245}$ - $\text{Gly}^{313}$ ) tout comme TRAF6.

La protéine à doigts de zinc NRIF (neurotrophin receptor interacting factor) est une protéine ubiquitaire essentiellement exprimée pendant le développement embryonnaire. Elle interagit avec p75<sup>NTR</sup> à la fois au niveau du domaine de mort et de la région juxtamembranaire. Son rôle dans la signalisation de p75<sup>NTR</sup> est visible dans les souris  $p75^{\text{NTR}-/-}$ ,  $ngf^{-/-}$  et  $nrif^{-/-}$  dont les phénotypes sont identiques : dans ces trois cas, on observe

une diminution de l'apoptose des cellules de la rétine lors du développement (Casademunt *et al.*, 1999).

Par ailleurs, Volonte *et al.* (1993) ont montré que les protéine kinases ERK1 et ERK2 pouvaient être associées constitutivement à p75 et être stimulées par l'intermédiaire de TrkA. Susen *et al.* (1999) ont au contraire montré que le NGF pouvait entraîner la phosphorylation de ces deux MAP-kinases dans des cellules n'exprimant que p75.

La phosphatase FAP-1 (Fas-associated phosphatase-1) peut également s'associer à la partie C-terminale du domaine intracellulaire de p75 et inhiber l'activation de NF-κB induite par TRAF-6 (Irie *et al.*, 1999).

Enfin, des études récentes ont montré que la protéine RhoA interagissait avec le domaine intracellulaire de p75<sup>NTR</sup> (Yamashita *et al.*, 1999). RhoA est l'un des trois isoformes de Rho qui sont membres de la super-famille Ras de protéines liant le GTP. Les protéines Rho contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine dans beaucoup de types cellulaires et comme les autres membres de la super-famille Ras passent de l'état activées / liées au GTP à l'état inactives / liées au GDP (guanosine di-phosphate) (Mackay et Hall, 1998). Des expériences de co-immunoprecipitation ont démontré que p75<sup>NTR</sup> active constitutivement RhoA et que le NGF induit une baisse rapide de l'activité de RhoA (revue dans Davies, 2000).

### 5) Voie des céramides

Dobrowsky *et al.* (1994 ; 1995) ont démontré que p75<sup>NTR</sup> est capable de médier un signal indépendamment de TrkA. Ils ont en effet montré que le NGF est capable d'activer une voie de signalisation, connue sous le nom de cycle de la sphingomyéline, mettant en jeu un second messager lipidique spécifiquement par p75<sup>NTR</sup>. L'hydrolyse de la sphingomyéline, sous l'action de la sphingomyélinase stimulée par le NGF, conduit à la production du métabolite bioactif des sphingolipides, le céamide. Ce céamide, que l'on retrouve en abondance dans le cerveau, a été décrit comme un médiateur des voies de signalisation antimitogène conduisant à l'inhibition de la croissance, à la différenciation, à l'apoptose et à la transcription de certains gènes (revue dans Chao, 1995 ; Hannun et Obeid, 1995). L'addition

de céramide C2 conduit en effet à la fragmentation de l'ADN dans différents types cellulaires (Yang *et al.*, 1993 ; Jarvis *et al.*, 1994).

Les effecteurs de l'action des céramides ne sont pas encore bien connus, mais semblent inclure les stress-activated protein kinases (SAPK) telles que les jun-kinases (JNK) et la p38 (Verheij *et al.*, 1996). Dans les PC12 privée de NGF qui entrent en apoptose, ont trouvé des kinases JNK et p38 actives dont l'inhibition réduit l'apoptose (Xia *et al.*, 1995). De plus, l'activation de p75 par le NGF dans les oligodendrocytes stimule JNK et initie la mort cellulaire programmée (Casaccia-Bonelli, 1996).

Lièvremont *et al.* (1999) ont par ailleurs montré dans une lignée de neuroblastome SK-N-BE que l'augmentation de céramides induite par p75 entraîne l'activation des caspases (enzymes qui sont connues pour jouer un rôle clef dans le programme de mort cellulaire) et l'apoptose, avec notamment une fragmentation de la poly-ADP ribose polymérase (PARP).

La production de céramide induite par le NGF et p75 semble localisée dans les caveolae qui sont des microdomaines de la membrane plasmique enrichis en caveoline, en sphingomyéline et en molécules de signalisation (Bilberback *et al.*, 1997). La cavéoline est la protéine majeure des caveolae. Elle joue le rôle d'échafaudage pour séquestrer un pool de protéines G, de Ras et d'autres molécules effectrices et permet l'internalisation de récepteurs membranaires (Pingsheng et Anderson, 1995 ; revue dans Okamoto *et al.*, 1998).

## 6) Voie NF-κB

L'activation du facteur de transcription-κB (NF-κB) peut avoir lieu en présence de céramide C2 dans certains types cellulaires (Dbaibo *et al.*, 1993, Carter *et al.*, 1996). Cependant, il n'existe pour l'instant pas de preuve que l'induction de la voie des céramides par p75 active directement NF-κB.

L'activation de NF-κB par le NGF et p75 a été démontrée par Carter *et al.* (1996). Cette activation est possible grâce à une cascade de kinases. L'activation de la NF-κB inducing kinase NIK phosphoryle et active la IκB kinase IKK qui va elle-même phosphoryler IκB. IκB phosphorylé va alors se dissocier de NF-κB et être ubiquitinylé puis dégradé par le protéasome (revue dans Baker et Reddy, 1998 ; Mercurio et Manning, 1999). La dissociation de IκB découvre la séquence de localisation nucléaire (NLS) de NF-κB qui passe alors dans le noyau (Cramer et Müller, 1999) pour activer la transcription de ses gènes cibles tels que les protéines des familles TRAF, IAP (inducer of apoptosis), Bcl-2, les facteurs de transcription

c-Myc ou p53, la protéine A20, la manganese superoxyde dismutase ou des gènes inducteurs de mort : Fas ligand (CD95L), Fas (CD95) (revue dans Barkett et Gilmore, 1999).

Le complexe actif NF-κB est formé de deux protéines dont la nature varie d'un type cellulaire à l'autre. Les protéines Rel/ NF-κB sont apparentées par un domaine d'homologie Rel de 300 acides aminés qui contient des séquences essentielles à la dimérisation, à la liaison à l'ADN et au transport vers le noyau (Chen et Ghosh, 1999). La première classe de protéines Rel (c-Rel, RelA et RelB) contiennent un domaine de transactivation. La seconde classe peut exister sous la forme de protéine de liaison à l'ADN (p50 et p52) ou de protéine inactive (p100 et p105) qui contient un domaine inhibiteur apparenté à IκB. Dans la lignée de cellules de cancer du sein hormono-dépendante MCF-7, par exemple, c'est le complexe p50/p65RelA qui domine (revue dans Barkett et Gilmore, 1999).

La translocation nucléaire du complexe actif NF-κB peut être inhibée par un inhibiteur peptidique (SN50) qui traverse la membrane grâce à une séquence hydrophobe et qui possède une séquence de localisation nucléaire (Lin *et al.*, 1995). Cette activité de NF-κB peut d'autre part inhiber ou stimuler l'apoptose en fonction du type cellulaire et de la molécule activant le facteur de transcription. NF-κB activé par le TNF $\alpha$  est par exemple anti-apoptotique pour les cellules de cancer du sein MCF-7, mais il est pro-apoptotique dans la lignée prostatique AT-3 lorsqu'il est activé par un agent viral (revue dans Barkett et Gilmore, 1999).

#### **I.4. - Interactions entre TrkA et p75, conséquences sur l'affinité des récepteurs pour le NGF**

Avant l'identification des protéines correspondantes, deux classes différentes de sites de liaison avaient pu être mises en évidence pour le NGF. Un site de basse affinité (avec un Kd d'environ  $10^{-9}$ M) et un site de haute affinité d'environ ( $Kd \sim 10^{-11}$ M). Cependant, un seul récepteur du NGF avait pu être identifié. Il s'agit de p75 qui a été séquencé en 1986. Ce n'est qu'en 1991 que TrkA a été mis en évidence.

##### **1) Modulation de l'affinité des récepteurs pour le NGF**

Cependant, p75<sup>NTR</sup> pourrait réguler l'activité du NGF. p75<sup>NTR</sup> participe par exemple à la formation de sites de liaison à forte affinité pour le NGF (Loeb *et al.*, 1994 ; Hantzopoulos *et al.*, 1994). D'après les analyses par Scatchard, il existe deux types de sites de liaison au

NGF à la surface des neurones sensibles à ce facteur (Sutter *et al.*, 1979). Ces sites ont des constantes de liaison à l'équilibre qui varient d'un facteur 100, et peuvent être distingués par les constantes de dissociation du ligand (Schechter et Bothwell, 1981). Les protéines responsables de la formation d'un site de haute affinité au NGF ont fait l'objet d'un débat considérable puisque les auteurs montrent généralement pour p75 et TrkA une liaison de basse affinité et un petit pourcentage de sites de haute affinité a pu être détecté pour TrkA (Jing *et al.*, 1992). La contribution de chacun des récepteurs au site de liaison de haute affinité a pu être en partie clarifiée par les analyses cinétiques (Mahadeo *et al.*, 1994). Alors que p75 a des vitesses rapides d'association et de dissociation, TrkA interagit avec le NGF avec des vitesses d'association et de dissociation beaucoup plus lentes. De ce fait, la liaison du NGF à TrkA résulte en un  $K_d$  de  $10^{-9}$ - $10^{-10}$  M (Dechant *et al.*, 1993). Ces affinités sont différentes du site de haute affinité mesuré dans les neurones sensoriels,  $K_d = 10^{-11}$  M (Sutter *et al.*, 1979 ; Dechant *et al.*, 1993). Lorsque TrkA et p75 sont coexprimés, la vitesse d'association est augmentée de 25 fois, créant ainsi un nouveau site correspondant au site de liaison à haute affinité ( $K_d = 10^{-11}$  M). Ce site de haute affinité nécessite un rapport p75/TrkA élevé (Chao et Hempstead, 1995), ainsi, l'une des fonctions de p75 serait d'accroître l'affinité de liaison du NGF.

La présence de p75 pourrait également améliorer la spécificité de reconnaissance entre les neurotrophines et les différents membres de la famille Trk. TrkA peut en effet servir de récepteur à la NT-3 dans des conditions où le rapport p75/TrkA est faible, une synthèse importante de p75 limitant au contraire les possibilités d'interactions croisées entre NT-3 et TrkA (revue dans Barker et Murphy, 1992).

## 2) Modulations fonctionnelles

p75 peut influencer la liaison du NGF à TrkA, mais aussi la transduction du signal par TrkA (Hantzopoulos *et al.*, 1994 ; Barker et Shooter, 1994 ; Verdi *et al.*, 1994 ; Berg *et al.*, 1991). Des expériences de culture cellulaire indiquent que p75 est capable d'augmenter l'autophosphorylation de TrkA (Barker et Shooter, 1994 ; Verdi *et al.*, 1994). Une possible fonction de p75 serait d'augmenter la concentration de NGF à la surface cellulaire afin de faciliter la liaison à TrkA (Barker et Shooter, 1994). Un autre modèle pourrait être qu'un changement de conformation de TrkA se produirait en présence de p75 ce qui faciliterait la liaison du ligand et la signalisation qui en découle (Chao et Hempstead, 1995).

### 3) Interactions directes TrkA/p75

Les interactions directes entre p75 et TrkA sont peu documentées. Cependant des expériences d'immunoprecipitation menées après cross-linking sur des tissus de moelle épinière et de cerveau en présence de  $^{125}\text{I}$ -NGF suggèrent qu'une association entre TrkA et p75 a lieu (Huber et Chao, 1995). Des expériences de marquage fluorescent du récepteur p75 a également révélé une interaction potentielle avec TrkA (Wolf *et al.*, 1995). La surexpression des deux récepteurs dans des cellules d'insectes donne lieu, en présence ou en absence de NGF, à la formation de complexes TrkA/p75 spécifiques, puisque TrkB par exemple ne s'associe pas à p75 (Ross *et al.*, 1996). Plus récemment, Bibel *et al.* (1999) ont pu coimmunoprecipiter TrkA et p75. D'après le travail réalisé sur TrkB, cette interaction semble faire intervenir à la fois les domaines intra et extracellulaires des deux récepteurs et dépendre de la phosphorylation du récepteur tyrosine kinase.

## II - Effets biologiques du NGF

### I.1 – Effets neurotrophiques

L'effet neurotrophique du NGF a d'abord été mis en évidence sur les ganglions sympathiques d'embryons de poulet. Le NGF induit la croissance de neurites et la synthèse de neurotransmetteurs et de leurs récepteurs (Levi-Montalcini *et al.*, 1986). L'effet neurotrophique du NGF a également été très étudié sur les cellules de phaeochromocytome de rat (PC12). Ces cellules dérivées de la crête neurale acquièrent un phénotype neuronal en présence de NGF : elles sortent du cycle cellulaire, forment des neurites et passent du type cellule chromaffine au type neurone sympathique (Aloe et Levi, 1979 ; Anderson et Axel, 1986).

Dans le système nerveux périphérique, au cours de la vie post-natale et adulte, l'un des effets majeurs du NGF est de stimuler la régénération des cellules nerveuses blessées et d'augmenter la synthèse et le relargage de neurotransmetteurs et de neuropeptides tels que la substance P (SP) et le calcitonin gene-related peptide dans les neurones périphériques (Lindsay et Harmar, 1989 ; Donnerer *et al.*, 1992). Le NGF est également capable de supprimer l'apoptose des neurones sympathiques (Deckwerth *et al.*, 1993).

Le NGF est également impliqué dans les réponses inflammatoires périphériques (Lewin *et al.*, 1993 ; Snider *et al.*, 1989) et joue un rôle essentiel dans les neuropathologies associées à des déficits sensoriels. C'est pourquoi des études sont menées pour explorer les possibilités d'utilisation du NGF ou de ses anticorps dans le traitement des neuropathies périphériques et la régulation des douleurs périphériques (Anand, 1995 ; Apfel *et al.*, 1994).

Dans le système nerveux central, les plus grandes quantités de NGF sont produites dans le cortex et l'hippocampe qui sont les régions cibles principales des neurones cholinergiques localisés respectivement dans le noyau basal magnocellulaire et le septum médian (Thoenen *et al.*, 1987 ; Korsching, 1986 ; Whittemore et Seiger, 1987 ; Cimino *et al.*, 1996).

L'administration de NGF dans le cerveau empêche la dégénération des neurones cholinergiques lésés, augmente l'activité des neurones cholinergiques non lésés et limite la perte de mémoire spatiale chez les rats âgés (Fisher *et al.*, 1987 ; Chen et Gage, 1995). De plus, l'implantation intracérébrale de lignées cellulaires secrétant du NGF favorise la survie

neuronale après des lésions expérimentales (Whittemore *et al.*, 1991). Les études cliniques publiées ces dix dernières années semblent également appuyer l'hypothèse que le NGF joue un rôle clé, avec les autres neurotrophines, dans les déficits cholinergiques du cerveau antérieur chez l'homme, comme le vieillissement et la maladie d'Alzheimer (Liberini et Cuello, 1994 ; Scott et Crutcher, 1994 ; Eide *et al.*, 1993 ; Holtzman *et al.*, 1993 ; Coyle *et al.*, 1983)

L'utilisation de souris transgéniques a permis de déterminer certains rôle des neurotrophines et du NGF en particulier. Des knock-out concernant TrkA et le NGF provoquent une perte considérable de cellules neuronales, ce qui fournit une preuve des effets biologiques du NGF (Crowley *et al.*, 1994 ; Smeyne *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 1992).

#### *Déficiences du système nerveux périphérique chez les souris knock-out :*

Les souris knockout NGF *-/-* et TrkA *-/-* ont des phénotypes similaires. L'ablation de l'un ou l'autre gène conduit pratiquement à l'absence des neurones des ganglions cervicaux supérieurs dans la première semaine de vie postnatale, ce qui confirme le rôle essentiel de la signalisation NGF / TrkA dans le développement des neurones sympathiques. De plus, les deux types de souris sont insensibles à la douleur du fait de la perte des neurones sensoriels nocicepteurs (Smeyne *et al.*, 1994 ; Crowley *et al.*, 1994). Indo *et al.* (1996) ont montré que les patients humains souffrant d'insensibilité congénitale à la douleur présentent des mutations inactivant le gène *trkA*. Les souris mutantes pour TrkA ou le NGF pourraient donc fournir un bon modèle d'étude pour ce type de maladies humaines.

Les défauts observés chez les souris mutantes pour le NGF ou TrkA correspondent aux populations cellulaires connues pour exprimer la neurotrophine et son récepteur (Snider, 1994 ; Barbacid, 1994). Des mutations de TrkA mènent à des phénotypes moins graves que des mutations du ligand si l'on considère l'étendue de la mort cellulaire et les populations affectées, ce qui renforce l'idée que plusieurs neurotrophines puissent se lier à un même récepteur. La survie cellulaire est par ailleurs relativement moins affectée dans le système nerveux central comparé au système nerveux périphérique.

#### *Déficiences du système nerveux central chez les souris knock-out :*

Dans le système nerveux périphérique, les neurotrophines sont nécessaires au développement des ganglions sensoriels et sympathiques. Au contraire, l'analyse du système nerveux central de souriceaux nouveaux-nés déficients pour des neurotrophines ou leur

récepteurs n'a révélé que des pertes neuronales légères (revue dans Snider, 1994). Ces résultats suggèrent que les neurotrophines ne jouent pas un rôle majeur dans la survie et la différenciation des neurones du système nerveux central durant le développement embryonnaire. Cependant, d'autres voies de signalisation impliquant d'autres facteurs et leur récepteurs, tels que l'éphrine et les récepteurs Eph, sont essentielles au développement des neurones du système nerveux central (Orioli et Klein, 1997). De nombreux neurones du système nerveux périphérique, parmi lesquels les neurones cholinergiques basaux et striataux, matures durant la période post-natale précoce (Mobley *et al.*, 1989). Les premières études de souriceaux nouveaux-nés déficients en NGF ou en TrkA n'ont pas montré de réduction du nombre de neurones cholinergiques basaux mais ont indiqué des changements de phénotypes tels qu'un niveau réduit de choline acétyltransférase (Smeyne *et al.*, 1994 ; Crowley *et al.*, 1994). L'étude de souriceaux de quatre semaines a cependant montré que les neurones cholinergiques sont significativement moins nombreux et plus petits à la fois dans le striatum et dans les régions septales, suggérant que la signalisation du NGF médiée par TrkA est nécessaire à la maturation normale de ces neurones (Fagan *et al.*, 1997).

L'expression abondante de neurotrophines et de leur récepteurs dans le système nerveux central tout au long de la vie adulte suggère qu'en plus de leur rôle dans le développement, les neurotrophines continuent à agir dans le système nerveux mature. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que les neurotrophines joueraient un rôle dans le système nerveux central post-natal en favorisant la survie et la régénération des neurones ayant subi des blessures ou des désordres neurodégénératifs (revue dans Lindvall *et al.*, 1994 ; Oppenheim, 1996 ; Tuszyński et Cage, 1995).

Les neurotrophines ont également un rôle fonctionnel dans le système nerveux central mature au niveau de la plasticité synaptique (Lo, 1995 ; Thoenen, 1995). L'expression des neurotrophines et de leur récepteurs persiste par exemple dans l'hippocampe adulte et peut être modulée par l'activité neuronale. Les neurotrophines peuvent de plus réguler la mise en place de la potentiation à long terme (LTP), qui est une forme de plasticité neuronale associée à l'apprentissage et à la mémorisation. Les souris déficientes en un allèle du NGF présentent des déficiences de mémoire qui peuvent être partiellement corrigées par injection intraventriculaire de NGF recombinant (Chen *et al.*, 1997) ; suggèrent un rôle majeur des neurotrophines dans la modulation de l'activité neuronale du cerveau adulte.

Par ailleurs, pendant la cicatrisation de la peau humaine une croissance importante des fibres nerveuses sensorielles a pu être observée. Cette forte innervation a un rôle important

dans la "réépithélialisation" de la blessure, puisque des neurotransmetteurs tels que le polypeptide intestinal vasoactif (VIP) stimule l'activité de l'adénylate cyclase et la prolifération des kératinocytes (Haegerstrand *et al.*, 1989). La synthèse de NGF dans la peau d'embryon de souris a déjà été démontrée (Davies *et al.*, 1987) et la croissance des fibres nerveuses pourrait être due à cette synthèse de NGF, synthèse que les kératinocytes sont capables de réaliser (DiMarco *et al.*, 1991).

## **II.2 – Effets neuroendocrines**

Le NGF est également un modulateur des fonctions neuroendocrinien, il est capable d'activer l'hypophyse et d'entraîner une augmentation de la production de glucocorticoïdes par les surrénales (Otten *et al.*, 1979 ; Taglialatela *et al.*, 1991). De plus, *in vitro*, le NGF stimule la différenciation des cellules mammotropes lors du développement hypophysaire, indiquant que l'acquisition de phénotypes spécifiques de cette glande est sous le contrôle de facteurs neurotrophiques (Missale *et al.*, 1996). D'autre part, cette étude a montré qu'un antagoniste spécifique du récepteur dopaminergique D2 stimule la sécrétion de NGF *in vivo*, ce qui fait de l'hypophyse antérieure une source possible de NGF circulant. Etant donné l'augmentation de la concentration sérique en NGF observée dans des conditions de stress et la fonction reconnue d'immunorégulateur de ce facteur de croissance, le NGF comme la prolactine pourrait être envisagé comme un signal d'alerte immunologique sous contrôle neuronal.

Il a également été montré que TrkA est exprimé dans le compartiment endocrinien du pancréas. Les cellules-β primaires de rat expriment TrkA et sont donc des cibles potentielles des neurotrophines (Kanaka-Gantenbein *et al.*, 1995 ; Shibayama et Koizumi, 1996). Rosenbaum *et al.* (1998) ont également montré que les cellules-β de rat synthétisent et sécrètent du NGF qui peut lui-même moduler l'expression de TrkA dans ces cellules. De plus, le NGF comme l'insuline est sécrété en réponse à une augmentation de la concentration en glucose. Le NGF pourrait donc avoir un rôle endocrine, mais aussi paracrine pour les cellules-β et interviendrait de manière importante dans certaines formes de diabète.

Une autre fonction de type endocrine a été attribuée au NGF. Il s'agit d'un rôle dans le déclenchement de l'ovulation. En effet, Dissen *et al.* (1996a) ont montré que l'expression des gènes de TrkA et du NGF augmente de façon transitoire dans les cellules folliculaires à la suite du pic de gonadotrophine, juste avant la rupture du follicule. Le NGF comme TrkA sont produits par les cellules de la thèque du follicule de De Graaf et par les cellules interstitielles ; Dissen *et al.* (1996a) ont également démontré qu'une immunoneutralisation du NGF ainsi qu'une inhibition de la signalisation de TrkA par le K-252a empêchent l'ovulation. Des cellules de la thèque cultivées en monocouche et transfectées avec du cDNA de TrkA, de façon à les faire exprimer TrkA de la même manière qu'avant l'ovulation, répondent au NGF par une augmentation rapide de la sécrétion de prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). La PGE<sub>2</sub> est normalement induite par l'interleukine-1 $\beta$ , mais sa sécrétion peut être réduite par des anticorps neutralisant anti-NGF ou par le K-252a (Dissen *et al.*, 1996b). Mayerhofer *et al.* (1996) ont montré que le NGF et TrkA participe également à la sérine phosphorylation de la connexine-43 (Cx43) qui est un des composant majeur des jonctions de type gap. Cette phosphorylation est suivie d'une réduction des transferts s'effectuant par les jonctions gap entre cellules de la thèque qui conduira à la rupture des contacts cellule/cellule. Enfin, le NGF augmente la prolifération des cellules de la thèque, phénomène qui apparaît normalement durant la période préovulatoire (Dissen *et al.*, 1996b). Ainsi le NGF semble bien contribuer au déclenchement de la cascade d'événements qui mènent à la dissociation du follicule lors de l'ovulation (revue dans Dissen *et al.*, 1996c).

Enfin, les kératinocytes sont capables de secréter du NGF et pourraient avoir un rôle important dans la régulation de la fonction des lymphocytes et la différenciation des mélanocytes lors de la morphogenèse de l'épiderme ainsi que pendant la cicatrisation (Di Marco *et al.*, 1991 ; 1993).

### **II.3 – Autres effets du NGF sur :**

#### **1) La prolifération**

Aloe et Levi-Montalcini (1977) ont montré que l'injection de NGF à des rats nouveaux-nés augmente le nombre de mastocytes dans divers tissus. En association avec

l'interleukine-3 (IL-3), le NGF peut non seulement stimuler la formation de colonies de mastocytes murins IL-3-dépendants, dérivés de la moelle osseuse, en culture (bone marrow-derived cultured mast cell : BMCMC) mais peut aussi induire un changement de phénotype des BMCMCs en mastocytes de type tissu conjonctif (connective tissue-type mast cell : CTMC) (Matsuda *et al.*, 1991). Le NGF peut aussi activer les éosinophiles (Hamada *et al.*, 1996), les monocytes (Ehrhard *et al.*, 1993) et la transcription de gènes précoces dans les lymphocytes T (Ehrhard et Otten, 1994). Il peut également favoriser la croissance des neutrophiles murins (Kannan *et al.*, 1991 ; Kannan *et al.*, 1992). Matsuda *et al.* (1988) ont également mis en évidence une augmentation du nombre de colonies de basophiles/mastocytes chez l'homme en présence de NGF.

Les kératinocytes humains en culture sont capable de synthétiser et de sécréter du NGF (Di Marco *et al.*, 1991). Il a été ensuite démontré que le NGF régule la croissance des kératinocytes par une boucle autocrines de stimulation (Di Marco *et al.*, 1993). En plus de son rôle autocrine dans la stimulation de la prolifération des kératinocytes, la sécrétion paracrine de NGF par ces cellules pourrait avoir un rôle important dans la croissance et la différenciation des mélanocytes lors de la morphogenèse de l'épiderme ainsi que pendant la cicatrisation.

D'autre part, le NGF favorise la cicatrisation lors d'une application directe du facteur par léchage chez la souris (Li *et al.*, 1980) ; lors d'une morsure, ce NGF est libéré directement dans le système circulatoire sanguin (Aloe *et al.*, 1986 ; Alleva *et al.*, 1993) et agit sur la croissance de différents types de cellules immunitaire comme les mastocytes et les lymphocytes (Aloe *et al.*, 1990 ; Aloe, 1988 ; Aloe *et al.*, 1994 ; Aloe *et al.*, 1977). Ceci pourrait en partie expliquer que la glande salivaire sous-maxillaire de souris mâle adulte soit la source naturelle de NGF la plus importante. Le NGF appliqué par léchage permettrait de stimuler le système immunitaire pour combattre une éventuelle infection et favoriserait la cicatrisation des blessures occasionnées lors des combats entre mâles (Li *et al.*, 1980).

Dans la prostate, Pflug *et al.* (1995) ont montré la présence de NGF sécrété par le stroma et l'expression des récepteurs du NGF dans le compartiment épithelial, indiquant un contrôle paracrine de la croissance de la prostate par le NGF grâce à des interactions stroma-épithélium.

## 2) L'apoptose

En dehors de ses effets pro- et anti-apoptotiques lors du développement du système nerveux, le NGF exerce un certain nombre d'effets régulateurs de la mort cellulaire. Il peut favoriser la survie des neutrophiles murins (Kannan *et al.*, 1991 ; Kannan *et al.*, 1992). Kawamoto *et al.* (1995) ont également montré que le NGF participe à la sauvegarde des mastocytes péritonéaux en inhibant l'apoptose via une augmentation de l'activité tyrosine kinase de TrkA. Le NGF est capable de supprimer l'apoptose des neutrophiles et des éosinophiles (Kannan *et al.*, 1992).

Récemment, Torcia *et al.* (1996) ont montré un rôle direct du NGF dans les lymphocytes B : le NGF est synthétisé et sécrété dans des conditions de base par les lymphocytes B humain normaux qui expriment aussi constitutivement les deux récepteurs TrkA et p75<sup>NTR</sup>. Il fonctionne de manière autocrine pour maintenir la viabilité des lymphocytes B mémoire impliqués dans la réponse immune humorale secondaire. Des données cliniques appuient ces résultats expérimentaux. C'est le cas de pathologie humaine comme l'allergie (Bonini *et al.*, 1996) et les maladies autoimmunes (Aloe *et al.*, 1994) où l'on observe une forte corrélation entre la phase aiguë et le niveau de NGF, que ce soit dans le sang où sur le site de l'inflammation. Bien que la signification de ces données ne soit pas encore très claire au niveau de la pathogenèse, le NGF est un élément important de la modulation des fonctions immunitaires (revue dans Aloe *et al.*, 1997).

Les lignées de monocyles/macrophages infectées *in vitro* par le VIH de type 1 (HIV-1) sont capables de produire des quantités substantielles de NGF qui sont associées à une expression accrue des récepteurs de haute affinité TrkA à leur surface. Le traitement des cellules infectées par des anticorps anti-NGF neutralisant entraîne une diminution de l'expression de TrkA, une augmentation de l'expression du récepteur de basse affinité p75<sup>NTR</sup> et l'apparition de la mort par apoptose. Ceci indique un rôle de facteur de survie autocrine du NGF face à l'infection par le VIH (Garaci *et al.*, 1999).

Soilu-Hanninen *et al.* (1998) ont par ailleurs démontré que l'activation de p75<sup>NTR</sup> pouvait induire l'apoptose des cellules de Schwann.

### 3) La migration

La migration des cellules de Schwann joue un rôle fondamental dans le développement normal et la régénération des nerfs périphériques. Elles interviennent dans le guidage axonal pendant le développement (Noakes *et al.*, 1988 ; Noakes et Bennet, 1987). L'inhibition de la migration des cellules de Schwann pendant le développement entraîne la croissance de nerfs périphériques fonctionnellement et structurellement aberrants (Perkins *et al.*, 1981 ; Franz, 1990). D'autre part, lors du développement et de la régénération des nerfs périphériques, les cellules de Schwann sont une source importante de NGF et de p75<sup>NTR</sup> (Rush, 1984 ; Heumann *et al.*, 1987). Anton *et al.* (1994) ont étudié les effets du NGF sur la migration des cellules de Schwann ; ces auteurs, utilisant des nerfs périphériques (sciatiques) normaux ou dénervés, prétraités ou non avec du NGF ont montré que les cellules de Schwann migrent plus vite sur des fibres dénervées que sur les nerfs sciatiques normaux. Des anticorps neutralisant anti-NGF ou anti-p75<sup>NTR</sup> inhibent fortement mais incomplètement cette augmentation de la migration. Le prétraitement des sections de nerfs par le NGF augmente encore le taux de migration des cellules de Schwann et les mêmes anticorps neutralisant inhibent complètement cette réponse. Ces résultats suggèrent que le niveau élevé de NGF observé dans les nerfs embryonnaires et en régénération favorise la migration des cellules de Schwann. D'autre part, contrairement à ce qui est observé dans les neurones, ce n'est pas TrkA mais p75<sup>NTR</sup> qui apparaît comme le récepteur fonctionnellement important dans la réponse des cellules de Schwann au NGF puisque celles-ci ne présentent pas de récepteur TrkA à un niveau détectable.

Le NGF favorise également la migration d'autres types cellulaires. Il a un effet chimiotactique sur des neutrophiles murins (Kannan *et al.*, 1991 ; Kannan *et al.*, 1992) et sur les mélanocytes (Yaar *et al.*, 1991).

## **II.4 – NGF et cancer**

Les implications du NGF dans les cancers sont peu nombreuses. Le NGF peut intervenir dans le neuroblastome qui est l'une des tumeurs solides de l'enfant les plus communes. Il a pour origine des cellules de la crête neurale qui appartiennent au système sympathicoadrénergique dont le développement normal est soumis entre autres au NGF

(revue dans Nakagawara., 1998). Le NGF peut induire *in vitro* un retour du neuroblastome à un état morphologique plus bénin (revue dans Vinores et Perez-Polo, 1983). De plus, les neuroblastomes exprimant le récepteur TrkA sont de bien meilleur pronostic que ceux pour lesquels on n'observe pas d'expression de TrkA (Nakagawara at al., 1993 ; Kogner *et al.*, 1993). En accord avec ces observations, la surexpression de TrkA dans des lignées cellulaires de neuroblastome favorise la différenciation induite par le NGF *in vitro* et *in vivo* (Matsushima et Bogenmann, 1993 ; Lavenius *et al.*, 1995 ; Poluha *et al.*, 1995). Bono *et al.* (1999) ont aussi montré que la NGF peut avoir un effet pro-apoptotique ou anti-apoptotique en fonction de la position des cellules de neuroblastome dans le cycle cellulaire. Le NGF est pro-apoptotique dans des cellules en croissance qui expriment préférentiellement p75 qui peut activer la voie des céramides et des caspases et il est anti-apoptotique dans des cellules quiescentes qui expriment TrkA de manière prédominante (Lièvremont *et al.*, 1999).

Le NGF peut également jouer un rôle dans les médulloblastomes qui sont aussi des tumeurs du cerveau de l'enfant très malignes mais encore peu connues. Le NGF peut agir sur les cellules de médulloblastome par l'intermédiaire de TrkA. Le NGF peut induire la phosphorylation de TrkA, une inhibition de la croissance des cellules et une différenciation neuronale (Kokunai *et al.*, 1996). Il peut aussi induire l'apoptose dans des lignées qui expriment TrkA (Muragaki *et al.*, 1997). Cependant, les récepteurs du NGF sont très peu représentés dans ce type de tumeur et les potentialités thérapeutiques de ce facteur dans le cadre de cette pathologie sont réduites (Keles *et al.*, 1993 ; Tajima *et al.*, 1998).

Le NGF agit par ailleurs dans les schwannomes. Dans la lignée cellulaire RN22 qui exprime p75<sup>NTR</sup> mais pas TrkA, le NGF induit une activation de NF-κB ainsi que de la kinase JNK. Lorsque NF-κB est inhibé par le SN50 ou par un dominant négatif de IκBα, le NGF induit une mort des cellules RN22 (Gentry *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que l'activation de NF-κB par le NGF et p75<sup>NTR</sup> favorise la survie cellulaire en contrebalançant l'effet proapoptotique de JNK.

La progression des mélanomes humain semble être régulée par le NGF. En effet, la surexpression de p75<sup>NTR</sup> est souvent associée à des stades avancés. Cette expression de p75<sup>NTR</sup> est corrélée à l'invasion d'une membrane basale reconstituée par des cellules de mélanome MeWo stimulées par le NGF (Herrmann *et al.*, 1993). Cette effet du NGF est

médié par p75<sup>NTR</sup> puisque les cellules MeWo n'expriment pas TrkA et passe par l'activation de métalloprotéinases telles que la collagénase de type IV. Walch *et al.* (1999) ont montré sur plusieurs lignées cellulaires de mélanomes que l'expression de p75<sup>NTR</sup> est corrélée à la capacité du NGF à stimuler l'invasion cellulaire et la production d'héparanase. Les lignées qui expriment le plus de p75<sup>NTR</sup> multiplient environ par dix leur capacités d'invasion et de production d'héparanase. p75NTR peut donc fortement influencer l'invasion par les cellules de mélanome d'organes riches en neurotrophines.

Dans les cancers du pancréas, les effets du NGF sont encore controversés. En 1995, Bold *et al.* ont montré un effet mitogène du NGF sur une lignée cellulaire carcinoïde de pancréas. Dans le pancréas normal de rat TrkA a été détecté pendant le développement (Kanaka-Gantenbein *et al.*, 1995). Au contraire, Miknyoczki *et al.* (1996) n'ont pas détecté de NGF dans les cellules PDAC (pancreatic ductal carcinoma). Même si une immunoréactivité pour TrkA a pu être détectée dans les cellules PDAC, il ne semble pas que le NGF ait un effet sur ces cellules, contrairement aux autres neurotrophines qui influencent le phénotype de ces cellules et en particulier leur capacité d'invasion (Miknyoczki *et al.*, 1999).

En conclusion, même si le rôle important des neurotrophines dans les carcinomes pancréatiques est confirmé, celui du NGF reste controversé. Le NGF interviendrait plutôt dans les mécanismes du diabète, avec une participation importante des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans qui synthétisent et sécrètent du NGF (Rosenbaum *et al.*, 1998).

C'est dans le cas de la prostate que les études concernant le rôle du NGF dans les cancers sont les plus nombreuses. Graham et collaborateurs ont montré en 1992 par analyse immunohistochimique la présence d'une protéine de type NGF (NGF-like protein) dans le compartiment stromal d'hyperplasies prostatiques bénignes, d'adénocarcinomes et de tissus normaux (non cancéreux) de prostate. Ils ont également montré la présence du récepteur du NGF (p75<sup>NTR</sup>) essentiellement au niveau des cellules épithéliales de prostate. Cette protéine de type NGF stimule de façon paracrine la croissance de la lignée épithéliale de tumeur prostatique humaine TSU-prl (Djakiew *et al.*, 1991). Sortino *et al.* (2000) ont confirmé l'effet mitogène du NGF sur la lignée cancéreuse prostatique LNCaP. Cet effet s'accompagne d'une augmentation de l'expression de PSA (prostate-specific antigen) et passe par l'activation de TrkA. D'autre part, Djakiew *et al.* (1993) ont également montré que cette protéine produite

par les cellules du stroma de prostate humaine a un effet chimiotactique et chimiokinétique sur des lignées cellulaires tumorales prostatiques humaines.

P75<sup>NTR</sup> est exprimé dans les tissus prostatiques normaux et l'on observe une perte partielle de l'expression de la protéine dans les tissus prostatiques bénins et malins et une perte totale d'expression dans quatre lignées tumorales métastatiques (TSU-prl, DU-145, PC-3 et LNCaP) (Pflug *et al.*, 1992). Ceci suggère une association inverse entre l'expression de p75 et la progression néoplasique de la prostate humaine qui a été confirmée par Perez et collaborateurs (1997). Ces auteurs ont également montré une perte progressive d'expression de p75 durant la transformation maligne de la prostate. La perte de p75 réduirait l'apoptose, ce qui expliquerait la disparition du contrôle de la croissance des cellules cancéreuses (Pflug et Djakiew, 1998).

Le NGF semble jouer un rôle supplémentaire dans les cancers de la prostate. En effet, la lignée tumorale prostatique humaine DU145 est sensible au NGF qui stimule ses capacités invasives en Matrigel (Geldof *et al.*, 1997). Il est également capable de stimuler la production d'héparanase par ces cellules (Walch et Marchetti, 1999). Le NGF est donc probablement un élément important des processus métastatiques des cancers de la prostate.

Au contraire, Paul *et al.* (1996) ont montré sur une série d'hyperplasies bénignes et de cancers de la prostate la localisation épithéliale du  $\beta$ NGF dont la concentration ne semble pas être modulée en fonction du caractère bénin ou malin de la tumeur et suggèrent que le NGF présent dans la prostate est impliqué dans le contrôle de son innervation sympathique.

En conclusion, le cancer de la prostate est le premier cancer non neuronal pour lequel un rôle majeur du NGF a pu être démontré. L'étude des mécanismes d'action du NGF dans ce cancer ouvre des perspectives pour d'autres types de cancers dans lesquels ce facteur de croissance pourrait être impliqué.

## **III - Cancer du sein**

### **III.1. – Introduction**

Le cancer est l'un des plus importants problèmes de santé publique, en particulier dans les pays industrialisés. C'est dans les pays occidentaux qu'il a le plus d'incidence et, en France, il est la deuxième cause de morbidité chez les personnes âgées, après les maladies cardio-vasculaires. Le cancer est la première cause de mortalité avant 65 ans chez l'homme et 75 ans chez la femme. On distingue couramment les tumeurs liquides des tumeurs solides. Les tumeurs liquides, qui sont représentées par les leucémies, sont responsables d'environ 10000 décès par an en France. Parmi les tumeurs solides, les tumeurs épithéliales malignes ou carcinomes représentent environ 90 % des cas et sont donc les plus nombreuses. Le cancer du poumon représente à lui seul 22 % de la mortalité et 17,3 % de l'incidence chez l'homme en France. Chez la femme, le cancer du sein est de loin le plus important avec 25 à 30000 nouveaux cas par an. Il est non seulement fréquent mais grave puisqu'il touche environ une femme sur onze et que plus du tiers des malades décèdera de ce cancer. Malgré les progrès réalisés essentiellement au niveau du dépistage et du pronostic, il reste la première cause de mortalité féminine par cancer. De par les valeurs maternelle, esthétique ou sexuelle qu'il véhicule, le cancer du sein a un impact sociologique très fort.

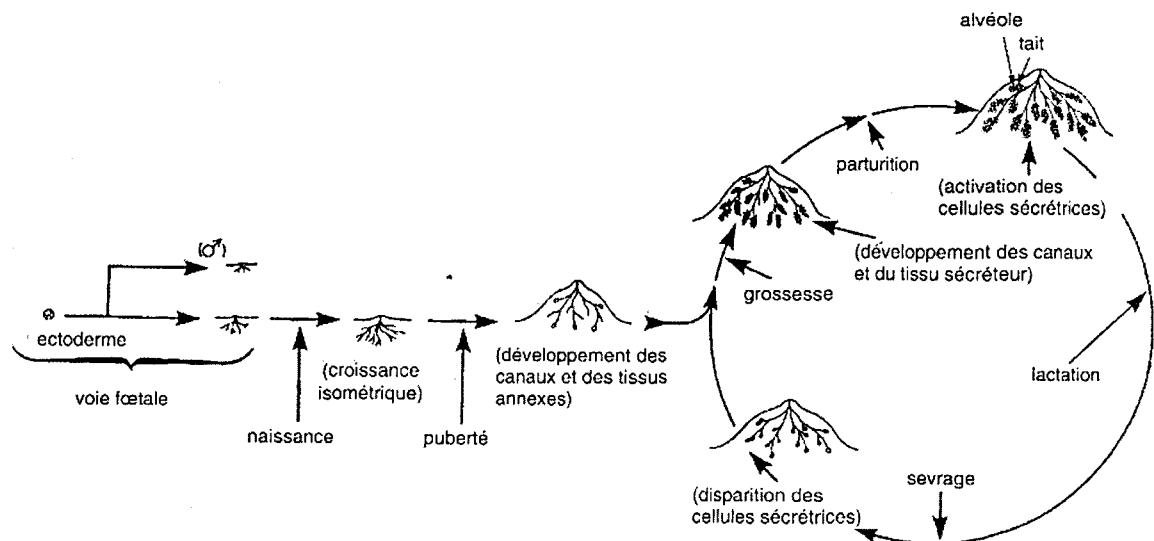
Nous sommes encore loin de maîtriser cette maladie et il reste beaucoup d'efforts à fournir par les chercheurs et médecins pour arriver à un dépistage suffisamment précoce, à un diagnostic plus précis, un pronostic affiné et des traitements plus efficaces et moins traumatisants (revue dans Pritchard, 1997). Dans cette partie, nous nous intéresserons à la glande mammaire normale avant d'aborder les différents types de cancers du sein existant, les marqueurs actuellement utilisés et les molécules qui influencent la croissance des cellules de cancer du sein.

### **III.2. – Développement et structure de la glande mammaire**

#### **1) Développement de la glande mammaire.**

Le développement du sein débute au cours de la vie fœtale et se poursuit tout au long de l'existence. On peut le diviser en quatre étapes : une étape prénatale, une étape pubertaire,

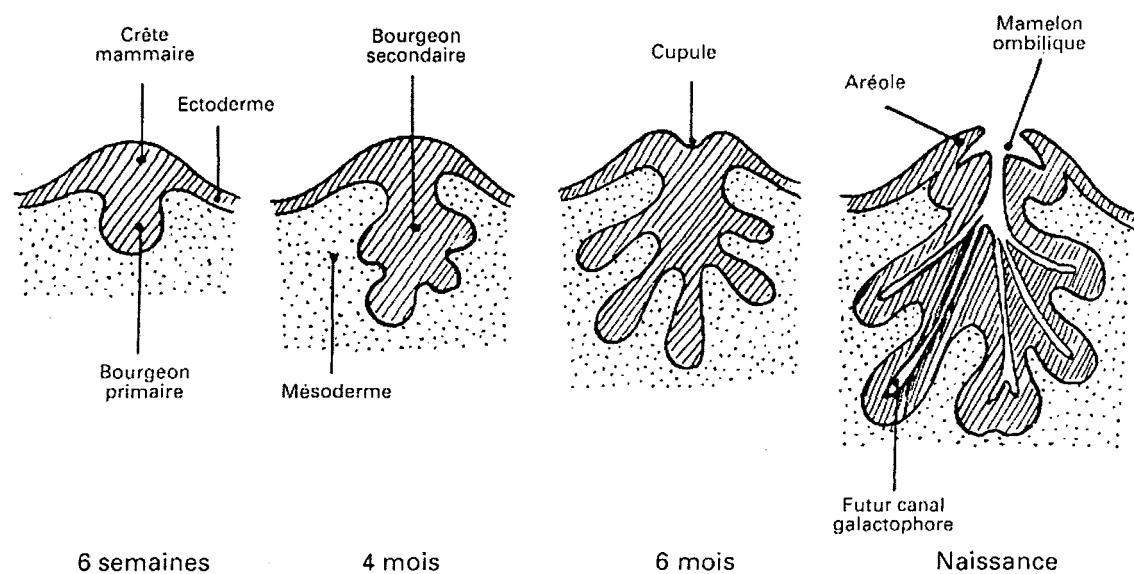
une troisième étape correspondant à la gestation et à la lactation et enfin une quatrième étape correspondant à l'involution qui se déroule pendant la ménopause (figure 9).



**Figure 9 :** Les différentes phases de la croissance et du fonctionnement de la glande mammaire (d'après Espie et Gorins, 1995).

#### - L'étape prénatale.

Le sein s'ébauche au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine du développement embryonnaire sous la forme d'une crête mammaire ou ligne lactéale (épaississement de l'ectoderme) qui s'étend de la future aisselle à la future aine. Le long de cette crête apparaît une paire symétrique d'épaissements ou bourgeons mammaires pectoraux. La crête mammaire disparaît ensuite à six semaines et seuls subsistent les bourgeons mammaires. C'est la fin de la phase embryonnaire (7<sup>ème</sup> semaine). Au cours du 5<sup>ème</sup> mois, les bourgeons pectoraux émettent dans le mésoderme sous-jacent 15 à 20 prolongements cylindriques qui se ramifient et se dilatent à leur extrémité puis se creusent d'une lumière (7<sup>ème</sup>-8<sup>ème</sup> mois) formant ainsi les futurs canaux galactophores. A la naissance, la glande mammaire est donc réduite à un cours système de tubules. Elle apparaît en surface sous la forme d'un très léger relief ou futur mamelon au sommet duquel s'ouvrent les 15 à 20 orifices des canaux galactophores au fond d'une cupule. C'est à ce stade que le développement s'arrête chez le garçon (figure 10).



**Figure 10 :** Développement prénatal du sein (d'après Espie et Gorins, 1995). A la naissance, il n'existe qu'une ébauche glandulaire qui restera telle quelle chez le garçon.

#### - L'étape pubertaire.

De la naissance à la puberté (période prépubertaire), les évolutions morphologiques et histologiques sont minimes. On n'observe qu'une augmentation isométrique de son volume (Knight et Peaker, 1982), c'est-à-dire en rapport avec la croissance de la taille de l'animal. A la puberté, les modifications morphologiques sont plus importantes, mais surtout dues à une augmentation de la masse graisseuse, le développement des galactophores et des acini reste modéré. Les lobules ne se forment qu'après la première ovulation (14-15 ans) et le sein prend sa forme normale de nullipare.

#### - Gestation et la lactation.

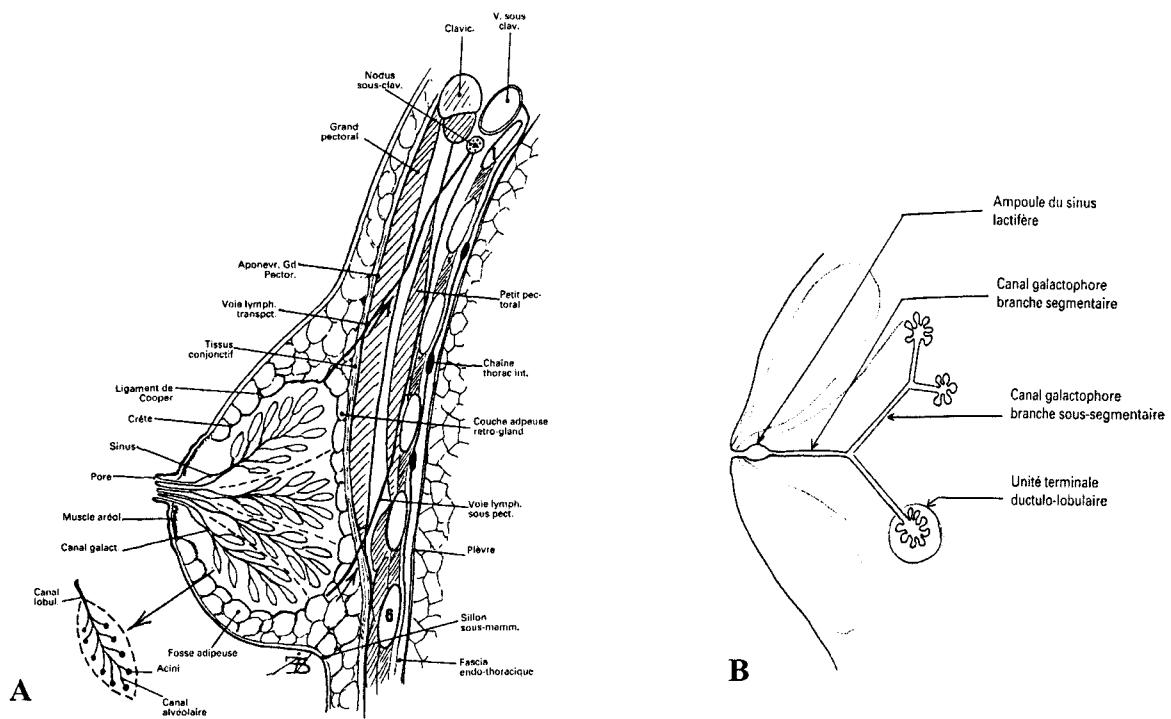
L'extension des canaux galactophores se produit pendant les 6 premiers mois de la grossesse et la différenciation des acini ne se fait qu'au cours des 3 derniers mois. Après l'accouchement, durant 2 à 3 jours, la sécrétion mammaire est fluide et jaunâtre (colostrum). Au 3<sup>ème</sup> jour, la sécrétion graisseuse augmente et le colostrum se transforme en lait. La glande mammaire n'achève donc son développement qu'avec la première lactation époque à laquelle les acini sont parfaitement différenciés. Lorsque la lactation est terminée, la glande subit une involution avec une très nette diminution de volume. Les cellules sécrétrices du lait se

détachent et la glande mammaire revient dans l'état où elle se trouvait avant la gestation (diminution du nombre de lobules et augmentation des dépôts adipeux).

- Involution.

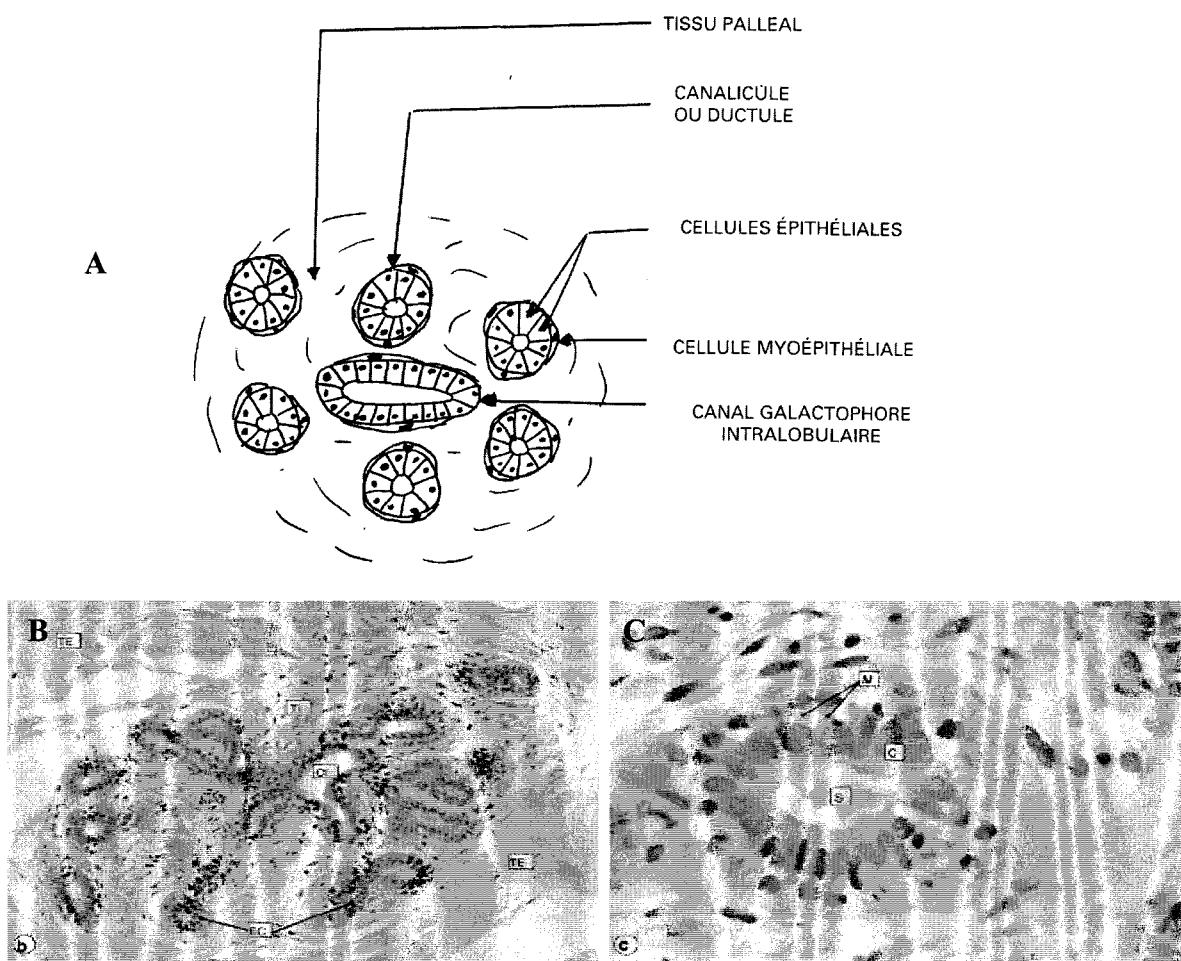
Après la ménopause, le sein subit une involution caractérisée par une atrophie des structures épithéliales : les lumières des canalicules se rétrécissent, la membrane basale s'épaissit et le tissu palléal se hyalinise. Cette involution peut se traduire par la disparition complète de certaines structures lobulaires et par l'atrophie kystique des canaux galactophores interlobulaires. Environ un tiers des canalicules persiste (trois à quatre par lobule). L'assise myoépithéliale peut devenir hypertrophique ou même hyperplasique. Le tissu conjonctif subit lui aussi des remaniements involutifs touchant les fibres élastiques et collagène aboutissant à une perte du tissu conjonctif de soutien et à une augmentation du tissu adipeux. Ce processus d'involution n'est pas uniforme dans tout le sein.

## 2) Structure et histologie de la glande mammaire.



**Figure 11 :** A) Structure et anatomie de la glande mammaire. B) Schéma de l'arbre galactophorique (d'après Espie et Gorins, 1995).

✓ La glande mammaire est constituée de lobes et de canaux galactophoriques entourés de tissu conjonctif dense dans lequel cheminent les vaisseaux sanguins (figure 11). Les acini sont groupés autour d'un canal alvéolaire (canal galactophage de 3<sup>ème</sup> ordre). Plusieurs canaux alvéolaires se réunissent et forment un canal lobulaire (canal de 2<sup>ème</sup> ordre) qui draine un lobule (figure 12). Plusieurs canaux lobulaires se réunissent à leur tour pour former un canal galactophage de 1<sup>er</sup> ordre et l'ensemble des lobules qu'il draine forme un lobe glandulaire. Chaque galactophage converge vers le mamelon où il présente une légère dilatation, le sinus lactifère (figure 11). Il y a 15 à 20 lobes séparés par des cloisons de tissu conjonctif et donc 15 à 20 canaux galactophores. Chaque lobe, avec son canal galactophage s'ouvrant à l'extérieur, constitue une glande mammaire au sens strict, mais on appelle en réalité couramment glande mammaire le regroupement de 15 à 20 glandes (figure 11).



**Figure 12 :** A) Structure schématique d'un lobule (d'après Espie et Gorins, 1995). B) Lobule mammaire. CI : canal intralobulaire ; EC : extrémités canalaires ; TI : tissu de soutien intralobulaire ; TE : tissu de soutien extralobulaire. C) Canal terminal intralobulaire. La couche interne de l'épithélium a un aspect cubique (C), tandis que la couche externe est constituée de cellules myoépithéliales (M) (d'après Stevens et Lowe, 1992).

### X - Structure du système canalaire de l'adulte.

Le système canalaire représente la composante fonctionnelle du sein et le tissu adipo-fibreux environnant forme la masse principale de la glande mammaire. Quel que soit son niveau dans l'arbre galactophorique, le système canalaire est tapissé par une double assise cellulaire comportant une couche épithéliale interne doublée par une couche discontinue de cellules myoépithéliales. Les cellules épithéliales cylindriques sont disposées perpendiculairement aux cellules myoépithéliales qui ont une forme allongée. Ces deux couches cellulaires reposent sur une membrane basale ; l'ensemble est entouré par un manchon fibroblastique plus ou moins développé en fonction du calibre canalaire. Le tissu conjonctif intra-lobulaire, encore appelé tissu palléal, entoure les canalicules (figure 12).

### X - Caractéristiques immunohistochimiques.

La cellule épithéliale cylindrique présente une immunoréactivité pour les différentes cytokératines. Lorsque cette cellule a une activité sécrétoire, elle présente une positivité pour l'anticorps anti-alpha-lactalbumine. La cellule myoépithéliale montre une forte positivité pour l'anticorps anti-actine et une positivité variable pour les anticorps anti-protéine S100 et les diverses cytokératines. L'immunoréactivité à l'actine permet donc de distinguer les cellules épithéliales des cellules myoépithéliales. La membrane basale est positive pour la laminine et pour le collagène de type IV.

### III.3 – Types de cancer du sein

Les cancers mammaires sont à 98 % des carcinomes qui naissent du revêtement épithelial des canaux (carcinomes canalaire) et des lobules (carcinomes lobulaires) et sont définis en fonction de leur caractère *in situ* ou infiltrant (les carcinomes canalaire infiltrants étant les plus fréquents).

Le carcinome *in situ* correspond à une prolifération tumorale maligne épithéliale et n'ayant donc pas encore franchi la membrane basale, par opposition au carcinome infiltrant (Sagliet et Antoine, 1996).

Le carcinome intracanalaire *in situ* (CCIS) est défini comme un "carcinome des galactophores n'infiltrant pas le tissu conjonctif". Il existe 4 types architecturaux (massif,

cribriforme, papillaire et comédo-carcinomateux). Il ne franchit pas la lame basale et son pronostic est excellent . Non traité, il peut évoluer vers une forme infiltrante.

- le carcinome lobulaire *in situ* (CLIS) est défini comme un "carcinome intéressant les canalicules intralobulaires qui sont comblés et distendus par une prolifération de cellules peu jointives sans envahissement du tissu conjonctif voisin". Il est volontiers bilatéral et évolue vers la forme infiltrante dans 20 % des cas.

Parmi les carcinomes infiltrants, on distingue :

- le carcinome canalaire infiltrant (CCI) (75 % des cancers du sein) ;
- le carcinome lobulaire infiltrant (CLI) (5 à 10 %) (fréquemment associé à des lésions de carcinome lobulaire *in situ*) ;
- les carcinomes infiltrants plus rares (carcinome médullaire à stroma lymphoïde, carcinome mucineux ou colloïde muqueux, carcinome tubuleux, carcinome cribiforme, carcinome papillaire, maladie de Paget).

Les autres cancers du sein :

Les tumeurs malignes en dehors des carcinomes primitifs du sein sont rares, représentent moins de 1 % de toutes les tumeurs malignes du sein et constituent un groupe de lésions disparates comportant les sarcomes phyllodes, les sarcomes mésenchymateux, les angiosarcomes, les lymphomes malins non hodgkiniens primitifs du sein.

### **III.4 – Marqueurs utilisés**

#### **1) Facteurs pronostiques dans les cancers du sein.**

De très nombreux facteurs pronostiques sont disponibles dans le cancer du sein et devant l'abondance de données biologiques, il convient de distinguer les facteurs pronostiques utilisés en pratique quotidienne et les facteurs non encore validés (recherche clinique) (Thyss et Pivot, 1998). Parmi les facteurs pronostiques, prédictifs de l'évolution métastatique, on distingue actuellement :

### **Les facteurs cliniques et histologiques.**

- l'âge (avant la ménopause, le pronostic est d'autant plus mauvais que la patiente est jeune) ;
- le diamètre de la tumeur ;
- l'envahissement ganglionnaire axillaire (3 groupes sont généralement admis : pN0 ou N-, 1-3N+,  $\geq$  4N+) ;
- le type histologique ;
- le grade histologique de la tumeur (S.B.R. : Scarff, Bloom et Richardson) ;
- la présence d'embols tumoraux vasculaires.

### **Les facteurs biologiques.**

- le taux de récepteurs aux œstrogènes (RE) et à la progestérone (RPg) présente une information pronostique et il est très utile en tant que facteur prédictif de réponse à la thérapie hormonale (on distingue les tumeurs négatives et positives pour les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone : < 10;  $\geq$  10 fmol/mg protéine respectivement). Les taux de récepteurs hormonaux sont les seuls à être détectés en routine.

D'autres marqueurs tissulaires ont été proposés mais ne sont pas utilisés dans la pratique. On peut les classer en :

- marqueurs de développement précoce (récepteur de l'IGF ou du FGF),
- marqueurs de développement tardif (récepteurs de l'EGF, erb-B2),
- marqueurs de prolifération (phase S, Ki67, thymidine kinase, incorporation de bromodéoxyuridine (BrdU)),
- marqueurs de l'activité métastatique (cathepsine-D, activateur du plasminogène et l'un de ses inhibiteurs PAI-1).

### 2) Gènes impliqués dans la carcinogenèse mammaire.

La carcinogenèse mammaire est un phénomène complexe, multifactoriel et impliquant plusieurs gènes, dans les formes héréditaires comme dans les formes sporadiques. L'hétérogénéité des cancers du sein aux niveaux clinique, histologique, biologique et évolutif implique qu'il n'existe pas une seule voie de la carcinogenèse mammaire, mais probablement

plusieurs chemins vers la cancérisation, avec des étapes (mutations géniques) différentes. De plus, la plupart des altérations géniques évoquées peuvent déjà exister au stade préinvasif, dans les carcinomes intra-canalaires, voire dans les hyperplasies canalaires ou lobulaires. Il existe une perte d'hétérozygotie, au niveau d'au moins une région chromosomique, dans 75 % des carcinomes canalaires *in situ*. Des études chez les femmes à haut risque permettront peut-être de mieux appréhender les étapes de la carcinogenèse mammaire. L'essor des techniques et de la connaissance du génome humain améliorent déjà notre compréhension de ce phénomène.

De nombreuses modifications géniques ont été décrites dans les cancers du sein humains (Oudard, 1997). Parmi ces altérations on retrouve celles des oncogènes, dont les produits sont essentiellement des facteurs de croissance ou des molécules impliquées dans leur signalisation, et celles des gènes suppresseurs de tumeur). On ignore encore si ces gènes sont impliqués à des stades précoce ou tardifs de la carcinogenèse mammaire. Aucune des altérations géniques citées n'est spécifique du cancer du sein et encore moins constante. C'est le cas par exemple des gènes de prédisposition *brca1* et *brca2* dont la modification n'est pas une étape indispensable dans la Cancérogenèse mammaire.

### **Altérations des oncogènes dans le cancer du sein.**

Parmi les altérations d'oncogènes dans les cancers du sein, on retrouve, dans environ 30 % des cas, une amplification génique de *erb-B<sub>2/neu</sub>*, *myc* et du gène de la cycline D1. Le gène *erb-B<sub>2</sub>* code pour une protéine membranaire de 185 kDa, ayant beaucoup d'homologie avec le récepteur de l'EGF et qui serait le récepteur membranaire d'un facteur de croissance isolé en 1992 (héréguline). Aucune mutation ponctuelle de ce gène n'a été retrouvée dans les tumeurs mammaires humaines. Par contre, il est amplifié dans 10 à 46 % des cas. Cette amplification est accompagnée d'une surexpression de l'ARN messager et de la protéine (revue dans Révillion *et al.*, 1998).

Le gène *c-myc* est l'homologue cellulaire d'un oncogène viral, *v-myc*, du retrovirus MC29. La fonction précise de ce gène n'est pas encore connue, bien que l'on sache qu'il code pour un facteur de transcription nucléaire, capable de se lier à l'ADN, et impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire normale, et dans la transformation et la différenciation de plusieurs lignées cellulaires (revue dans Nass et Dickson, 1997). Dans les tumeurs mammaires, une amplification de ce gène est retrouvée dans environ 20 % des cas. Cette

amplification semble plus fréquente en cas d'atteinte ganglionnaire axillaire, ou de grade histopronostique élevé.

Le gène *CCND1* (ou *Bcl1* ou *PRAD1*) code pour une protéine de la famille des cyclines (cyclin D1). Les protéines de cette famille agissent comme élément central du cycle cellulaire en régulant l'activité des kinases cycline-dépendantes, avec pour conséquence le passage en phase G1, S ou M. Dans les cancers du sein peut exister une amplification génique, mais également une surexpression de la protéine, dans plus d'un tiers des cas (revue dans Hosokawa et Arnold, 1998). La présence d'une amplification de 11q13, associant le gène de la cycline D1, et les gènes *int2* (FGF-3) et *hst* (FGF-4), semble plus fréquente dans les tumeurs mammaires exprimant les récepteurs de l'oestradiol (revue dans Frierson *et al.*, 1996).

Deux autres gènes codant pour des récepteurs des FGFs (*bek* en 10q24, et *flg* en 8p12) présentent une amplification dans moins de 15 % des cas (Wellstein, 1994).

#### **Altérations des gènes suppresseurs de tumeur dans le cancer du sein.**

La découverte des antioncogènes est plus récente que celles des oncogènes. Contrairement à ces derniers, qui sont responsables de tumeurs quand un seul des allèles est muté, ce sont des gènes suppresseurs de tumeur (ou de croissance), qui sont, en général, responsables de tumeur lorsque leurs 2 allèles sont mutés, ce qui entraîne la perte de leur fonction normale.

La protéine p53 est une phosphoprotéine nucléaire qui joue un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire, de la réparation et de la synthèse de l'ADN, de la différenciation et de la mort cellulaire programmée (apoptose). Un niveau d'expression élevé de cette protéine est de mauvais pronostic (Peyrat *et al.*, 1998). Une perte d'hétérozygotie au niveau de la région 17p13, où se situe le gène *p53*, est retrouvée dans plus de la moitié des cas étudiés. *p53* est muté dans environ 20 % des tumeurs mammaires (Hollstein *et al.*, 1991).

Le gène *rb*, premier gène suppresseur de tumeur découvert, est impliqué dans le rétinoblastome de l'enfant. Il code pour une protéine de 105 à 110 kDa, impliquée dans le contrôle de la croissance cellulaire et du cycle cellulaire et qui peut se lier à différentes protéines cellulaires, dont les cyclines D. On retrouve une perte d'hétérozygotie au niveau de la région 13q14 ou au niveau du gène *rb* lui-même dans environ 30 % des cas ; une anomalie structurale du gène, sous forme de microdélétion ou de mutation, dans environ 20 % des cas ; une perte d'expression de la protéine dans 15-30 % des cas. Les études sont cependant très

limitées dans le cancer mammaire (Steeg, 1992, Porter-Jordan et Lippman, 1994). Le gène *brca2* est localisé à proximité du gène *rb* et, comme lui, est souvent déleté (revue dans Van Golen *et al.*, 1999).

Le gène *brca1* est localisé en 17q21. Il existe une coségrégation des allèles de plusieurs gènes de cette région chromosomique et du cancer du sein héréditaire. Le cancer du sein héréditaire pur ou associé au cancer ovarien héréditaire représente la majorité des cancers du sein héréditaires et moins de 5 % des cancers du sein. Seule cette forme de cancer héréditaire est liée à une mutation germinale de *brca1*. Ce gène jouerait un rôle dans la carcinogenèse mammaire, non seulement dans les formes héréditaires, mais aussi dans les formes sporadiques. En effet, il existe une perte d'hétérozygotie au niveau de cette région chromosomique dans plus de 50 % des cas de tumeurs sporadiques, ce qui en fait la région la plus souvent anormale pour l'ensemble des cancers du sein (revue dans Van Golen *et al.*, 1999).

La cadhérine E est une molécule d'adhérence intercellulaire des tissus épithéliaux. Son expression dans les adénocarcinomes est inversement corrélée à l'invasivité de ces tumeurs (Heimann *et al.*, 2000). Des mutations du gène ont été décrites dans des lignées de cancers du sein, comme dans des tumeurs, en particulier de forme lobulaire. Ce gène est localisé en 16q22, région qui présente assez fréquemment des pertes d'hétérozygotie (revue dans Berx *et al.*, 1998).

La protéine p16<sup>INK4a</sup>, dont le gène (*MTS1*) est localisé en 9p21, est un inhibiteur spécifique d'une kinase dépendant des cyclines et est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Il existe des délétions de ce gène dans 46 % des lignées étudiées et en particulier dans 6/10 lignées de cancer du sein (revue dans Tsihlias *et al.*, 1999).

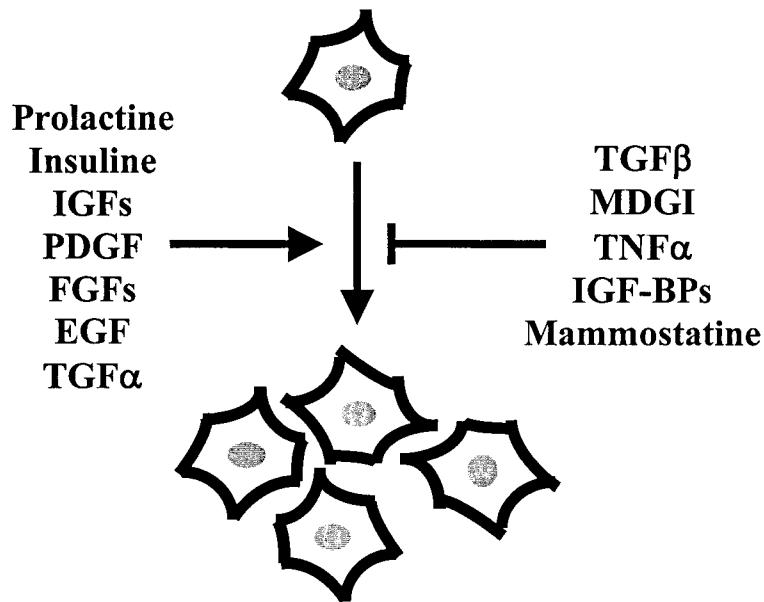
L'acquisition d'un phénotype hautement métastatique par les cellules tumorales, notamment dans les cancers mammaires canalaires infiltrants, s'accompagne d'une réduction de l'expression du gène *NM23* (localisé sur le chromosome 17) qui code pour une protéine de 17 kDa dont la fonction est inconnue. L'expression de la protéine semble corrélée à l'existence d'une forme bien différenciée, sans envahissement ganglionnaire, et de meilleur pronostic. Une étude a montré la perte d'un allèle de ce gène dans 64 % des cas (revue dans Steeg *et al.*, 1993).

### **Altération d'autres gènes dans le cancer du sein.**

Les altérations du gène du récepteur à l'œstradiol (RE) ont été rarement retrouvées dans les tumeurs mammaires, qu'il s'agisse de mutations ponctuelles (sur les nucléotides 257 et 261) ou d'amplification. L'étude de l'ARN messager du RE montre qu'il existe dans un nombre de cas étudiés encore limité, des délétions ou des mutations ponctuelles de ce récepteur, ou des formes variantes, dues à un épissage alternatif du gène (Rennie *et al.*, 1993). Certaines de ces variantes restent liées de manière constitutive à l'ADN, et ne sont plus influencées par l'œstradiol. On ne connaît pas la signification biologique et les conséquences thérapeutiques d'une telle anomalie, qui demande des études plus larges.

### **III.5 – Croissance des cellules de cancer du sein**

Le développement d'un cancer du sein implique un ensemble de signaux de prolifération entre les cellules tumorales et le tissu normal environnant. Les facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales ou par les cellules normales en réponse aux stimuli exocrines, paracrines ou autocrines semblent essentiels à la croissance et au potentiel métastatique des cellules malignes (Aaronson, 1991). Dans les conditions physiologiques, l'expression des facteurs de croissance polypeptidiques est finement régulée, assurant l'homéostasie des tissus normaux. Ils jouent aussi un rôle important lors du développement du tissu embryonnaire. Dans le cas d'un tissu hormono-dépendant tel que le cancer du sein, les hormones qui stimulent la prolifération cellulaire, peuvent induire la sécrétion de facteurs de croissance et réguler leur expression. Certains facteurs de croissance peuvent induire une néovascularisation tumorale non seulement indispensable pour la prolifération mais aussi favorisant la dissémination métastatique. L'implication des facteurs de croissance et de leurs récepteurs dans le développement tumoral s'appuie sur la constatation que beaucoup d'oncogènes connus codent soit pour des facteurs de croissance (l'oncogène *c-sis* code pour la chaîne b du PDGF), soit pour des récepteurs de facteurs de croissance (*c-fms* code pour le récepteur du colony stimulating factor-1, CSF-1), soit pour des enzymes associées à la transduction du signal (protéine Ras). Les facteurs de croissance et hormonaux impliqués dans la croissance de la glande mammaire sont détaillés ci-dessous (figure 13).



**Figure 13 :** Les facteurs inhibiteurs et stimulateurs de la croissance des cellules mammaires.

### Les facteurs stimulateurs de la croissance

La prolactine (PRL) est également un puissant facteur de prolifération des cellules épithéliales mammaires *in vivo* (Nicoll et Bern, 1972). Elle est essentielle au développement de la glande mammaire. *In vitro*, elle stimule la prolifération de la lignée cancéreuse mammaire T47D, mais elle n'est capable de la stimuler *in vivo* qu'en présence d'œstradiol. Les récepteurs de la prolactine appartiennent à une famille plus large comprenant le récepteur de l'hormone de croissance et des interleukines 2 et 4 et du GM-CSF (Kelly *et al.*, 1991). On retrouve des récepteurs de PRL (R-PRL) sur des membranes de cancer du sein dans environ 40 % des cas, sans incidence pronostique (DePlacido *et al.*, 1990).

L'insuline est connue pour stimuler la prolifération des cellules épithéliales mammaires *in vitro* et *in vivo*. Elle agit par l'intermédiaire des récepteurs des IGFs (revue dans Strobl *et al.*, 1995).

L'IGF-I et l'IGF-II présentent de grandes homologies structurales avec l'insuline. Les IGFs sont de puissants mitogènes pour les lignées tumorales mammaires (Karey *et al.*, 1988 ; Yee *et al.*, 1989) qui expriment leurs récepteurs respectifs (Osborne *et al.*, 1989). L'IGF-I et l'IGF-II stimulent la prolifération des cellules épithéliales mammaires tumorales hormono-sensibles et hormono-insensibles par l'intermédiaire du récepteur de l'IGF-I (Osborne *et al.*, 1989 ; Peyrat *et al.*, 1990) qui a été retrouvé amplifié de manière sporadique dans les cancers du sein (Berns *et al.*, 1992). Des lignées tumorales mammaires MCF-7 et T47D sont capables de sécréter l'IGF-II sous l'influence d'œstrogènes (Yee *et al.*, 1989). Par contre l'IGF-I est surtout sécrété par le stroma et agit de manière paracrine (Yee *et al.*, 1989).

Les cellules épithéliales tumorales humaines T47D expriment des récepteurs spécifiques du platelet-derived growth factor (PDGF) et leur prolifération est stimulée par les PDGF-AA et PDGF-AB (Rozengurt *et al.*, 1985). De plus, il est intéressant de constater que les cellules épithéliales mammaires normales humaines en culture sécrètent, d'une manière prédominante, du PDGF-AA, tandis que les cellules tumorales sécrètent essentiellement du PDGF-BB (Bronzert *et al.*, 1987).

La famille des fibroblast growth factors (FGFs) comprend maintenant une vingtaine de membres qui présentent 40 à 50 % d'homologie. Ces polypeptides présentent des analogies structurales avec les proto-oncogènes *hst* (FGF-4) et *int2* (FGF-3) (Dickson, 1990). Les gènes de FGF les plus souvent exprimés dans les cellules tumorales mammaires sont le FGF-1 (FGF acide) et le FGF-2 (FGF basique) (90 % des tumeurs) (Wellstein, 1994). Les cellules MCF-7 surexprimant le FGF-4 acquièrent la capacité de former des tumeurs après transplantation dans des souris immuno-déprimées sans supplémentation par des œstrogènes et on note une augmentation de fréquence des micrométastases. La surexpression du FGF-4 induit dans les lignées cellulaires de cancer du sein une résistance aux effets anti-prolifératifs du tamoxifène (Kern *et al.*, 1994). Certaines lignées tumorales mammaires sécrètent du FGF et le FGF-2 stimule la prolifération des cellules épithéliales mammaires tumorales MCF-7 et T47D (Karey *et al.*, 1988 ; Dickson *et al.*, 1992). La stimulation de l'angiogenèse par un effet paracrine du FGF est un autre mécanisme invoqué pour expliquer l'effet du FGF sur la croissance tumorale et le rôle qu'il pourrait jouer dans les métastases du cancer du sein (Folkman, 1990 ; Takey *et al.*, 1984). Actuellement 4 protéines réceptrices ont été caractérisées ainsi que de nombreux isoformes. Une amplification des gènes codant pour les FGFR1 et FGFR2 a été rapportée dans 20 % des cancers du sein (Adnane *et al.*, 1991 ; Klagsbrun et Baird, 1991).

L'epidermal growth factor (EGF) appartient à une famille de facteurs de croissance comprenant également le TGF $\alpha$ , l'amphiréguline, le crypto 1 et les hérégulines (Carpentier et Wahl, 1990 ; Holmes *et al.*, 1992 ; Kraus *et al.*, 1989). L'EGF est nécessaire à la croissance clonale des cellules mammaires épithéliales humaines. Les cellules épithéliales mammaires tumorales prolifèrent en l'absence d'EGF exogène, mais la présence de ce dernier stimule leur prolifération (Lippman et Dickson, 1989).

L'effet du transforming growth factor- $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) est médié par le récepteur de l'EGF (EGF-R) (Derynck, 1988). Ce facteur est responsable des mêmes effets biologiques que l'EGF dans les cellules épithéliales mammaires humaines et murines. Toutes les lignées épithéliales mammaires tumorales sécrètent du TGF $\alpha$  et des facteurs à activité EGF qui agissent sur les cellules sécrétrices elles-mêmes (fonction autocrine) ou sur les cellules voisines (fonction paracrine). Alors que la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules hormono-sensibles est contrôlée par les oestrogènes (action stimulatrice) et par les anti-oestrogènes (action inhibitrice) (Bates *et al.*, 1988 ; Bates *et al.*, 1990 ; Gregory *et al.*, 1989), les lignées RE-négatives sécrètent de façon constitutive des quantités importantes de ces facteurs de croissance. Une expression détectable ou élevée d'EGF-R dans 20 à 40 % des tumeurs mammaires a été rapportée par plusieurs équipes dès 1984 et paraît avoir une valeur pronostique défavorable. Une méta-analyse ne semble cependant pas confirmer l'intérêt pronostique de l'EGF-R pour les cancers du sein, tout au moins en l'absence d'une méthode analytique standardisée (Klijn *et al.*, 1992). A ce titre, l'EGF-R et ses homologues sont des facteurs pronostiques particulièrement étudiés dans les cancers du sein.

### **Les facteurs inhibiteurs de la croissance des cellules épithéliales mammaires**

Plusieurs familles de facteurs de croissance peuvent avoir des effets inhibiteurs de la croissance des cellules de cancer du sein (revue dans Rouayrenc, 1997 ; Le Bourhis *et al.*, 2000). Le transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) appartient à une famille de facteurs de croissance et de différenciation comprenant les inhibines et les activines (Massague, 1990). Les TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 2 stimulent la croissance des fibroblastes, mais inhibent celle des lignées épithéliales mammaires tumorales (Hosobuchi et Stampfer, 1989 ; Massague, 1990 ; Sporn et Roberts, 1990). Le TGF $\beta$  module aussi la différenciation cellulaire. L'action inhibitrice du

TGF $\beta$  sur des lignées RE-positives est controversée : alors que plusieurs groupes ont observé une inhibition significative de la prolifération des lignées RE-positives (MCF-7, ZR-75-1, T47D) par les TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 2 (Knabbe *et al.*, 1990 ; Roberts et Sporn, 1989), d'autres travaux ont conduit à établir une hypothèse selon laquelle le TGF $\beta$  n'agirait que sur les cellules ER-négatives (Arteaga *et al.*, 1988) ; ainsi, dans certaines conditions de culture, les cellules MCF-7 peuvent être sélectionnées par leur résistance au TGF $\beta$  (Hosobuchi et Stampfer, 1989). Les lignées cellulaires établies *in vitro* étant (à l'image de la situation *in vivo*) pour la plupart des populations mixtes (RE-positives et RE- négatives) en proportions variables, le TGF $\beta$  n'agirait que sur la fraction négative. Les TGF $\beta$  sécrétés sont différents selon les cellules considérées : la lignée T47D sécrète 3 types de TGF $\beta$ , les cellules ZR-75-1 sécrètent les TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 3, les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 sécrètent les TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 2. Dans les lignées œstrogéno-sensibles, la sécrétion de ces TGF $\beta$  est inhibée par les œstrogènes et stimulée par les anti-œstrogènes. La régulation du TGF $\beta$ 1 par les anti-œstrogènes est contrôlée au niveau post-transcriptionnel, probablement via des protéases spécifiques qui permettent la transformation du TGF $\beta$  latent en forme active. Par contre, la modulation du TGF $\beta$ 2 semble être contrôlée au niveau transcriptionnel (Knabbe *et al.*, 1990; Murphy *et al.*, 1988).

Bien que le TGF $\beta$  soit le facteur inhibiteur des cellules mammaires tumorales le mieux décrit, d'autres facteurs interviennent également pour inhiber la prolifération de ces cellules. Parmi ceux-ci, on peut citer le MDGI, le TNF $\alpha$ , les mammostatines et les IGF-BP. Le mammary-derived growth inhibitor (MDGI) est un polypeptide de 13 kDa détecté dans les cellules épithéliales de la glande mammaire pendant la période de lactation (Müller *et al.*, 1989). Il a à la fois des effets inhibiteurs de la croissance mammaire et activateurs de la différenciation glandulaire (Kurtz *et al.*, 1990). Il bloque la croissance des cellules épithéliales normales et partiellement la différenciation maligne des cellules mammaires (Yang *et al.*, 1994). Exprimé fortement au cours de la lactation, le MDGI stimule la différenciation de la glande mammaire avec un agrandissement de la lumière et la synthèse de  $\beta$ -caséine (Russell et Russo, 1987).

Le tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), connu comme cytokine, est un inhibiteur des cellules cancéreuses mammaires dont il stimule la différenciation. Il a également un rôle

inhibiteur de la différenciation lobulaire en absence d'EGF, en inhibant la production de  $\beta$ -caséine par les cellules glandulaires du sein (Ip *et al.*, 1992).

La mammostatine est un polypeptide 65 kDa sécrété par des cellules mammaires épithéliales normales humaines (Ervin *et al.*, 1989). Elle inhibe la croissance des cellules mammaires tumorales (MCF-7, BT-20, MDA-MB-231, ZR-75-1) de façon dose-dépendante et présente une grande spécificité tissulaire puisqu'elle n'agit que sur les tumeurs mammaires. La sécrétion de cette protéine n'a pas été observée dans les cellules tumorales, et cette production faible ou quasi nulle de la mammastatine dans ces cellules pourrait rendre compte en partie de l'échappement des tumeurs au contrôle normal de la prolifération cellulaire.

Les IGF-1 et IGF-2 ne sont pas libres, mais liées aux insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) avec lesquelles elles forment un complexe de 150 kDa (Harel, 1996). La famille des IGFBP comprend six membres dont les plus importants dans l'inhibition des cancers du sein sont l'IGFBP-1 et l'IGFBP-3 qui agissent en inhibant la fixation de l'IGF sur son récepteur. Toutefois, l'IGFBP-3 possède également une action antiproliférative propre, indépendante des récepteurs de l'IGF-1 (Oh *et al.*, 1993).

## *Travaux personnels*

---

Un demi siècle d'étude des effets neurotrophiques du NGF dans le système nerveux ne doit pas masquer les autres activités de ce facteur de croissance. Quelques équipes ont montré récemment que le NGF est également capable de stimuler la migration, la survie ou la prolifération de quelques types cellulaires non-neuronaux. Ces effets sur les cellules épithéliales mammaires n'ont cependant pas encore été étudiés. Le développement du cancer du sein est sous l'influence de nombreux facteurs et notre étude a pour but de mettre en évidence le rôle du NGF dans cette pathologie. Les résultats de nos travaux présentés dans les articles suivants démontrent les effets biologiques du NGF sur les cellules de cancer du sein et mettent en évidence les mécanismes de transduction de ce facteur dans notre modèle ainsi que la valeur pronostique de l'expression de ses récepteurs dans le cancer du sein.

# I - Le nerve growth factor est mitogène pour les cellules épithéliales mammaires humaines cancéreuses, mais pas pour les cellules normales

## I.1. - Introduction

Le développement d'une tumeur résulte notamment de l'influence de nombreux facteurs qui peuvent stimuler ou inhiber sa croissance. Nous avons vu dans les généralités que le NGF n'est pas un facteur strictement neurotrophique et qu'il peut agir sur quelques types cellulaires non-neuronaux. Afin de connaître son rôle dans le cancer du sein, nous avons mesuré son effet sur la croissance et la durée du cycle cellulaire de différentes lignées cancéreuses hormono-sensibles ou hormono-insensibles ainsi que sur des cellules épithéliales mammaires normales issues de mammoplastie. Nous avons ensuite recherché si les récepteurs du NGF étaient exprimés dans ces cellules et s'ils étaient capables de médier une signalisation intracellulaire en présence de leur ligand. Les résultats obtenus ont fait l'objet des publications ci-après.

**I.2. – Article 1 :**

**"NERVE GROWTH FACTOR IS MITOGENIC FOR CANCEROUS BUT NOT NORMAL  
HUMAN BREAST EPITHELIAL CELLS"**

Cet article a été publié en 1998 dans la revue :

**"The Journal of Biological Chemistry" (vol. 273, pp : 16659-16662).**

# Communication

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY  
Vol. 273, No. 27, Issue of July 3, pp. 16659–16662, 1998  
© 1998 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.  
Printed in U.S.A.

## Nerve Growth Factor Is Mitogenic for Cancerous but Not Normal Human Breast Epithelial Cells\*

(Received for publication, March 12, 1998)

Simon Descamps, Xuefen Lebourhis,  
Maryse Delehedde, Bénoni Boilly,  
and Hubert Hondermarck†

From the Unité de Dynamique des Cellules Embryonnaires et Cancéreuses (EA 1033), Centre de Biologie Cellulaire, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

We show here that nerve growth factor (NGF), the archetypal neurotrophic factor, is able to stimulate the proliferation of breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines), although it is unable to stimulate growth of normal breast epithelial cells (NBEC). This stimulation induced cells in the G<sub>0</sub> phase to reenter the cell cycle, as well as shortening cell cycle duration. Immunoblotting experiments revealed that both the two cancer cell lines and the NBEC express high affinity (p140<sup>trk</sup>) and low affinity (p75) NGF receptors. Inhibition of the NGF growth-promoting effect by the drugs K-252a and PD98059 indicated that activation of Trk-tirosine kinase activity and the mitogen-activated protein kinase cascade are necessary to obtain the mitogenic effect. Activation of mitogen-activated protein kinase can be detected in breast cancer cells after 10 min of NGF stimulation, whereas no change was detected in NBEC. These results demonstrate that NGF is a mitogenic factor for human breast cancer cells and that it might constitute a new regulator of breast tumor growth.

The growth of breast cancer cells can be regulated by various growth factors that stimulate or inhibit their proliferation and/or differentiation (1). For example, epidermal growth factor, insulin-like growth factors, and transforming growth factor  $\alpha$  can all stimulate the proliferation of breast cancer cells, whereas mammary-derived growth factor inhibitor and transforming growth factor  $\beta$  inhibit their growth. In fact, with the exception of mammary-derived growth factor inhibitor, these molecules were not first identified as growth regulators in breast cancer cell assays but only secondarily appeared to be implicated in mammary tumor development.

Nerve growth factor (NGF)<sup>1</sup> is the prototypical member of the neurotrophin polypeptide family (2), which includes brain-

derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophins 3–6 (NT-3, NT-4/5, and NT-6). NGF is essential for the survival and differentiation of central and peripheral neuronal cells, and its role in the development and regeneration of the sympathetic and sensory nervous system has been extensively described (3). It has been shown to interact with two types of membrane binding sites: the high affinity receptor tyrosine kinase (p140<sup>trk</sup>), which corresponds to the TrkA proto-oncogene, and an accessory receptor known as p75 for which the precise function is still controversial but does not involve tyrosine kinase activity (4, 5). In addition to its neurotrophic function, several other activities for NGF have been described. For example, exposure to an NGF gradient is chemotactic for melanocytes (6), and antibodies directed against either NGF or p75 strongly inhibit the migration of Schwann cells (7). NGF has also been reported to stimulate the proliferation of a number of cell types such as chromaffin cells (8) and lymphocytes (9). Blocking antibodies directed against NGF can inhibit the cellular growth of keratinocytes, which led to the idea that NGF might be an endogenous mitogenic factor produced by these cells (10). The potential mitogenic activity of NGF raises the question of its possible implication in carcinogenesis. Until now, evidence implicating NGF in cancer was derived from human prostatic cells where production of NGF induces tumor cell growth and invasion (11, 12). This effect is mediated by p140<sup>trk</sup> and p75 and suggests that NGF is involved in prostatic carcinogenesis.

On the basis of these previously reported non-neurotrophic activities of NGF, we have investigated here the potential activity of this factor in breast cancer, which is one of the most frequent forms of human cancer. We demonstrate for the first time that NGF is mitogenic for breast cancer cells, whereas it has no effect on the proliferation of normal breast epithelial cells. The NGF interaction is mediated through p140<sup>trkA</sup> and p75 receptors, and such stimulation of breast cancer cell growth involves both tyrosine kinase activation and the MAP kinase pathway.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—Monoclonal anti-nerve growth factor receptor antibodies (clone 8211) were purchased from Boehringer Mannheim, and polyclonal anti-p140<sup>trkA</sup> antibody (trk 763) was from Santa Cruz. Cell culture reagents were from Eurobio (France). Recombinant human nerve growth factor was from R & D Systems (France). K-252a (inhibitor of Trk-tirosine kinase activity) and PD98059 (inhibitor of MAP kinase cascade) were from Calbiochem (France). PY20 anti-phosphotyrosine, anti-MAP kinase (anti-ERK2) monoclonal antibodies, and protein A-agarose were purchased from Transduction Laboratories.

**Cell Culture**—The MDA-MB-231 and MCF-7 cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection and routinely grown as monolayer cultures. Cells were maintained in minimal essential medium (Earle's salts) (Eurobio) supplemented with 20 mM Hepes, 2 g/liter sodium bicarbonate, 2 mM L-glutamine, 10% fetal calf serum, 100 units/ml of penicillin-streptomycin, 50  $\mu$ g/ml gentamycin, 1% of nonessential amino acids, and 5  $\mu$ g/ml of insulin. Normal human breast epithelial cell (NBEC) cultures were established as described previously (13) from reduction mammoplasty (women aged 20–40 years) obtained in the Department of Plastic Surgery (Dr. Pellerin) of the Medical University of Lille (France). Rat pheochromocytoma cells (PC12) were grown in Dulbecco's modified minimum essential medium (Eurobio) supplemented with 3 g/liter sodium bicarbonate, 4 mM L-glutamine, 10% fetal calf serum, 5% horse serum, and 100 units/ml of penicillin-streptomycin. All cells were maintained in a humidified atmosphere of 95% air and 5% carbon dioxide at 37 °C.

**Growth Assay**—Experiments were performed as follows. 35-mm di-

\* This work was supported by the Region Nord Pas de Calais and the French ministry of Education. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-20-43-40-97; Fax: 33-3-20-43-40-38; E-mail: Hubert.Hondermarck@univ-lille1.fr.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: NGF, nerve growth factor; MAP, mitogen-activated protein; MAPK, MAP kinase; NBEC, normal breast epithelial cells; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

ameter dishes were inoculated with  $2 \times 10^4$  cells/dish in 2 ml of medium containing 10% fetal calf serum. After 24 h, cells were washed twice with serum-free medium. Next day, the medium was replaced with 2 ml of medium containing different concentrations of NGF. When studying NGF effects as a function of time, a concentration of 100 ng/ml was used, and cells were counted after 1, 2, and 3 days of stimulation. To study the effect of K-252a and PD98059, various concentrations of the inhibitors were added simultaneously with NGF (100 ng/ml). After 2 days of NGF exposure, cells were harvested by trypsinization and counted using an hemocytometer.

**Cell Cycle Parameter Study**—Measurements of cell cycle parameters were performed following methods previously described (14). The percentage of cells in S + G<sub>2</sub> + M phases was determined after Feulgen staining and microscopic image analysis on a Samba 200 (TITN) processor. The nuclei were analyzed automatically by calculating parameters related to the densitometry and texture of chromatin. The proportion of cells in S + G<sub>2</sub> + M phases was determined with computerized integrated optical density histograms. Cell cycle duration was determined after bromodeoxyuridine incorporation (15).

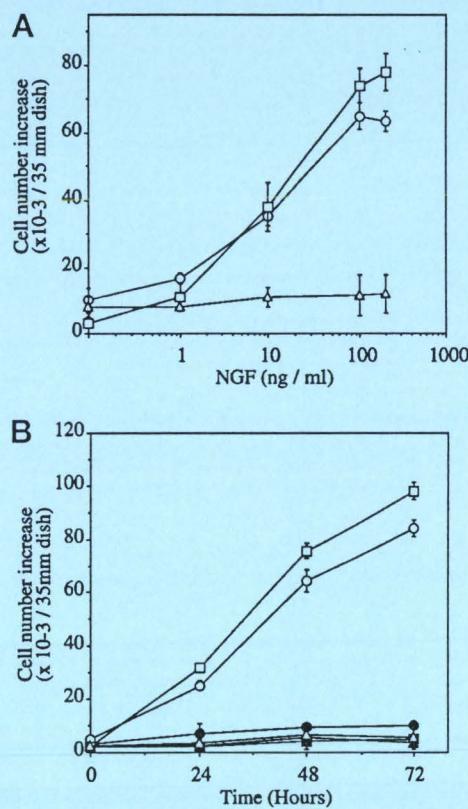
**NGF Receptor Immunoblotting**—Subconfluent cell cultures were harvested by scraping in serum-free medium. After centrifugation (1000 × g, 5 min), the pellet was treated with lysis buffer (0.3% SDS, 200 mM dithiothreitol) and boiled 5 min. The lysates were subjected to SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane (Immobilin-P, Millipore) by electroblotting (100 V, 75 min), and probed with either rabbit anti-Trk polyclonal antibody (2 µg/ml, Santa Cruz) or mouse anti-p75 monoclonal antibody (1 µg/ml, Boehringer Mannheim) at 4 °C overnight. The membrane was then incubated at room temperature for 3 h with goat anti-rabbit immunoglobulin G-conjugated peroxidase for TrkA detection and goat anti-mouse immunoglobulin G for p75 detection. The reaction was revealed using the chemiluminescence kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech) with Kodak X-Omat AR film.

**Detection of MAP Kinase Activation**—Proteins were extracted in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 100 µM sodium orthovanadate) prior to immunoprecipitation. Preclearing was done with protein A-agarose (10 µl/250 µl) (60 min, 4 °C). After centrifugation (10,000 × g, 2 min), the supernatant was incubated with monoclonal anti-MAPK (anti-Erk2) antibody (10 µl/250 µl, 60 min, 4 °C). Protein A-agarose (10 µl) was added for 60 min (4 °C) and then pelleted by centrifugation (10,000 × g, 2 min). The pellet was then rinsed three times with lysis buffer and boiled for 5 min in Laemmli buffer. After SDS-PAGE and electroblotting, nitrocellulose membranes were blocked with 3% bovine serum albumin. Membranes were then treated with PY20 antibody overnight at 4 °C, rinsed, and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG for 3 h at room temperature. Membranes were rinsed overnight at 4 °C before visualization with ECL.

## RESULTS

**The Effect of NGF on Breast Epithelial Cell Proliferation**—The effects of various concentrations of NGF were assessed after 48 h of exposure. The growth stimulatory effect of NGF on the breast cancer cell lines was dose-dependent (Fig. 1A). The highest level of stimulation was observed at a concentration of 100 ng/ml, for which the cell number was approximately 3-fold greater than for the unstimulated situation, and corresponded to approximately 70% of the level obtained in presence of 10% fetal calf serum. The effect of the duration of NGF exposure was estimated after 1, 2, and 3 days of stimulation at an NGF concentration of 100 ng/ml (Fig. 1B). For the cancer cell lines, an increase in cell number was noticeable after 24 h. The mitogenic effect of NGF was also observed for two other breast cancer cell lines: T47-D and BT20 (data not shown). This was in contrast to the NBEC, for which we did not find any NGF growth stimulation. On the contrary, NBEC can be stimulated to grow in the presence of epidermal growth factor (50 ng/ml) or in the presence of fetal calf serum (5%).

The percentage of cells in S + G<sub>2</sub> + M phases and cell cycle duration in the presence or absence of 100 ng/ml of NGF are shown in Table I. MCF-7 cells treated with NGF displayed an increase of 2–3-fold in the percentage of cells in S + G<sub>2</sub> + M phases and a decrease in cell cycle duration from 45 to 30 h. No change in any of the measured cell cycle parameters was detected for NBEC in the presence of NGF.



**FIG. 1. NGF effect on normal and breast cancer epithelial cells.** *A*, dose effect of NGF on breast epithelial cell number. *B*, effect of 100 ng/ml of NGF on breast epithelial cells as a function of time. For both experiments cells (MCF-7, squares; MDA-MB-231, circles; NBEC, triangles) were harvested in minimum essential medium and after 24 h NGF was added (open symbols) or not (closed symbols) at the indicated concentrations. After 48 h or reported times, cells were harvested and counted. Results are expressed as the means ± S.D. of five separate experiments.

**TABLE I**  
*NGF effect on cell cycle parameters of cancerous (MCF-7 and MDA-MB-231) and normal (NBEC) breast epithelial cells*

Results represent the mean values of five separate experiments. Minimal and maximal values are given in parentheses.

		S + G <sub>2</sub> + M	Cell cycle duration
		%	h
MCF-7	Control	13 (11–14)	45 (43–48)
	NGF	29 (28–30)	30 (27–32)
MDA-MB-231	Control	21 (20–22)	32 (31–33)
	NGF	34 (32–35)	27 (24–30)
NBEC	Control	11 (10–12)	50 (46–53)
	NGF	13 (10–15)	50 (46–53)

**Immunodetection of NGF Receptors**—Normal and breast cancer epithelial cells exhibited a band of TrkA immunoreactivity at approximately 140 kDa after Western blotting (Fig. 2A). The anti-TrkA antibody used in this study does not cross-react with the other neurotrophin receptors TrkB and TrkC. The anti-p75 antibody gave rise to one immunoreactive band at 75 kDa for all cell types studied (Fig. 2B). These molecular masses of 140 and 75 kDa correspond to what is obtained with PC12 cells, which have been extensively used to study NGF receptors (4). The intensity of the p75 and TrkA immunoreactivity was about the same in the cancer cells as in NBEC.

**Tyrosine Kinase and MAP Kinase Activation**—K-252a and PD98059 induced a dose-dependent inhibition of the NGF growth stimulatory effect on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells (Fig. 3A). This indicated that Trk-tirosine kinase

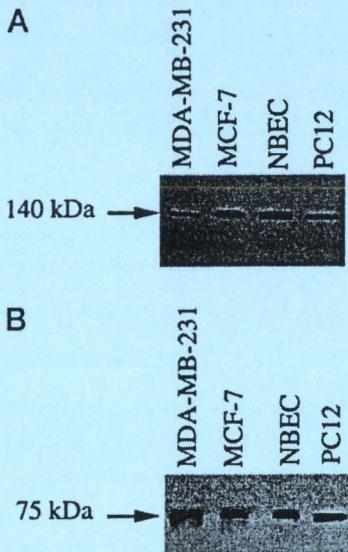


FIG. 2. Immunoblot detection of NGF receptors. TrkA (A) and p75 (B) were detected after SDS-PAGE of cell preparations from cancerous (MCF-7 and MDA-MB-231) and normal (NBEC) human breast epithelial cells.

activity as well as MAP kinase cascade are implicated in NGF-induced intracellular signaling. Indeed, anti-MAPK immunoprecipitation followed by anti-phosphotyrosine immunoblotting showed a band corresponding to the extracellularly regulated kinases Erk (44 kDa). MAPK tyrosine phosphorylation level was increased by NGF in the MDA-MB-231 and MCF-7 cancer cells after 10 min of stimulation, whereas no modification was observed in NBEC (Fig. 3B).

#### DISCUSSION

We have shown here for the first time that NGF can activate the proliferation of human breast cancer cells. Although NGF has been extensively studied for its neurotrophic properties, relatively few cellular types have been shown to have their growth stimulated by this factor. Human B lymphocytes can be induced to grow and differentiate by NGF (9), and in human epidermis, NGF is produced by keratinocytes to stimulate their cell proliferation with an autocrine loop (10) and melanocyte proliferation with a paracrine pathway (6). NGF also stimulates the proliferation and invasion of prostate cancer cells and uses TrkA/p75 to do so (11, 12). The reduced expression of p75 has been observed in benign and malignant prostate tissue, and a complete loss of p75 has been reported in metastatic cells (16, 17). NGF growth-promoting activity on breast cancer cells that we report here suggests that this factor could be more generally involved in the tumorigenic process. However, we have not been able to detect any effect of NGF on breast cell migration using microcinematography, transwell, or collagen invasion experiments (data not shown). Thus, the effect of NGF on breast cancer cells seems to be limited to the stimulation of proliferation.

Detection of p140<sup>trk</sup> and p75 receptors in breast cancer cells and the finding that NGF stimulation is inhibited by both K-252a and PD98059 confirm the molecular basis for NGF stimulation. K-252a is an inhibitor of the Trk-tyrosine kinase activity (18), whereas PD98059 selectively inhibits the MAP kinase cascade (19). Moreover, we have detected activation of the MAP kinase pathway after only 10 min of NGF stimulation. Our results then clearly indicate that NGF stimulation of breast cancer cells is mediated through Trk-tyrosine kinase activity and the MAP kinase pathway. Stimulation of such a pathway has often been described in NGF-responding neural

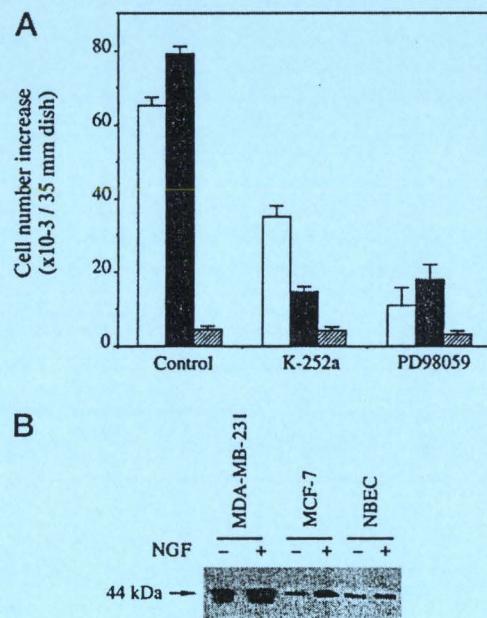


FIG. 3. Tyrosine kinase and MAP kinase activity. A, effect of K-252a and PD98059 on NGF activity on MCF-7 cells (black column), MDA-MB-231 cells (white column), and NBEC cells (hatched column). Cells were treated with 100 ng/ml NGF in the presence or absence of K-252a or PD98059 at concentrations of 10 nM and 10  $\mu$ M, respectively. After 48 h of treatment, cell number was determined. B, MAP kinase activation was studied after immunoprecipitation with monoclonal anti-ERK2 antibody. After SDS-PAGE and electroblotting, nitrocellulose membranes were treated with the PY20 anti-phosphotyrosine antibody.

cells (4, 5); the signaling pathway used by this factor in breast cancer cells is thus likely to be similar. Absence of NGF growth responsiveness in NBEC indicates the specificity of breast cancer cells in their sensitivity to NGF. To our knowledge, NGF is the first factor to be identified as specifically stimulating the growth of tumorous, as opposed to normal breast epithelial cells. This suggests that NGF could have a crucial function in the initiation and progression of human breast tumors. NBEC do express both p75 and p140<sup>trk</sup> receptors, and the MAP kinase cascade can be activated in these cells because they are proliferating in response to epidermal growth factor. The fact that in NBEC, NGF does not induce MAP kinase activation suggests that these cells might lack a functional signaling protein or that they might be inhibited in their response to this factor. Alternatively, NBEC might respond to NGF in different ways than just the stimulation of cell proliferation. It is now established for neuronal cells that NGF controls the process of apoptosis; however, the mechanism of this effect is still not fully understood at the receptor level, and different hypotheses involving p75 alone or in combination with Trk have been proposed (20). Because NBEC present both types of receptors, NGF stimulation of normal breast cells might participate in the control of cell survival. Under our experimental conditions, we were not able to observe any increase in NBEC, survival rates with NGF treatment. However, the culture medium used here is well formulated for NBEC survival, because we usually observe less than 10% of cell death; a precise study of cell survival in the presence of NGF would require further investigation.

Because the effect of NGF on breast epithelial cells has not hitherto been suspected, the expression of NGF in mammary gland has not been extensively studied. Evidence for the presence of NGF in breast tissue include NGF immunoreactivity (21) and biological activity (22) in murine milk. In the human, immunoreactivity for NGF has been found in breast capsule

*The Mitogenic Effect of NGF on Human Breast Cancer Cells*

implants (23). However, in these studies, the source of NGF has not been clarified, although in the mouse it does not seem to be affected by removal of the submaxillary glands, which are known to be a major source of NGF. Using our cell culture system, we have not detected any NGF immunoreactivity in either normal or breast cancer epithelial cells (data not shown), suggesting that this factor is not produced by these cells in significant quantities. It is known that NGF is produced by targets of sympathetic innervation and is found in circulating blood (24), but the precise origin of NGF in breast cannot yet be precisely defined. Our finding that NGF is a mitogenic factor for human breast cancer cells and not for normal breast epithelial cells strongly suggests that this factor is involved in the growth of human breast tumors. Little is known at present about NGF expression and function in mammary gland, and our present data indicate the need to further explore the role played by NGF in breast carcinogenesis. A better understanding of NGF function in breast cancer should open new perspectives for the detection, prognosis and treatment of this pathology.

**Acknowledgment**—We thank Dr. Victor Nurcombe (University of Queensland, Australia) for critical reading of the manuscript and helpful discussions.

## REFERENCES

1. Ethier, S. P. (1995) *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 964–973
2. Barbacid, M. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 148–155
3. Lewin, G. R., and Barde, Y. A. (1996) *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 289–317
4. Raffioni, S., and Bradshaw, R. A. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 823–850
5. Bothwell, M. (1995) *Annu. Rev. Neurosci.* **18**, 223–253
6. Yaar, M., Grossman, K., Eller, M., and Gilchrest, B. A. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 821–828
7. Anton, E. S., Weskamp, G., Reichardt, L. F., and Matthew W. D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2795–2799
8. Lillien, L. E., and Claude, P. (1985) *Nature* **317**, 632–634
9. Otten, U., Ehrhard, P., and Pekh, R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 10059–10063
10. Di Marco, E., Mathor, M., Bondanza, S., Cutuli, N., Marchisio, P. C., Cancedda, R., and De Luca, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22838–22846
11. Djakiew, D., Delsite, R., Pflug, B. R., Wrathall, J., Lynch, J. H., and Onoda, M. (1991) *Cancer Res.* **51**, 3304–3310
12. Djakiew, D., Pflug, B. R., Delsite, R., Onoda, M., Lynch, J. H., Arand, G., and Thompson, E. W. (1993) *Cancer Res.* **53**, 1416–1420
13. Dong-Lebouhris, X., Berthois, Y., Millot, G., Degeorges, A., Sylvi, M., Martin, P. M., and Calvo, F. (1997) *Int. J. Cancer* **71**, 42–48
14. Delehedde, M., Boilly, B., and Hondermarck, H. (1995) *Oncol. Res.* **7**, 399–405
15. Sasaki, K., Murakami, T., Takahashi, M. (1987) *Cytometry* **8**, 526–529
16. Pflug, B. R., Onoda, M., Lynch, J. H., and Djakiew, D. (1992) *Cancer Res.* **52**, 5403–5406
17. Pflug, B. R., Dionne, C., Kaplan, D. R., Lynch, J., and Djakiew, D. (1995) *Endocrinology* **136**, 262–268
18. Tapley, P., Lamballe, F., and Barbacid, M. (1992) *Oncogene* **7**, 371–381
19. Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J., and Saltiel, A. R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7686–7689
20. Bredesen, D. E., and Rabizadeh, S. (1997) *Trends Neurosci.* **20**, 287–290
21. Murphy, R. A., Saide, J. D., Blanchard, M. H., and Young, M. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 2330–2333
22. Grueters, A., Lakshmanan, R. T., Tarris, R., Alm, J., and Fisher, D. A. (1985) *Pediatr. Res.* **19**, 934–937
23. Lossing, C., and Hansson, H. A. (1993) *Plast. Reconstr. Surg.* **91**, 1277–1286
24. Bonini, S., Lambiase, A., Bonini, S., Angelucci, F., Magrini, L., Manni, L., and Aloe, L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10955–10960

**I.3. – Article 2 :**

**"LE NERVE GROWTH FACTOR FAIT SON ENTREE DANS LE CANCER DU SEIN"**

Cet article a été publié en 1998 dans la revue :

**"Médecine/Sciences" (vol.14, pp : 1125-1126).**



## **Le NGF fait son entrée dans le cancer du sein**



La croissance des cellules de cancer du sein est réglée par différents facteurs de croissance qui stimulent ou inhibent leur prolifération, leur différenciation et leur migration [1, 2]. Par exemple, l'EGF (*epidermal growth factor*), les IGF (*insulin-like growth factors*), les FGF (*fibroblast growth factors*) et le TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* ) stimulent la prolifération des cellules cancéreuses mammaires, alors que le MDGI (*mammary derived growth factor inhibitor*) et le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) ralentissent leur multiplication. En fait, à l'exception du MDGI, ces molécules n'ont pas été identifiées sur la base de leur capacité de contrôler la multiplication des cellules de cancer du sein ; cette propriété n'a été mise en évidence que secondairement. Néanmoins, l'identification de nouvelles molécules capables de moduler la croissance des cellules mammaires constitue un élément important pour la compréhension de la Cancérogenèse mammaire ainsi que pour la conception de stratégies innovantes contre cette maladie qui reste l'une des formes les plus fréquentes et redoutables de cancer.

### **Les neurotrophines ne seraient pas que neurotrophiques**

Jusqu'à présent, les membres de la famille des facteurs de croissance appelés neurotrophines, dont le NGF (*nerve growth factor*) est le membre prototype, n'avaient pas été impliqués dans la Cancérogenèse mammaire. Depuis sa mise en évidence par Rita Levi-Montalcini, le NGF a été largement étudié pour son activité stimulatrice de la survie et de la différenciation neuronale et la famille des neurotrophines est essentiellement connue pour ces propriétés neurotrophiques [3]. Il est maintenant bien établi que le NGF interagit avec ses cellules cibles par l'intermédiaire de deux catégories de sites de fixation membranaires : des récepteurs à activité tyrosine kinase correspondant au

proto-oncogène TrkA (p140trk) et des récepteurs accessoires, sans activité tyrosine kinase, connus sous le nom de p75, dont la fonction précise est encore controversée [4-6]. Outre ses propriétés neurotrophiques, on a décrit quelques rares autres activités biologiques du NGF. Ainsi, ce facteur est chimiotactique pour les mélanocytes et des anticorps dirigés contre le NGF ou p75 inhibent la migration des cellules de Schwann. Le NGF a aussi été décrit comme stimulateur de la prolifération de quelques types cellulaires comme les cellules chromaffines et les lymphocytes. Par ailleurs, des anticorps bloquants anti-NGF peuvent inhibiter la croissance des kératinocytes, suggérant que le NGF pourrait stimuler de façon autocrine et paracrine la croissance de ces cellules. La potentielle activité mitogène du NGF amène naturellement à se poser la question de son rôle éventuel dans les phénomènes de Cancérisation. Jusqu'à présent, l'implication du NGF dans le cancer n'a été clairement démontrée que dans le cas des cellules de la prostate pour lesquelles la production de NGF stimule la capacité d'invasion des cellules cancéreuses. En outre, l'expression de p75 diminue dans les cellules malignes et métastatiques comparées aux cellules normales, suggérant que l'analyse des récepteurs du NGF pourrait présenter un intérêt pour le pronostic du cancer de la prostate [7].

### **Le NGF, mitogène des cellules cancéreuses du sein**

Nous avons tout récemment montré que le NGF est un puissant mitogène pour les cellules de cancer du sein [8]. Cette activité, jusqu'alors non décrite, se manifeste pour l'ensemble des lignées cellulaires étudiées (MCF-7, MDA-MB-231, T47-D, BT-20), que leur croissance soit ou non hormonodépendante. Ainsi, le NGF peut être ajouté à la liste des facteurs de croissance capables de stimuler la croissance des cellules de cancer du sein.

La stimulation de la prolifération de ces cellules par le NGF nécessite l'activité tyrosine kinase des récepteurs p140trk et se traduit par l'activation de la voie des MAP-kinases. Nous avons également détecté la présence de p75 à la surface de l'ensemble des types cellulaires étudiés. Le schéma de réception/signalisation du NGF dans les cellules mammaires semble donc globalement correspondre à ce qui est généralement décrit dans le cas des cellules neuronales. Mais, ce qui est surprenant c'est que le NGF n'a pas d'activité mitogène pour les cellules épithéliales mammaires normales ; à notre connaissance, il s'agit du premier cas rapporté de facteur de croissance ayant une action mitogène uniquement sur les cellules cancéreuses et pas sur les cellules normales de sein. Cela suggère que le NGF pourrait avoir une fonction importante dans le début et la progression des tumeurs mammaires. Les cellules normales exprimant les deux types de récepteurs p140Trk et p75, on peut se poser la question de la raison de leur absence de réponse mitogène au NGF. Nous avons montré que le NGF ne déclenche pas l'activation de la voie des MAP-kinases dans les cellules normales comme le fait l'EGF ; ces cellules pourraient donc manquer d'un élément de transmission du signal entre p140Trk et les MAP-kinases, ou seraient soumises à un mécanisme particulier d'inhibition de cette transmission. Une étude plus précise de la structure de p140Trk ainsi que des premiers éléments du signal NGF dans les cellules mammaires sera nécessaire pour comprendre cette différence de sensibilité. On peut aussi envisager que la réponse des cellules normales à une stimulation par le NGF n'est pas une augmentation de leur prolifération. En effet, il est maintenant établi pour les cellules neuronales que le NGF peut intervenir dans le contrôle de la mort cellulaire, bien que le mécanisme de cet effet ne soit pas encore bien compris : au niveau des récepteurs, différentes hypothèses

sont actuellement proposées qui impliquent p75 seul ou en combinaison avec Trk [4]. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence d'effet du NGF sur la survie des cellules épithéliales mammaires normales. La migration de certains types cellulaires peut également être affectée par le NGF mais, là encore, aucune modification des capacités de migration des cellules mammaires n'a été mise en évidence après stimulation par le NGF.

L'effet du NGF sur les cellules épithéliales mammaires n'ayant pas été suspecté jusqu'à présent, l'expression de ce facteur et de ces récepteurs dans la glande mammaire n'a fait l'objet que de peu d'études. Les indications montrant la présence de NGF dans cet organe reposent essentiellement sur l'immunodétection de ce facteur dans le lait de souris [9] et, dans l'espèce humaine, une immunoréactivité anti-NGF rapportée au niveau d'implants mammaires [10]. Néanmoins, aucune de ces études n'a permis de préciser l'origine du NGF présent dans la glande mammaire (circulation générale ou production locale). Par ailleurs, il n'est pas exclu que le NGF présent dans la glande mammaire puisse également participer au développement et au maintien de l'innervation de cet organe.

En définitive, la découverte de l'action mitogène du NGF sur les cellules de cancer du sein pose un certain nombre de questions quant aux fonctions de cette molécule, et des neurotrophines d'une manière générale, dans la physiopathologie de la glande mammaire. Les travaux à venir, en permettant de mieux définir le rôle joué par le NGF dans la cancérogenèse du sein, devraient ouvrir de nouvelles perspectives pour la compréhension et éventuellement le traitement et le pronostic de cette maladie.

H.H.  
X.L.B.  
B.B.  
S.D.

1. Ethier SP. Growth factor synthesis and human breast cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 964-73.
2. Rouayenc JF. Les inhibiteurs de croissance des cellules mammaires. *Med Sci* 1997; 13: 89-92.
3. Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996; 19: 289-317.
4. Bradshaw RA, Hondermark H. Nerve growth factor receptors. *Biomembranes* 1996; 6: 177-96.

5. Lamballe F. Les récepteurs tyrosine kinases Trk : récepteurs de forte affinité des neurotrophines. *Med Sci* 1995; 11: 1071-80.
6. Muller Y, Clos J. p75 : récepteur des neurotrophines. *Med Sci* 1997; 13: 978-86.
7. Pflug BR, Dionne G, Kaplan DR, Lynch J, Djakiew D. Expression of a Trk high affinity nerve growth factor receptor in the human prostate. *Endocrinology* 1995; 136: 262-8.
8. Descamps S, Lebourhis X, Delchedde M, Boilly B, Hondermark H. Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 16659-62.
9. Grueters A, Lakshmanan J, Larris R, Alm J, Fisher DA. Nerve growth factor in mouse milk during early lactation: lack of dependency on submaxillary salivary glands. *Pediatr Res* 1985; 19: 931-7.
10. Lossing C, Hansson HA. Peptide growth factors and myofibroblasts in capsules around human breast implants. *Plast Reconstr Surg* 1993; 91: 1277-86.

**Autrans  
FRANCE  
January  
27-30  
1999**

Organising Committee  
COMITÉ D'ORGANISATION  
RATI FOTEDAR GRENoble, FRANCE  
JACQUES BAUDIER GRENoble, FRANCE  
ARUN FOTEDAR SAN DIEGO, USA  
JEAN-CLAUDE AMEISEN PARIS, FRANCE  
EVELYNE MAY FONTENAY-AUX-ROSES, FRANCE

Information  
RENSEIGNEMENTS  
IBS  
41, RUE DES MARTYRS  
38027 GRENOBLE CEDEX 1 - FRANCE  
E-mail : fotedar@ibis.fr  
http://ibis.ibis.fr

TEL +33 4 76 88 96 15  
+33 4 76 88 96 47  
FAX +33 4 76 88 54 94

de la Direction des Sciences du Vivant  
**dbms**  
Institut de Biologie Structurale et Structurole  
INSTITUT FEDERATIF DE RECHERCHE  
C.N.R.S. • I.U.T. • U.P.S.  
I.S.T. • I.M.P. • I.U.T.  
**ibis**  
Institut de Biologie Structurale  
C.N.R.S. • C.N.R.S.

## Sixth DBMS/IBS Workshop Sixième Rencontre DBMS/IBS de Grenoble

International workshop series

### Programmed cell death La mort cellulaire programmée

- Signalling via death receptors  
Signalisation par les récepteurs de mort
- Regulation of Caspase activity  
Régulation de l'activité Caspase
- Bcl2 gene family  
La famille du gène Bcl2
- Regulation by p53  
Régulation par la protéine p53
- Checkpoints and Cancer  
Points de contrôle et cancer

#### Invited speakers • Conférenciers invités

Jean-Claude Amiesen PARIS-FRANCE • Craig B. Thompson CHICAGO-USA  
Daniel Caput LAMO-FRANCE • Arun Fotadar SAN DIEGO-USA  
Xiaodong Wang DALLAS-USA • Andrew H. Wyllie EDINBURGH-SCOTLAND  
Rati Fotadar GRENoble-FRANCE • Doug Green LA JOLLA-USA  
Guido Kroemer VILLEURBANNE-FRANCE • Pierre Golstein MARSEILLE-FRANCE  
Michael Karin LA JOLLA-USA • Anthony Wynshaw-Boris BETHESDA-USA  
Evelyne May FONTENAY-AUX-ROSES-FRANCE • John C. Reed LA JOLLA-USA  
Jacques Baudier GRENoble-FRANCE • Shigekazu Nagata OSAKA-JAPAN  
Moshe Oren RIMOVOR-ISRAN

Deadline for registration November, 1st 1998 • Date limite d'enregistrement le 1er novembre 1998

#### I.4. - Conclusion

Les différents résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence pour la première fois un effet mitogène puissant du NGF sur les cellules de cancer du sein. Le NGF se distingue d'autres facteurs de croissance mitogènes par deux particularités :

- contrairement au FGF-2 par exemple, son effet concerne toutes les lignées cancéreuses étudiées, qu'elles soient hormono-sensibles ou hormono-insensibles,
- l'effet mitogène du NGF est spécifique des cellules cancéreuses, puisqu'il ne modifie pas la croissance des cellules mammaires normales,

D'autre part, nos résultats indiquent que l'effet mitogène du NGF implique une activation de la voie des MAP-kinases médiée par le récepteur tyrosine kinase TrkA qui est présent dans les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses, au même titre que p75.

## **II - Le nerve growth factor stimule la prolifération et la survie des cellules de cancer du sein par deux voies de signalisation distinctes**

### **II.1. – Introduction**

Le développement des tumeurs n'est pas seulement soumis à l'action de facteurs qui stimulent la prolifération cellulaire, mais aussi à des facteurs favorisant la migration, l'invasion ou inhibant la mort cellulaire. Le NGF intervient dans les mécanismes apoptotiques de quelques types cellulaires, essentiellement dans les systèmes nerveux et immunitaire.

Nous avons étudié son effet sur l'apoptose induite par un analogue des céramides (le C2) dans les cellules de cancer du sein, et en particulier la lignée hormono-sensible MCF-7. Nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation permettant l'effet du NGF sur la survie. Des inhibiteurs spécifiques et des anticorps, ainsi que la mesure de l'activité du récepteur tyrosine kinase TrkA et l'utilisation d'autres neurotrophines nous ont permis d'étudier les rôles respectifs des deux récepteurs du NGF sur son activité anti-apoptotique. La réalisation de transfections transitoires nous a ensuite permis d'analyser la voie de transduction impliquée dans cet effet du NGF. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article suivant.

**II.2. - Article 3 :**

**"NERVE GROWTH FACTOR STIMULATES PROLIFERATION AND SURVIVAL  
OF BREAST CANCER CELLS THROUGH TWO DISTINCT SIGNALING PATHWAYS"**

Cet article a été soumis dans la revue :

**"The Journal of Biological Chemistry".**

**Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast  
cancer cells through two distinct signaling pathways**

Simon Descamps‡, Robert-Alain Toillon‡, Eric Adriaenssens§, Valérie Pawlowski¶,  
Xuefen Le Bourhis‡, Bénoni Boilly‡, Jean-Philippe Peyrat¶ and Hubert Hondermarck‡\*.

‡ Equipe Facteurs de Croissance, UPRES EA-1033 Biologie du Développement, Université des Sciences et Technologies de Lille, France.

§ Immunopathologie Cellulaire des Maladies Infectieuses, CNRS, UMR 8527, Institut de Biologie de Lille, France.

¶ Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, Centre Oscar Lambret, lille, France.

\*To whom correspondence should be addressed. EA-1033, batiment SN3, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex. Tel : 03 20 43 40 97. Fax : 03 20 43 40 38. Email : hubert.hondermarck@univ-lille1.fr.

Running title : Intracellular signaling pathways of NGF in breast cancer cells.

**ABSTRACT**

We show here that nerve growth factor (NGF), the archetypal neurotrophic factor which has recently been described as a mitogen for breast cancer cells, also stimulates their survival through a distinct signaling pathway. The human breast cancer cell line MCF-7 was found to express mRNA for both types of NGF receptors : p140<sup>trkA</sup> and p75. The mitogenic effect of NGF for MCF-7 cells required the tyrosine kinase activity of p140<sup>trkA</sup> as well as the mitogen-activated protein kinase (MAP)-kinase cascade, but was independent of p75. In contrast, the anti-apoptotic effect of NGF (studied using cells treated with the ceramide analog C2) required p75 as well as the activation of the transcription factor NF-κB, but neither p140<sup>trkA</sup> nor MAP-kinase were necessary. Interestingly, other neurotrophins (BDNF, NT-3 and NT-4/5) also induced a promotion of cell survival similar to NGF, whereas they did not stimulate proliferation. The use of pharmacological NF-κB inhibitor SN50 and cell transfection with IκBm (inhibitor of NF-κB) resulted in an inhibition of the NGF anti-apoptotic effect. In addition, cell transfection with other NF-κB family members (c-rel and rel-A) also inhibited C2-induced apoptosis. These data show that two distinct signaling pathways are required for mediation of NGF function in breast cancer cells and point out the crucial role played by the neurotrophin receptor p75 and NF-κB in the activation of the survival pathway in these cells.

Abbreviations : NGF, nerve growth factor ; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis ; NF-κB, nuclear factor-kappaB. BDNF, brain derived neurotrophic factor; NT, neurotrophin; PARP, polyADP-ribose polymerase.

## INTRODUCTION

Nerve growth factor (NGF) is the archetypal member of the neurotrophin family, which also includes brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), NT-4/5 and NT-6 (1). NGF interacts with two classes of membrane receptors : the TrkA proto-oncogene product p140<sup>trkA</sup>, which possesses intrinsic tyrosine kinase activity and a secondary receptor, p75, that belongs to the tumor necrosis factor (TNF)-receptor family (2). The stimulation of cell survival and cell differentiation by NGF and other neurotrophins have primarily been described in neuronal cell systems (3). The NGF neurotrophic effect is mediated by the tyrosine kinase activity of p140<sup>trkA</sup>, which subsequently activates the MAP-kinase cascade. In contrast, the role of p75 is still controversial, since this receptor has been described as being able to both positively and negatively regulate neuronal cell death and differentiation, depending on the cell type considered (4). In some cases, p75 is described as an inducer of apoptosis, even without NGF stimulation (5), whereas in other cases the activation of p75 by NGF results in a protection from cell death (6). In addition to neurotrophic function, other activities of NGF have been described. For example, NGF is chemotactic for melanocytes (7) and inhibition of p75 strongly inhibits the migration of schwann cells (8). NGF has also been reported to stimulate the proliferation of a few cell types such as chromaffin cells (9), lymphocytes (10) and keratinocytes (11). We have previously shown that NGF is mitogenic for cancerous but not normal human breast cells (12) and these data, as well as others showing the role of NGF in the stimulation of prostatic cancer cells (13, 14, 15), implicated NGF in carcinogenesis.

The development of a tumor is related to cellular proliferation as well as the survival of cancer cells and these are both crucial events for malignant progression. The effect of NGF on the survival of cancer cells has been shown in neuroblastoma (16) and schwannoma (6) over which this factor exerts a protective effect through the p75 receptor. In prostate cancer, p75 has been shown to be a mediator of NGF dependence during the critical phase of developmental cell death and during the progression of carcinogenesis (17). To date, the mitogenic effect of NGF for breast cancer cells has been described (12), but a potential role for this growth factor in the control of breast cancer cell survival has not been reported.

In the present study, we have investigated the possibility of modulation of apoptosis by NGF in human breast cancer cells. We show that in addition to its mitogenic effect, NGF is

also an anti-apoptotic factor for these cells. Using the MCF-7 cell line, we have shown the expression of mRNA for p140<sup>trkA</sup> and p75 receptors and we have studied the signaling pathways involved in both proliferation and survival. Our results indicate that the mitogenic effect of NGF required p140<sup>trkA</sup> and the MAP-kinase cascade, but not the p75 receptor, whereas the promotion of cell survival strictly required p75 as well as NF-κB but not p140<sup>trkA</sup> and MAP-kinase. Thus, the mitogenic and anti-apoptotic effects of NGF for breast cancer cells are mediated through two different signaling pathways.

## MATERIAL AND METHODS

*Materials* – Cell culture reagents were purchased from BioWhittaker (France) except insulin which was obtained from Organon (France). Recombinant human nerve growth factor, brain derived growth factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3) and 4 (NT-4) were from R & D Systems (UK). K-252a (inhibitor of trk-tyrosine kinase activity) and PD98059 (inhibitor of MAP-kinase cascade) were from Calbiochem (France). The mouse monoclonal anti-NGF receptor (p75) antibody was from Euromedex (France). C2 ceramide analog (N-acetyl-D-sphingosine), Hoechst 33258 and electrophoresis reagents were from Sigma (France). The SN50 NF- $\kappa$ B inhibitor peptide, the rabbit polyclonal anti-NF- $\kappa$ B p65 antibody was obtained from TEBU (France). Anti-PARP antibody was from Oncogene Research Products (UK). Primers and probes for TrkA and p75, probe for TATA Box binding protein (TBP) were from Eurogentec (Belgium) and primers for TBP were from Genset (France). RT-PCR reagents were from Applied Biosystems (France). Lipofectin reagent and Opti-MEM were provided by GibcoBRL (France). The green fluorescent protein plasmid (EGFPC1) was purchased from Clontech (USA), the dominant-negative I $\kappa$ B $\alpha$  mutants (I $\kappa$ Bm) expression vectors (in PCDNA3) containing a Ser to Ala substitution at residues 32 and 36 were obtained from Dr Jean Feuillard (UPRES EA 1625, Bobigny, France). p65 (rel-A) and c-rel cDNA were cloned at ecoRI site in PSVK3 expression plasmid. All vectors were obtained from Dr Pascale Crépieux (Mc Gill University, Montreal, ). The SY5Y subclone of SK-N-SH neuroblastoma cell line was a kind gift of Dr Luc Buée (INSERM, U422, Lille, France)

*Cell Culture* – The MCF-7 cancer cell line was obtained from the American Type Culture Collection and routinely grown as monolayer cultures. Cells were maintained in minimal essential medium (Earle's salts) supplemented with 20 mM Hepes, 2 g/liter sodium

bicarbonate, 2 mM L-glutamine, 10% fetal calf serum (FCS), 100 units/ml of penicillin-streptomycin, 50 µg/ml gentamycin, 1% of non-essential amino acids, and 5 µg/ml of insulin.

*Quantitative RT-PCR measurement of TrkA and p75 mRNA expression* – The PCR primers and the TaqMan fluorogenic probe were designed using the Primer Express software program (Perkin Elmer, Demo version 1.0). The primers designed for TrkA were 5'-CATCGTGAAGAGTGGTCTCCG-3' and 5'-GAGAGAGACTCCAGAGCGTTGAA-3' . An amplicon of 102 bp was obtained and detected with the 5'-AGGAGTGAAATGGAAGGCATCTGGCG-3' probe. The primers designed for p75 were 5'-CCTACGGCTACTACCAGGATGAG-3' and 5'-TGGCCTCGTCGGAATACG-3'. An amplicon of 147 bp was obtained for p75 and detected with the 5'-CTCGGGCCTCGTGTTCCTGC-3' probe. The TaqMan probes carried a 5' FAM (6-carboxy-fluorescein) reporter dye and a 3' TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) quencher dye. In addition, the probes contained a 3' phosphate group to prevent extension during PCR. Quantitative RT-PCR experiments were completed as described by Pawlowski et al. (18). Briefly, reverse transcription was performed at 48°C for 30 min. The AmpliTaq Gold DNA polymerase was then activated by heating for 10 min at 95°C. According to the supplier's recommendations, a two-temperature PCR protocol including a denaturation step and a step combining annealing and extension, was performed as follows : 15 sec at 95°C and 90 sec at 60°C for 40 cycles. We used the expression of the mRNA encoding the TATA box-binding protein (TBP, a component of the DNA-binding protein complex TFIID) to normalize the level of expression of TrkA and p75 mRNA. Thus, the TrkA and p75 normalized expression corresponded to the ratio between TrkA or p75 (copy / µg of total RNA) and TBP (copy / µg of total RNA).

*Cell growth assay* - Experiments were performed as previously described (12). 35 mm diameter dishes were inoculated with  $2 \times 10^4$  cells / dish in 2 ml of medium containing 10% FCS. After 24 h, cells were washed twice with serum-free medium. Next day, the medium was replaced with 2 ml of medium containing different concentrations of NGF. To study the effect of pharmacological inhibitors or blocking antibodies, various concentrations were added simultaneously with NGF (100 ng/ml). After 2 days of NGF exposure, cells were harvested by trypsinisation and counted using an hemocytometer.

*Determination of the percentage of apoptotic cell nuclei* - Apoptosis of MCF-7 cells was induced by the ceramide analog C2, which has been described as a pro-apoptotic agent for human breast cancer cells (19, 20). Apoptosis of MCF-7 cells was obtained by treatment with 2  $\mu$ M C2 for 24 h. To evaluate the anti-apoptotic activity of NGF, various concentrations of this factor were tested and we found that the maximal effect was obtained for 100 ng/ml. Consequently, this concentration was used in all experiments with pharmacological inhibitors or blocking antibody. For determination of apoptotic cell percentage, cells were fixed with cold methanol (-20°C) for 10 min and washed twice with phosphate buffer saline (PBS) before staining with 1  $\mu$ g/ml Hoechst 33258 for 10 min at room temperature in the dark. Cells were then washed with PBS and mounted with coverslips using glycergel (Dako). The apoptotic cells exhibiting condensed and fragmented nuclei were counted under an Olympus-BH2 fluorescent microscope in randomly selected fields. A minimum of 500-1000 cells were examined for each condition, and results were expressed as the number of apoptotic cells over the total number of cells counted.

*NGFRs and PARP immunoblotting* – Subconfluent cell cultures were harvested by scraping in serum-free medium. After centrifugation (1000 x g, 5 min), the pellet was treated with lysis

buffer (0.3% SDS, 200 mM dithiothreitol) and boiled 5 min. In case of PARP, the pellet was lysed with urea rich buffer (62.5 mMTris/HCl, pH 6.8, 6 M urea, 10% glycerol, 2% SDS), sonicated and incubated at 65°C for 15 min. The lysates were subjected to SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane (Immobilon-P, Millipore) by electroblotting (100 V, 75 min), and probed with anti-TrkA, anti-p75 or anti-PARP antibodies at 4°C overnight. The membranes were then incubated at room temperature for 3 h with biotin-conjugated anti-rabbit (TrkA) or anti-mouse (p75 and PARP) immunoglobulin G. After 1 h of incubation with extravidin, the reaction was revealed using the chemiluminescence kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech) with Kodak X-Omat AR film.

*Detection of p140<sup>trkA</sup> and MAP-kinase activation* – Proteins were extracted in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 100 µM sodium orthovanadate) prior to immunoprecipitation. Preclearing was done with protein A-agarose (10 µl/250 µl, 60 min, 4°C). After centrifugation (10,000 x g, 2 min), the supernatant was incubated with monoclonal anti-MAPK (anti-Erk2) antibody (10 µl/250 µl, 60 min, 4°C). Protein A-agarose (10 µl) was added for 60 min (4°C) and then pelleted by centrifugation (10,000 x g, 2 min). The pellet was then rinsed three times with lysis buffer and boiled for 5 min in Laemmli buffer. After SDS-PAGE and electroblotting, nitrocellulose membranes were blocked with 3% bovine serum albumin. Membranes were then incubated with PY20 anti-phosphotyrosine antibody overnight at 4°C, rinsed, and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG for 3 h at room temperature. Membranes were rinsed overnight at 4°C before visualization with ECL.

*Cell fractionation and NF-κB detection* – Cell nuclear extracts were prepared as described by Herrmann et al. (21). Cells were trypsinized and then pelleted in minimal essential medium

containing 10% FCS. After washing with ice-cold PBS, cells were repelleted and resuspended in 400 µl of ice-cold hypotonic buffer (10 mM Hepes, pH 7.8, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10 µg/ml aprotinin, 0.5 µg/ml leupeptin, 3 mM PMSF, and 3 mM DTT). After 10 min on ice, 25 µl of 10% NP-40 was added and crude nuclei were collected by centrifugation for 5 min. The nuclear pellet was resuspended in high salt buffer (50 mM Hepes, pH 7.4, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 3 mM DTT, and 3 mM PMSF). After 30 min on ice with frequent agitation, the insoluble nuclear material was pelleted in a microfuge for 10 min. Crude nuclear protein was collected from the supernatant and snap-frozen in a dry ice/ethanol bath. After thawing and boiling for 5 min in Laemmli buffer, the nuclear extracts were subjected to SDS-PAGE and probed with an anti-NF-κB p65 antibody.

*Transfection of IκB, c-rel and rel-A* – Cotransfection experiments were carried out using lipofectin reagent, as described by the manufacturer. Briefly, cells were incubated for 5 h in 1 ml of OptiMEM transfection medium containing 8 µl lipofectin reagent, 0.8 µg of green fluorescent protein (GFP) carrying vector and 0.2 µg of empty vector PCDNA3 or 0.2 µg of IκBm. In case of c-rel or rel-A, cells were cotransfected with 0.8 µg of GFP and 0.6 µg of PSVK<sub>3</sub> (empty plasmid), c-rel or rel-A. Cells were then grown for 24 h with 10% FCS MEM and rinsed for 2 h in serum-free medium before incubation in serum-free medium in presence or absence of 100 ng/ml NGF and/or 2 µM C2 for another 24 h. Cells were then fixed with paraformaldehyde 4% (4°C) for 30 min and the percentage of apoptotic cell nuclei in green fluorescent protein stained cells only was determined as described above.

## RESULTS

*NGF mitogenic and anti-apoptotic activity for MCF-7 cells* - The effects of 100 ng/ml NGF and other neurotrophins on MCF-7 cell proliferation and C2-induced apoptosis have been evaluated by cell counting and Hoechst staining respectively. The results presented in figure 1 show that NGF is mitogenic, but no proliferative effect was observed for the other neurotrophins tested (for concentrations up to 400 ng/ml). In contrast, NGF as well as other neurotrophins exhibited a rescuing effect on C2-induced apoptosis of MCF-7 cells. Different concentrations were tested and the maximum effect of NGF was observed at 200 ng/ml. Figure 2A shows the morphology of apoptotic cell nuclei observed during treatment with C2 and the anti-apoptotic activity of NGF. The induction of apoptosis by C2 was found to involve cleavage of poly ADP-ribose polymerase (PARP) which was reversed by NGF (Fig. 2B). The effect of NGF on PARP cleavage was inhibited by the anti-p75 or SN50 (inhibitor of NF- $\kappa$ B) but neither by the Trk inhibitor K-252a nor by the MEK inhibitor PD98059.

*TrkA and p75 expression* – RT-PCR experiments have shown the expression of mRNA for both NGF receptors in MCF-7 cells. A 102 bp band for the TrkA transcript and a 147 bp band for the p75 transcript were detected on 1% agarose gels (Fig. 3A). Moreover, western blotting experiments (Fig. 3B) showed that both p140<sup>trkA</sup> and p75 were present in MCF-7 breast cancer cells. Real-time quantitative RT-PCR indicated that there was no significant change in the levels of TrkA and p75 mRNAs in presence of FCS, NGF or C2 (Fig. 3C). It should be noted that the level of mRNA for TrkA and p75 found in MCF-7 cells was between 5 and 10 times lower than the level observed in SY5Y neuroblastoma cells, showing that NGF receptor expression in breast cancer cells is quantitatively limited.

*Involvement of p140<sup>trkA</sup> and p75 in mitogenic and survival activities of NGF* – In order to study the possible functions of p140<sup>trkA</sup> and p75 in the stimulation of proliferation and cell survival induced by NGF, we used specific antibodies and pharmacological inhibitors. The Trk tyrosine kinase inhibitor, K-252a as well as the MEK inhibitor, PD98059, strongly inhibited the growth-stimulatory effect of NGF on MCF-7 cells but had no effect on the anti-apoptotic effect of this growth factor (Fig. 4). Conversely, neither the anti-p75 blocking antibody nor the NF-κB inhibitor SN50 affected NGF-stimulated proliferation, but both strongly reduced the anti-apoptotic effect of NGF (Fig. 4). The tyrosine kinase activity of p140<sup>trkA</sup> was inhibited by K-252a but not by the anti-p75 or PD98059 (Fig. 5). On the other hand the activity of the MAP-kinases was inhibited by K-252a and PD98059 but not by the anti-p75 (Fig. 5). It should be noted that the SN50 peptidic inhibitor of NF-κB, similarly to the anti-p75, inhibited the anti-apoptotic effect of NGF but neither its proliferative effect nor its activation of p140<sup>trkA</sup> and MAP-kinases.

*NF-κB involvement in the antiapoptotic effect of NGF* – The inhibitory effect of SN50 on the NGF anti-apoptotic activity indicated the potential involvement of NF-κB in the signaling leading to the protective activity of this growth factor. To further investigate this issue, we studied the effect of NGF on the nuclear translocation of NF-κB, as well as the consequence of transfection by IκBm (inhibitor of NF-κB) or by c-rel and rel-A (constitutively active subunits of NF-κB) on the NGF-mediated anti-apoptotic activity. Western blotting experiments showed no change in the nuclear quantity of NF-κB (p65) in case of apoptosis induced by C2 (Fig. 6). In contrast, the addition of NGF on C2-treated cells induced a translocation of NF-κB from cytoplasm to nucleus. Moreover, this NF-κB nuclear translocation was inhibited by the presence of p75 blocking antibody or SN50, but was not

affected by K-252a and PD98059. Transfection of MCF-7 cells with I $\kappa$ Bm, an inhibitor of NF- $\kappa$ B, reversed the anti-apoptotic effect of NGF (Fig. 7A). As a control, we transfected MCF-7 cells with an empty vector and no effect was observed. In addition, transfection with activators of the NF- $\kappa$ B pathway, c-rel or rel-A (Fig. 7B), resulted in an inhibition of C2-induced apoptosis of MCF-7 cells, even in absence of NGF, emphasizing the involvement of NF- $\kappa$ B family members in human breast cancer cell survival.

## DISCUSSION

We have demonstrated here that NGF can be mitogenic and anti-apoptotic for MCF-7 breast cancer cells, and that these two biological effects are mediated by the p140<sup>trkA</sup> and p75 receptors, respectively. The growth of breast cancer results from a balance between cell proliferation and apoptosis, both of which can be modulated by various regulatory factors. For example, epidermal growth factor or insulin-like growth factor-1 stimulate the proliferation and survival of breast cancer cells (22). On the other hand, molecules such as transforming growth factor-β or tumor necrosis factor-α can, respectively, inhibit growth and induce apoptosis in these cells (23). Recently we have shown that NGF, which was primarily described for its neurotrophic properties, is a strong mitogen for cancerous but not for normal human breast epithelial cells, suggesting a crucial function for this factor in the initiation and progression of human breast tumors (12). In the present study, using quantitative RT-PCR, we have shown that the breast cancer cell line MCF-7 expresses transcripts for both TrkA and p75 NGF receptors. The expression of NGF receptors in breast cancer cells appears to be lower than in neurons, since we found 5 and 10 times more mRNA for TrkA and p75, respectively, in the neuroblastoma SY5Y cell line than in MCF-7 cells. Low levels of NGF receptor expression have recently been reported in other breast cancer cell lines, leading to the hypothesis of recruitment and cooperation between p140<sup>trkA</sup> and p185<sup>Her-2</sup> for the induction of mitogenesis by NGF (24). Our results indicate a stimulation of p140<sup>trkA</sup> tyrosine kinase activity and of the MAP-kinase cascade by NGF and the use of the pharmacological inhibitors K-252a and PD98059 indicated the requirement for these signals in NGF-induced MCF-7 cell proliferation. The induction of MAP-kinase activity required p140<sup>trkA</sup> activation, but p75 did not appear to be involved, since p75 blocking antibodies did not have any effect on NGF-induced MAP-kinase activation and cell proliferation. In contrast, p75 blocking antibodies

exhibited an inhibition of NGF induced survival, attesting to the functionality of these blocking antibodies. Thus, the mitogenic activity of NGF requires the p140<sup>trkA</sup> and MAP-kinase cascade independently of the p75 receptor. This signaling pathway for the NGF proliferative effect appears to be similar to that which is described for the neurotrophic activity of this factor. For example, in pheochromocytoma PC-12 cells, disruption of p75 does not result in an inhibition of the NGF differentiative activity which is mediated by the p140<sup>trkA</sup> / MAP-kinase pathway (25). Interestingly, it has also been shown in PC-12 cells that NGF induces survival and differentiation through two distinct signaling pathways, since the activation of the MAP-kinase cascade is required for the differentiative but not the protective activity of NGF (26). These data emphasize the idea that there is a high level of similarity between the mitogenic and neurotrophic signaling pathways of NGF.

The function of NGF as a survival factor has been extensively described for neurons in both *in vitro* and *in vivo* experiments (27). However the intracellular signaling involved in the anti-apoptotic activity of NGF for neurons remains controversial. The p140<sup>trkA</sup> / MAP-kinase cascade is generally described as protective from neuronal cell death, although a recent paper reported a novel apoptotic pathway mediated by p140<sup>trkA</sup> / MAP-kinase in medulloblastoma cells (28). Unlike the case of p140<sup>trkA</sup> receptors, defining the precise physiological role of p75 has proven difficult (4). The p75 receptor belongs to the TNF-receptor family, including among others, the type I and II of TNF receptor, the Fas antigen and CD40 (29). The cellular responses to activation of this family of receptors so far characterized are the activation of gene transcription via nuclear factor-κB (NF-κB) and the regulation of cell survival/apoptosis. In some cases, apoptosis was shown to develop following NGF binding to p75, whereas in other cases it occurred in the absence of ligands (spontaneous apoptosis) and was reversed by NGF (30). In our experiments, we used the C2 agent, which is known to induce apoptosis of

breast cancer cells such as MCF-7 (19, 20). We have found that NGF rescues MCF-7 cells from C2-induced cell death as proven by morphological analysis after Hoechst staining and the inhibition of PARP cleavage. Interestingly, K-252a and PD98059 did not affect the anti-apoptotic activity of NGF, indicating that p140<sup>trkA</sup> tyrosine kinase and MAP-kinase activities are not necessary to achieve the protective effect of NGF from cell death. It has already been reported that NGF is able to elicit its biological effects through p75 receptor and independently of p140<sup>trkA</sup> in neurons (31, 32) and Schwann cells (33). In our experiments, the specific role of p75 in cell survival was first suggested by the fact that other neurotrophins (interacting with p75 and not with p140<sup>trkA</sup>) are also able to protect MCF-7 cells from cell death whilst they have no impact on cell proliferation. The crucial role of p75 is further demonstrated by the use of p75 blocking antibodies, which completely reversed the protective effect of NGF from C2-induced apoptosis. Activation of p75 has been reported to specifically induce NF-κB, independently of p140<sup>trkA</sup> in several cell types such as Schwann cells (33). To explore the possibility of NF-κB implication in NGF survival effect on breast cancer cells, we have first tested SN50, which is reported to inhibit the nuclear translocation of this transcription factor (34). We found that SN50 blocks the anti-apoptotic effect of NGF without affecting the p140<sup>trkA</sup> / MAP-kinase cascade and consequently does not affect cellular proliferation either. Further implication of NF-κB is demonstrated by transfection with a mutated form of IκBα, which blocks NF-κB translocation to the nucleus. MCF-7 cells transfected by mutated IκBα were not rescued from C2-induced apoptosis by NGF, showing the involvement of NF-κB in the anti-apoptotic activity mediated by p75. In addition, transfections by c-rel or rel-A, which are constitutively activated forms of NF-κB, had a protective effect on MCF-7 cells treated by C2 in absence of NGF stimulation. C-rel and rel-A belong to the NF-κB family of transcription factor and the protection from apoptosis

observed after transfection with this factor demonstrates the role of NF- $\kappa$ B molecules in the control of breast cancer cell survival.

In conclusion, our results show that NGF is an anti-apoptotic factor for human breast cancer cells and that the signaling pathway leading to this survival activity is distinct from the signaling pathway which leads to mitogenic stimulation. Whereas p140<sup>trkA</sup> and the MAP-kinases mediate the mitogenic activity of NGF, its anti-apoptotic activity required p75 and NF- $\kappa$ B without the implication of p140<sup>trkA</sup> and the MAP-kinases. NGF is present in the mammary gland (35, 36) as well as its transcripts (results not shown) and therefore our present finding point out that NGF is a crucial regulator of mammary tumor growth based on its ability to stimulate both proliferation and survival of cancerous breast epithelial cells. Consequently, the possibility of inhibiting breast cancer progression by targeting p140<sup>trkA</sup> and p75 should be considered as a potential perspective for the treatment of this pathology.

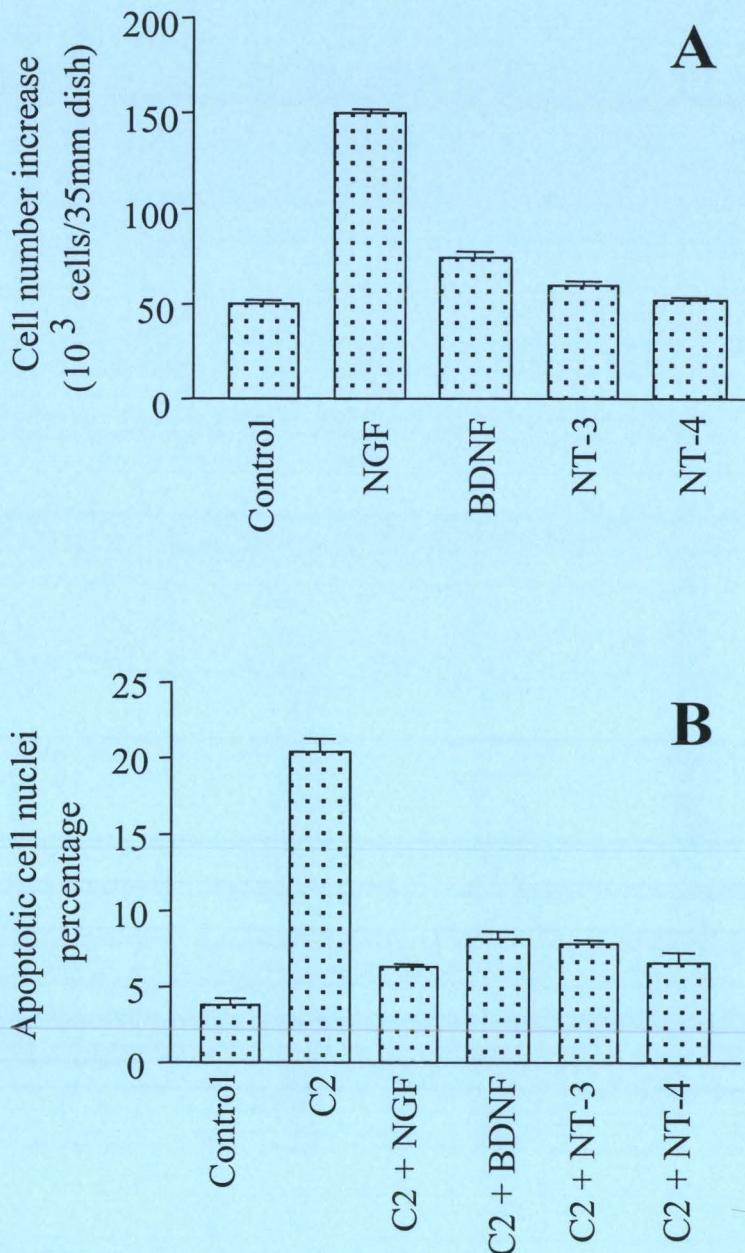
**Acknowledgements.** This work was supported by a grant from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Nord) and by the French Ministry of Research and Education. S.D., E.A. and V.P. were recipient of an ARC (Association pour la Recherche sur la Cancer) fellowship. We thank Rachel Connor (Imperial College, London) and David G. Fernig (University of Liverpool) for critical reading of this manuscript.

## References

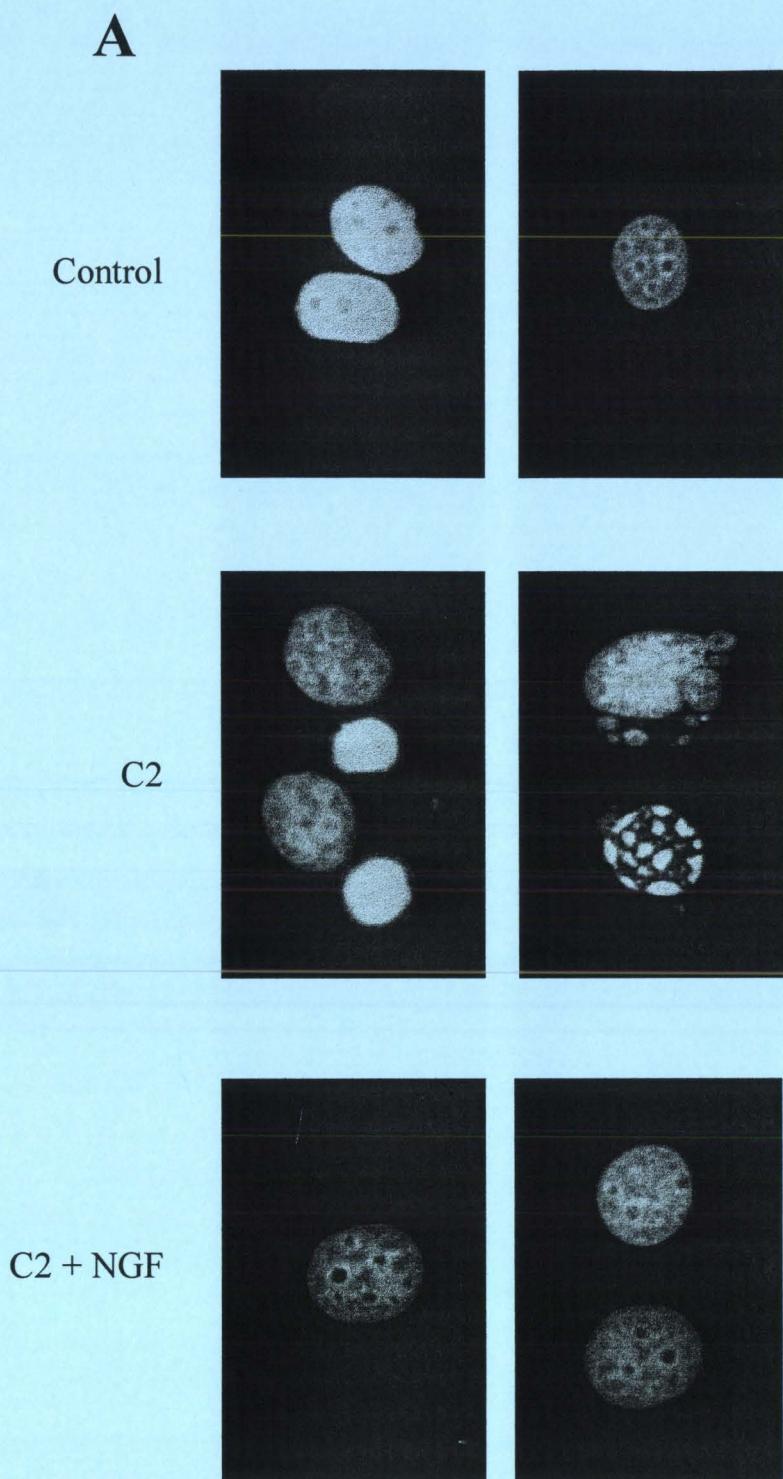
1. Barbacid, M. (1995) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**, 148-155
2. Friedman, W.J., and Greene, L.A. (1999) *Exp. Cell Res.* **253**, 131-142
3. Lewin, G.R., and Barde, Y.-A. (1996) *Ann. Rev. Neurosci.* **19**, 289-317
4. Barker, P.A. (1998) *Cell Death Differ.* **5**, 346-356
5. Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L.-T., Yang, J., Bitler, C.M., Butcher, L.L., and Bredesen, D.E. (1993) *Science* **261**, 345-348
6. Gentry, J.J., Casaccia-Bonelli, P., and Carter, B.D. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 7558-7565
7. Yaar, M., Grossman, K., Eller, M., and Gilchrest, B.A. (1991) *J Cell Biol* **115**, 821-828
8. Anton, E.S., Weskamp, G., Reichardt, L.F., and Matthew, W. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 2795-2799
9. Lillien, L.E., and Claude, P. (1985) *Nature* **317**, 632-634
10. Otten, U., Ehrhard, P., and Peck, R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 10059-10063
11. Di Marco, E., Mathor, M., Bondanza, S., Cutuli, N., Marchisio, P.C., Cancedda, R., and De Luca, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22838-22846
12. Descamps, S., Lebourhis, X., Delehedde, M., Boilly, B., and Hondermarck, H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 16659-16662
13. Djakiew, D., Delsite, R., Pflug, B., Wrathall, J., Lynch, J.H., and Onoda, M. (1991) *Cancer Res.* **51**, 3304-3310
14. Djakiew, D., Pflug, B.R., Delsite, R., Onoda, M., Lynch J.H., Arand, G., and Thompson, E.W. (1993) *Cancer Res.* **53**, 1416-1420
15. Pflug, B., and Djakiew, D. (1998) *Mol. Carcinog.* **23**, 106-114
16. Lièvremont, J.P., Sciorati, C., Morandi, E., Paolucci, C., Bunone, G., Della Valle, G., Meldolesi, J., and Clementi, E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 15466-15472

- 17.Rabizadeh, S., Rabizadeh, S., Ye, X., Wong, J.J., and Bredesen, D.E. (1999) *Cell Death Differ.* **6**, 1222-1227
- 18.Pawlowski, V., Révillion, F., Hornez, L., and Peyrat, J.-P. (2000) *Cancer Detection and Prevention* **24**, in press
- 19.Gill, Z.P., Perks, C.M., Newcomb, P.V., and Holly, J.M.P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25602-25607
- 20.Pirianov, G., Danielsson, C., Carlberg, C., James, S.Y., and Colston, K.W. (1999) *Cell Death Differ.* **6**, 890-901
- 21.Herrmann, J.L., Beham, A.W., Sarkiss, M., Chiao, P.J., Rands, M.T., Bruckheimer, E.M., Brisbay, S., and McDonnell, T.J. (1997) *Exp. Cell Res.* **237**, 101-109
- 22.Ethier, S.P. (1995) *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 964-973
- 23.Le Bourhis, X., Toillon, R.A., Boilly, B., and Hondermarck, H. (2000) *Breast Cancer Res. Treat.* **1722**, 1-8
- 24.Tagliabue, E., Castigliani, F., Ghirelli, C., Modugno, M., Asnaghi, L., Somenzi, G., Melani, C., and Ménard, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 7558-7565
- 25.Barker, P.A., and Shooter, E.M. (1994) *Neuron* **13**: 203-215
- 26.Klesse, L.J., Meyers, K.A., Marshall, C.J., and Parada, L.F. (1999) *Oncogene* **18**, 2055-2068
- 27.Casaccia-Bonelli, P., Kong, H., and Chao, M.V. (1998) *Cell Death Differ.* **5**, 357-364
- 28.Chou, T.T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 565-570
- 29.Baker, S.J., and Reddy, E.P. (1998) *Oncogene* **17**, 3261-3270
- 30.Carter, B.D., and Lewin, G.R. (1997) *Neuron* **18**, 187-190
- 31.Frade, J.M., Rodriguez-Tebar, A., and Barde, Y.A. (1996) *Nature* **383**, 166-168
- 32.Longo, F.M., Manthorpe, M., Xie, Y.M., and Varon, S. (1997) *J. Neurosci. Res.* **48**, 1-17

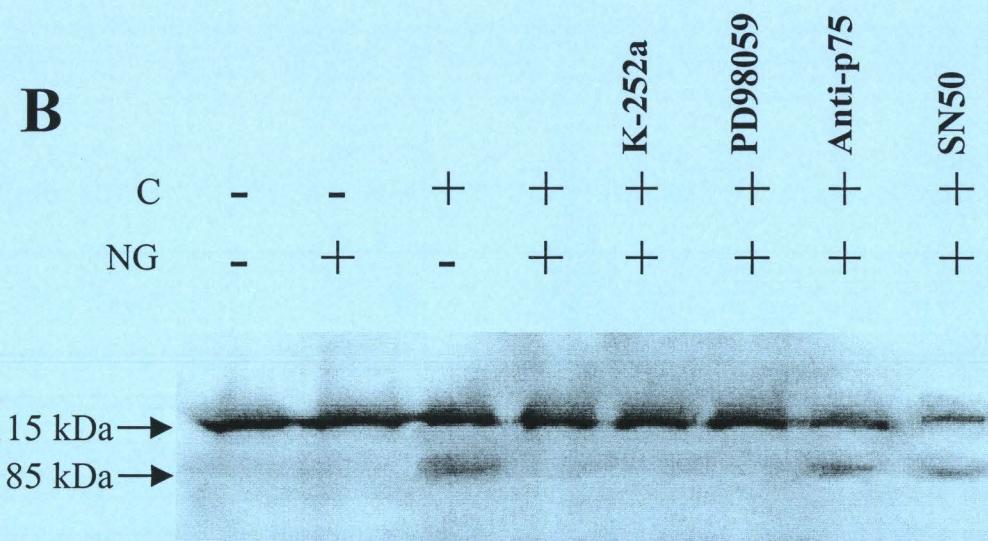
- 33.Carter, B.D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhauser, N., Bohm-Matthaei, R., Baeuerle, P.A., and Barde, Y.A. (1996) *Science* **272**, 542-545
- 34.Yao-Zhong, L., Yao, S.Y., Veach, R.A., Torgerson, T.R., and Hawiger, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 14255-14258
- 35.Grueters, A., Lakshmanan, R., Tarris, R., Alm, J., and Fisher, D.A. (1985) *Pediatr. Res.* **19**, 934-937
- 36.Lossing, C., and Hansson, H.-A. (1993) *Plast. Reconstr. Surg.* **91**, 1277-1286



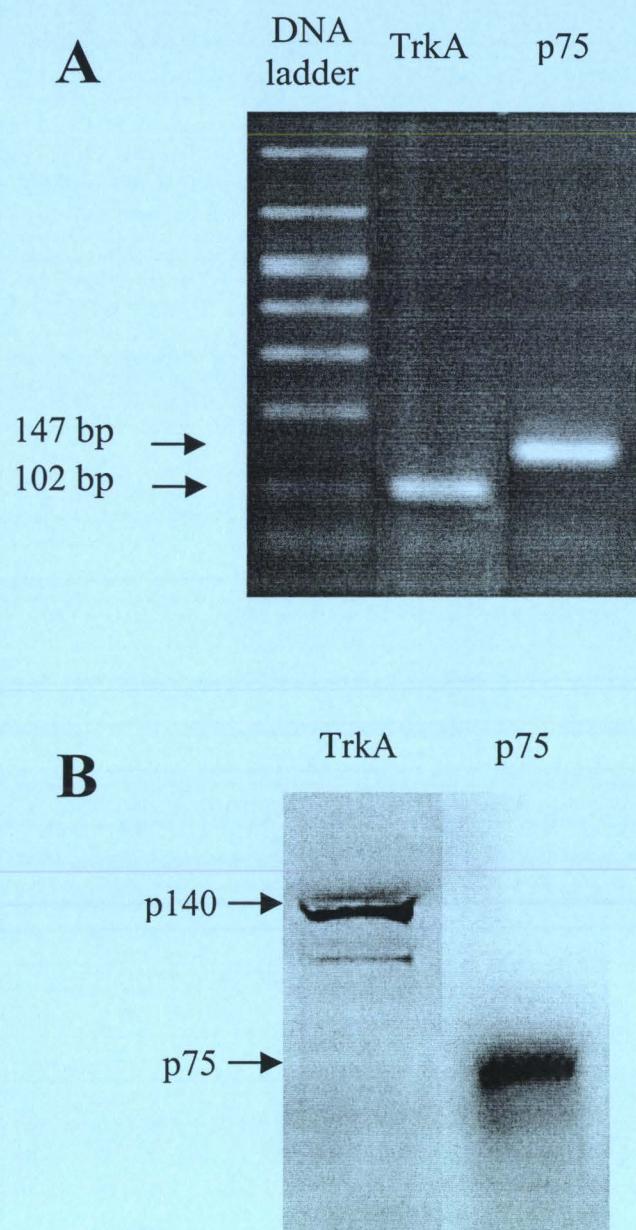
**Figure 1. Neurotrophin effect on MCF-7 growth and apoptosis.** **A)** MCF-7 cells were serum deprived in minimum essential medium, and after 24 h the neurotrophins were added (100 ng/ml NGF, 50 ng/ml BDNF, 50 ng/ml NT-3, 100 ng/ml NT-4/5). After 48 hours, cells were harvested and counted. Results are expressed as the means  $\pm$  S.D. of five separate experiments. BDNF, NT-3, and NT-4 had no significant effect (for concentrations up to 400 ng/ml) according to Student's t test. **B)** The four mammalian neurotrophins reversed C2-induced apoptosis. Cells were serum deprived in minimum essential medium and treated with C2. Neurotrophins were added at the following concentrations : 100 ng/ml NGF, 50 ng/ml BDNF, 50 ng/ml NT-3, 100 ng/ml NT-4/5. After 24 h, cells were fixed and apoptotic nuclei percentage was determined after Hoechst staining under an Olympus-BH2 fluorescent microscope.



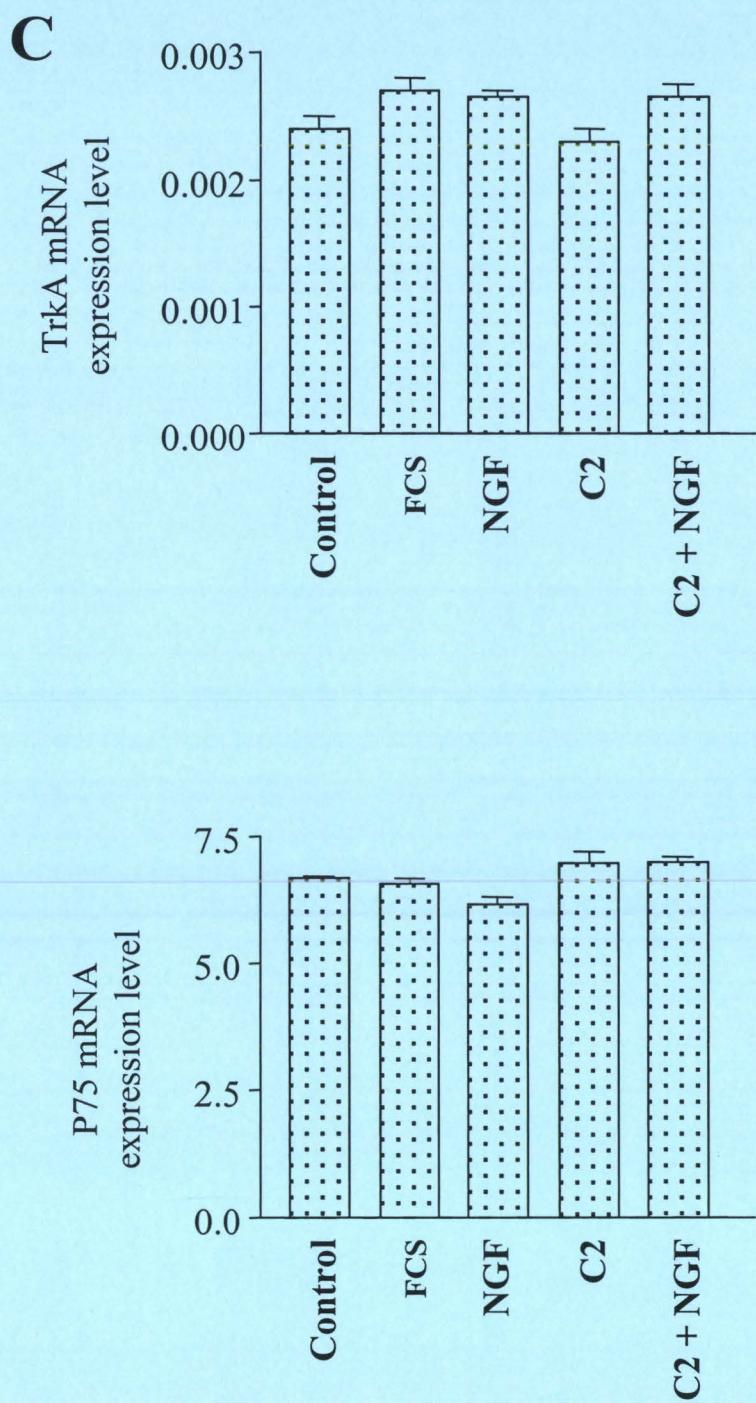
**Figure 2. Anti-apoptotic effect of NGF.** A) Hoechst staining of apoptotic cell nuclei in control, C2 and C2+NGF treated MCF-7 cells. Cells were serum deprived in minimum essential medium and treated with C2. NGF was added at the concentration of 100 ng/ml. After 24 h, cells were fixed and apoptotic nuclei were observed after Hoechst staining under an Olympus-BH2 fluorescent microscope.



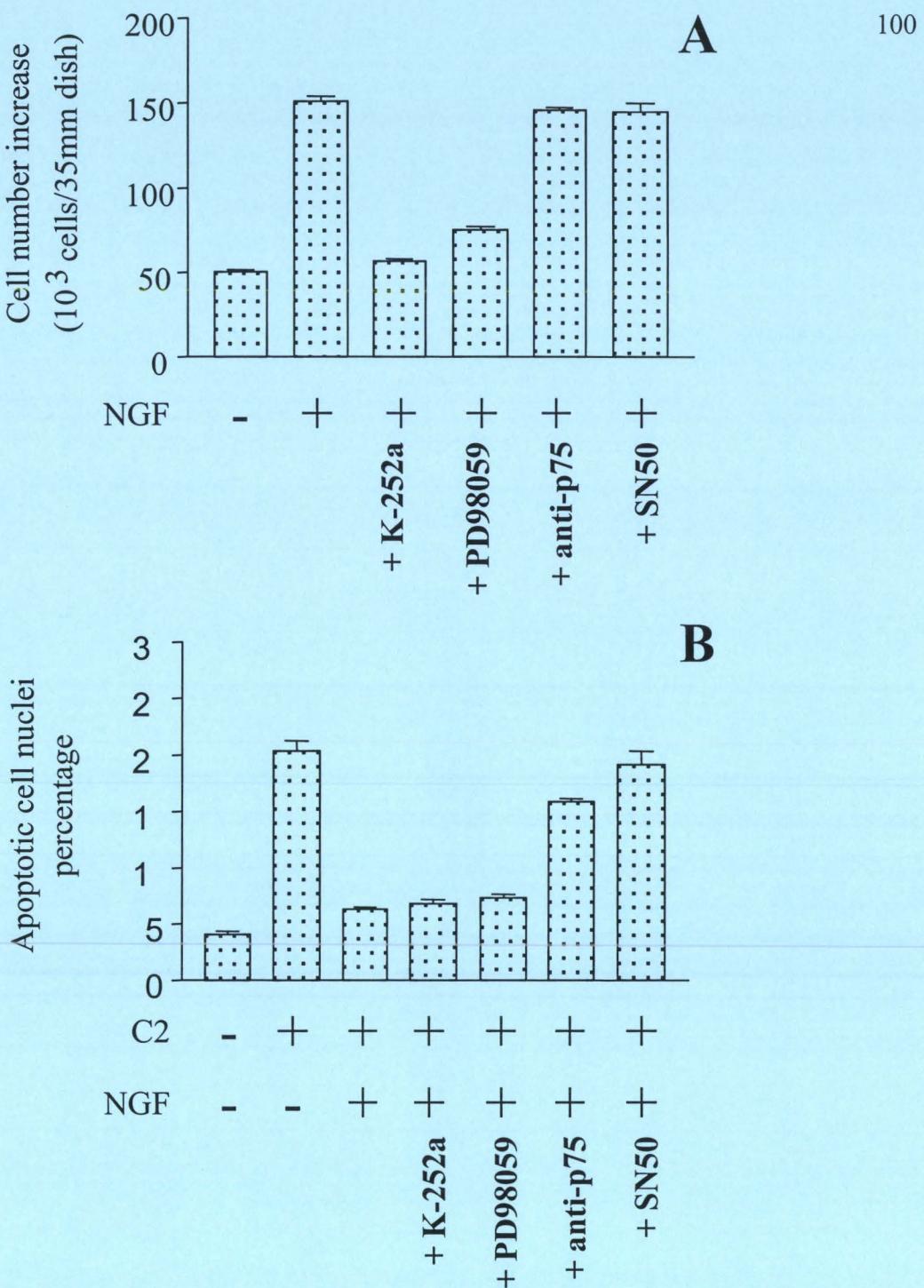
**Figure 2. Anti-apoptotic effect of NGF. B)** Immunoblot detection of PARP cleavage. C2-induced PARP cleavage was reversed by p75 activation mediated by NGF. MCF-7 cells were serum deprived in minimum essential medium for 24 h and were then treated with 100 ng/ml NGF in the presence or absence of 2  $\mu$ M C2, 10 nM K-252a, 10  $\mu$ M PD98059 or 10  $\mu$ g/ml anti-p75 blocking antibody for another 24 h period. Proteins were detected after SDS-PAGE of cell preparations from MCF-7 breast cancer cells, electroblotting on nitrocellulose membrane and immunodetection with anti-PARP.



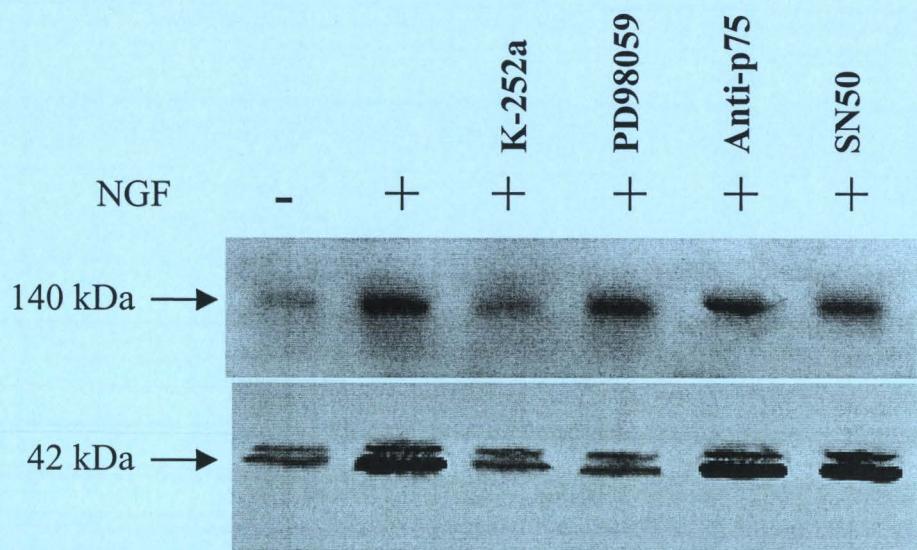
**Figure 3. TrkA and p75 mRNA expression in MCF-7 breast cancer cells.** A) Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products evidenced a 102 bp band and a 147 bp band which are characteristic of TrkA and p75 respectively. B) p140<sup>trkA</sup> and p75 were immunodetected after SDS-PAGE of cell preparation for MCF-7 breast cancer cell line.



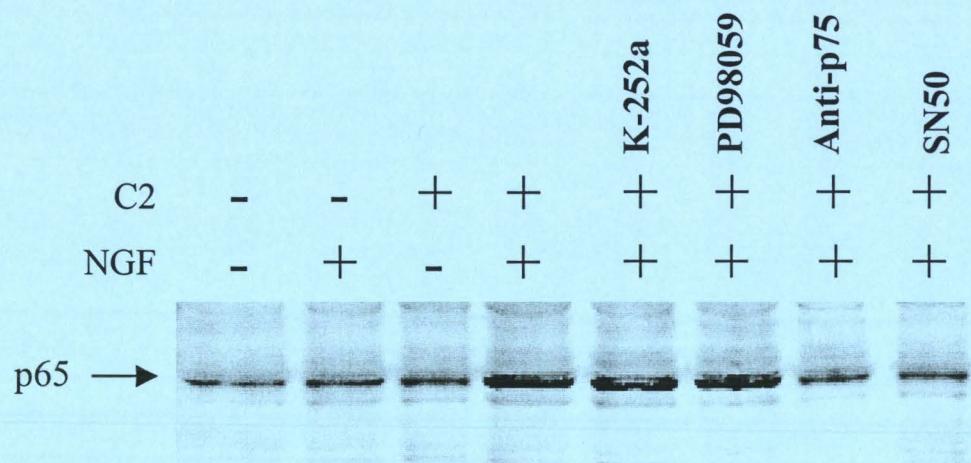
**Figure 3.** TrkA and p75 mRNA expression in MCF-7 breast cancer cells. **C)** Quantification of mRNA for TrkA and p75 in MCF-7 cells using real time quantitative RT-PCR. The effect of 10% FCS, 100 ng/ml NGF or 2  $\mu$ M C2 was measured. The levels of TrkA and p75 expression were normalized using mRNA encoding the TATA box-binding protein (TBP).



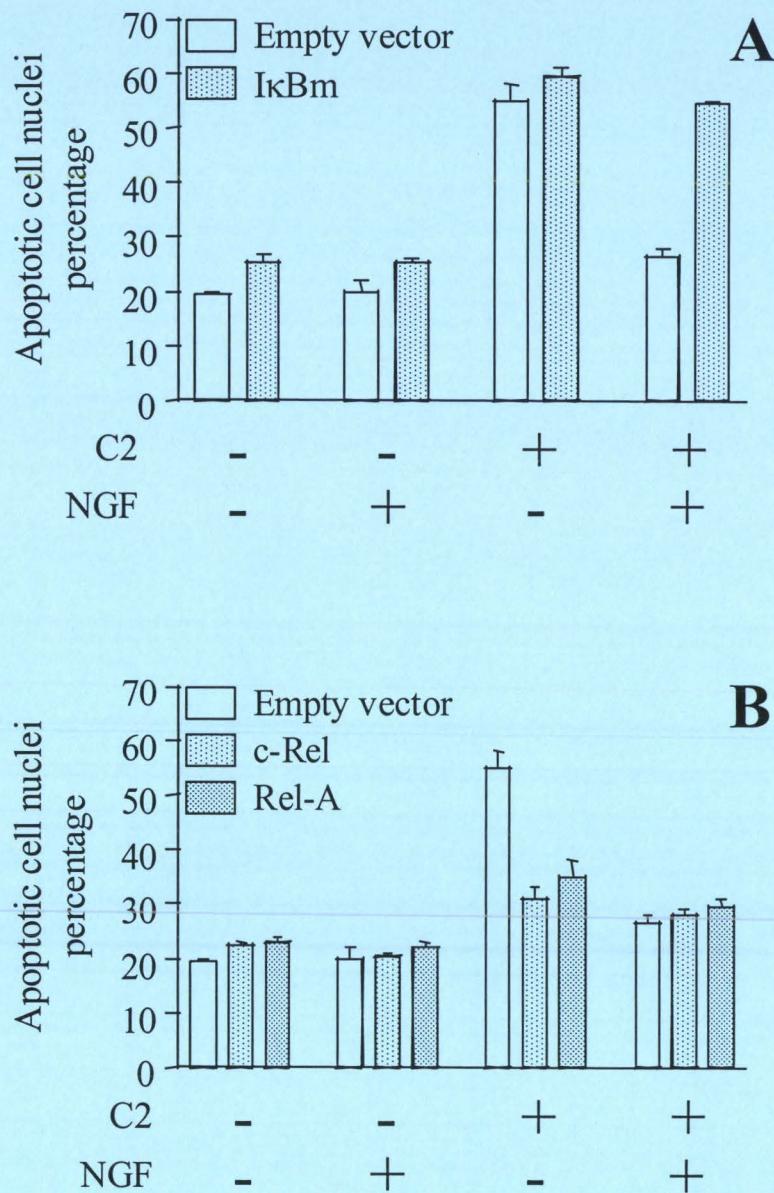
**Figure 4. Pharmacological modulation of the proliferative and anti-apoptotic effect of NGF.** MCF-7 cells were starved in minimum essential medium and after 24 h, 100 ng/ml NGF was added with or without inhibitors or antibody. **A)** After 48 h, cells were harvested and counted. Results are expressed as the means  $\pm$  SD of five separate experiments. **B)** After 24 h, cells were fixed and the percentage of apoptotic nuclei was determined after Hoechst staining under an Olympus-BH2 fluorescent microscope. The following concentrations were used : 2 $\mu$ M C2, 10 nM K-252a, 10  $\mu$ g/ml anti-p75 blocking antibody, 10  $\mu$ M PD98059, 18  $\mu$ M SN50.



**Figure 5.  $p140^{trkA}$  and MAP-kinase activation.** MCF-7 cells were treated with 100 ng/ml NGF in the presence or absence of 10 nM K-252a, 10  $\mu$ g/ml anti-p75 blocking antibody or 10  $\mu$ M PD98059.  $p140^{trkA}$  and MAP-kinase activation were studied after immunoprecipitation using polyclonal anti-TrkA and monoclonal anti-ERK2 antibody respectively. After SDS-PAGE and electroblotting, nitrocellulose membranes were revealed with the PY20 anti-phosphotyrosine antibody.



**Figure 6. Activation of NF-κB during NGF anti-apoptotic effect.** MCF-7 cells were treated with 100 ng/ml NGF in the presence or absence of 10 nM K-252a, 10 μM PD98059 or 10 μg/ml anti-p75 blocking antibody. Proteins were detected after SDS-PAGE of nuclear extract preparations and immunoblotting with rabbit anti-NF-κB p65.



**Figure 7. Modulation of NGF anti-apoptotic effect by IκBm, c-rel and rel-A transfection.** MCF-7 cells were cotransfected with EGFP-C1 and either IκBm (A) or c-rel or rel-A (B) using lipofectin reagent. Controls were performed with both PCDNA3 and EGFP-C1 (for IκBm experiments) and both PSVK<sub>3</sub> and EGFP-C1 (for c-rel and rel-A experiments). After 24h cells were serum deprived in minimum essential medium and C2 or neurotrophins were added for another 24 h period. Cells were then fixed and the percentage of apoptotic nuclei in transfected cells (expression of the green fluorescent protein was used as a transfection control) was determined after Hoechst staining under an Olympus-BH2 fluorescent microscope.

### **II.3. - Conclusion**

Les résultats présentés dans cet article ont permis de montrer que :

- le NGF est non seulement mitogène, mais aussi anti-apoptotique,
- l'effet anti-apoptotique du NGF, partagé avec les autres neurotrophines, met en jeu le récepteur p75 sans intervention de l'activité tyrosine kinase de TrkA,
- cet effet passe par une activation du facteur de transcription NF-κB.

### **III - Etude de l'expression des ARNm des récepteurs du NGF dans les biopsies de cancer du sein, intérêt pronostique**

#### **III.1. – Introduction**

L'activité d'un facteur de croissance dépend notamment de la présence de ses récepteurs dans les cellules cibles et des variations de l'expression des récepteurs peuvent permettre de réguler l'activité du facteur correspondant. Ceci explique qu'une partie des paramètres pronostiques des cancers du sein correspond à des récepteurs de facteurs de croissance. Dans cette étude, nous avons mesuré, par RT-PCR quantitative en temps réel, l'expression des récepteurs du NGF dans des lignées de cellules de cancer du sein et dans une série de biopsies afin de mieux connaître les modulations de leur expression et d'apprécier leur valeur pronostique.

**III.2. – Article 4 :**

**"EXPRESSION OF NERVE GROWTH FACTOR RECEPTORS  
AND THEIR PROGNOSTIC VALUE IN HUMAN BREAST CANCER"**

Cet article a été soumis dans la revue :

**"Cancer Research".**

## Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer<sup>1</sup>

Simon Descamps, Valérie Pawlowski, Françoise Révillion, Louis Hornez,  
Mohamed Hebbar, Bénoni Boilly, Hubert Hondermarck and Jean-Philippe  
Peyrat<sup>2</sup>

*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine [V.P., L.H., F.R., M.H., J.-P.P.], Centre Oscar Lambret, rue F. Combemale, B.P. 307, 59020 Lille Cedex, France and Equipe Facteurs de Croissance, Laboratoire de Biologie du Développement (S.D., B.B., H.H.), UPRES-EA1033, Université des sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq (France).*

Running title: NGFRs in breast cancer

Key words: nerve growth factor receptor, TrkA, p75, breast cancer, prognosis

<sup>1</sup>This investigation was supported by the Comité du Nord de la Ligue Nationale Contre le Cancer (Lille, France)

<sup>2</sup>To whom request for reprints should be addressed : at Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, Centre Oscar Lambret, rue F. Combemale, B.P. 307, 59020 Lille Cedex, France. Tel. and Fax : (33) 3 20 29 55 35 e-mail : jp-peyrat@o-lambret.fr

### FOOTNOTES

<sup>3</sup>The abbreviations used are: ER, estrogen receptor; HPG, histoprognostic grading; NGF, nerve growth factor; NGFR, nerve growth factor receptor; OS, overall survival; PgR, progesterone receptor; RFS, relapse free survival; RR, risk ratio; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TBP, TATA box-binding protein.

**ABSTRACT**

Nerve growth factor (NGF), the archetypal neurotrophin, has recently been shown to be mitogenic for human breast cancer cells. In the present study, we have assayed the expression of NGF receptors (TrkA and p75) mRNAs in breast cancer cell lines and in 363 human primary breast cancer biopsies, using real time quantitative RT-PCR. Transcripts for both TrkA and p75 were found in all the breast cancer cells and breast tumor biopsies that we have studied. TrkA and p75 were positively correlated ( $P < 0.001$ ). TrkA was associated with the histoprogностic grading ( $P = 0.034$ ) whilst p75 was related to the tumor type, since a higher level of expression was found in ductular tumors ( $P < 0.001$ ) ( $\chi^2$ ). TrkA and p75 were also both related to the expression of progesterone receptors. In Cox univariate analyses, TrkA ( $\geq$  upper quartile) was associated with longer overall survival ( $P = 0.031$ , RR = 0.56). Histoprogностic grading, tumor size, node involvement, PgR and ER were also prognostic factors. In Cox multivariate analyses, TrkA was not a prognostic parameter. The present study demonstrates the expression of NGF receptors in breast cancer and points out that patients with high level of TrkA expression have a more favorable overall survival prognosis.

## INTRODUCTION

Nerve growth factor (NGF<sup>3</sup>) is an essential neurotrophin involved in the control of survival and differentiation of central and peripheral neuronal cells of both the sympathetic and the sensory nervous system (1). NGF interacts with its target cells through two categories of membrane binding sites. The high affinity receptor tyrosine kinase (p140<sup>trkA</sup>) corresponds to the TrkA proto-oncogene, and a secondary receptor known as p75 neurotrophin receptor (p75), is a member of the tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  receptor superfamily and has no tyrosine kinase activity. Whereas it has been clearly established that p140<sup>trkA</sup> tyrosine kinase activity leads to the stimulation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade, the signaling mediated by p75 remains controversial (2, 3). In addition to its neurotrophic function, several other activities of NGF have been described. For example, NGF is chemotactic for Schwann cells (4) and stimulates the proliferation of a few cell types such as chromaffin cells (5), lymphocytes (6) and keratinocytes (7). In human prostatic cells, NGF participates in tumor cell growth and invasion (8, 9). This last effect is mediated by p140<sup>trkA</sup> and p75 and indicates that NGF is involved in prostatic carcinogenesis.

We have recently demonstrated for the first time that NGF is able to stimulate the proliferation of the breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 (10). We have evidenced, using specific antibodies, the presence of p140<sup>trkA</sup> and p75 in these cells and that these receptors are activated by NGF. In addition, Tagliabue et al (11) have shown that p140<sup>trkA</sup> cooperates with p185<sup>Her-2</sup> in activating growth of breast cancer cells. Altogether, these data suggest the implication of NGF in breast cancer development and progression. In previous studies we have demonstrated that, in breast cancer biopsies, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) receptor are related to tumor

prognosis (12, 13). These results have led us to quantify the expression of TrkA and p75 mRNAs in breast cancer cell lines and in a series of 363 breast cancer biopsies. We have shown that mRNAs for TrkA and p75 are expressed in breast cancer and we have evaluated their prognostic significance

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture.

Cell culture reagents were purchased from BioWhittaker (France) except insulin which was obtained from Organon (France). The breast cancer cell lines (MCF-7, T-47-D, BT20, SKBr3, MDA-MB-231, MDA-MB-453 and MDA-MB-468 were obtained from the American Type Culture Collection and routinely grown as previously described (10) in monolayer cultures. Cells were maintained in minimal essential medium (Earle's salts) supplemented with 20 mM Hepes, 2 g/l sodium bicarbonate, 2 mM L-glutamine, 10% fetal calf serum, 100 units/ml of penicillin-streptomycin, 50 µg/ml gentamycin, 1% of non-essential amino acids and 5 µg/ml of insulin. The SY5Y neuroblastoma cell line was a kind gift of Dr Luc Buée (INSERM, U422, Lille, France).

### Patients and tumors.

This study includes 363 patients who underwent surgery for primary breast cancer in the Centre Oscar Lambret (the Anti-Cancer Center of the North of France), between May 1989 and December 1991. Tumor specimens were solely adenocarcinomas. At the time of collection, fat was removed and samples were divided in two parts. The first part was submitted for histological studies and histoprogностic grading (HPG), according to the method of Contesso et al (14). The other part of the sample was immediately frozen in liquid nitrogen for ER and PgR assays (15, 16).

The population studied is described in Table 1. The median age of the patients was 58 years (range 26-90 years old). In prognostic studies, the median duration of follow up of living patients was 79 months. The number of relapses (all distant relapses) was 126 and the number of patients that died from intercurrent deceases was 94.

**Total RNA isolation.**

Total RNA was isolated from tumor samples (40 mg weight) using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, France). The disruption and homogenization of the tumor samples was performed using a Rotor-Stator Homogenizer (Ribolyzer, Hybaid). The amount of extracted RNA was quantified by measuring the absorbance at 260 nm, and ranged between 1.5 µg and 194 µg (mean 40 µg). The purity of the RNA was checked by measuring the ratio of the absorbance at 260 nm and 280 nm.

**Production of TrkA, p75 and TBP standards.**

The mRNA standards were obtained after *in vitro* transcription of a TrkA, p75 or TBP fragment cloned in pGEM-T Vector Systems (Promega, France) (*in vitro* transcription was carried out using the RiboMAX<sup>TM</sup> Large scale RNA Production System T7 for p75 and the TATA box-binding protein (TBP, a component of the DNA-binding protein complex TFIID), and the SP6 Production System for TrkA, Promega, France). Briefly, PCR products of TrkA (102 bp) and p75 (147 bp) from SY5Y human neuroblastoma cells and of TBP (89 bp) from MCF-7 were inserted into the pGEM-T plasmid according to the manufacturer recommendations. This plasmid, which contained the T7 and SP6 polymerases promoters and a thymidine at the 3' end of each strand, was used as a template for *in vitro* transcription. At the end of the *in vitro* transcription, the reaction mixture was treated with RNase-free DNase, and the cRNA was recovered by extraction (phenol/chloroform/isoamyl alcohol; 25/24/1) followed by ethanol precipitation. The absolute number of cRNA templates was calculated using the molecular weight of the plasmid containing the TrkA, p75 or TBP fragments and Avogadro's number.

### TrkA, p75 and TBP PCR Primers and TaqMan Fluorogenic Probes.

The PCR primers and the TaqMan fluorogenic probe were designed using the Primer Express software program (Perkin Elmer, Demo version 1.0). Amplicons of 102 bp and 147 bp were obtained for TrkA and p75 respectively, corresponding to sequences located in the extracellular domain of each protein. An amplicon of 89 bp was obtained for TBP, using primers designed by Bièche et al. (17). The TaqMan probe carried a 5' FAM (6-carboxy-fluorescein) reporter dye in the cases of TrkA and p75 and a 5' VIC reporter dye in the case of TBP. Each probe carried a 3' TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) quencher dye. The probes also contained a 3' phosphate group to prevent extension during PCR. The sequences of probe and primers (Primers and probes for TrkA and p75, probe for TBP: Eurogentec, Belgium ; primers for TBP: Genset, France) are presented Table 2.

### RT-PCR Conditions.

The reverse transcription and the polymerase chain reaction were performed in a one-step methodology as described by Pawlowski et al. (18). The reaction mixture (50 µl final volume) contained 50 ng of total RNA from cell lines or tumor samples, 10X (5µl) TaqMan buffer (500 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 100 mM tris HCl, pH 8.3, 600 nM ROX), MgCl<sub>2</sub> (6 mM for TrkA, 3 mM for p75 and 5 mM for TBP), 20 units RNase inhibitor, 12.5 units of MuLV reverse transcriptase, 1.25 units AmpliTaq Gold DNA polymerase, 300 µM dATP, dCTP, dGTP, 600 µM dUTP, 200 nM forward and reverse primers, and 200 nM probe. Reverse transcription was performed at 48°C for 30 min. The AmpliTaq Gold DNA polymerase was then activated by heating for 10 min at 95°C. According to the supplier's recommendations, a two-temperature PCR protocol, including a denaturation step and a step combining annealing and extension, was performed as follows : 15 sec at 95°C and 90 sec at 60°C for 40 cycles. A

template free control was included in each experiment. The non-template controls, standard RNA dilutions, and tumor samples were assayed in duplicate.

#### **Analysis and Expression of the real-time RT-PCR Data.**

The quantification of the starting quantity of mRNA in an unknown sample was performed by preparing a standard curve using dilutions of a known amount of the respective standard RNA. For each dilution, the Abi-Prism 7700 software generated a real-time amplification curve constructed by relating the fluorescence signal intensity ( $\Delta Rn$ ) to the cycle number. The  $\Delta Rn$  value corresponded to the variation in the reporter fluorescence intensity before and after PCR, normalized to the fluorescence of an internal passive reference present in the buffer solution (ROX, a rhodamine derivative).

The cycle number at which a significant increase in the fluorescence signal was first detected was defined as the cycle threshold (Ct). Using serial dilutions of the standard RNA, the standard curve was generated on the basis of the linear relationship existing between the Ct value and the logarithm of the starting quantity (19). The quantification in the unknown samples was performed by the software which calculated the Ct value for each sample and then determined the initial quantity of target using the standard curve.

The level of TrkA and p75 mRNA expression was expressed as a ratio between receptor expression (in copies per  $\mu$ g of total RNA) and TBP expression (in copies per  $\mu$ g of total RNA), and was referred to as normalized expression.

#### **Statistical Analyses.**

All the statistical analyses were done using SPSS (Version 9.0.1). The relationships between qualitative variables were determined using the  $\chi^2$  test (with Yates correction when necessary). Correlations between parameters were assessed according to the Spearman non-

parametric test. Comparison between sub-populations (PgR positive or PgR negative) were assessed according to the Mann-Whitney non-parametric test. Overall survival (OS) and relapse free survival (RFS) were studied by Kaplan Meier method analysis. The comparison of curves was carried out by the log rank test. The Cox's proportional hazard regression method (20) was used to assess the prognostic significance of parameters taken in association.

## RESULTS

### **NGFRs in breast cancer cells.**

Expression of TrkA and p75 in breast cancer cell lines is presented in figure 1. TrkA expression (TrkA/TBP) ranged from 0.0013 (T47D) to 0.012 (MDA-MB-468). P75 expression (p75/TBP) ranged from 0.0077 (MDA-MB-453) to 6.66 (MCF-7).

### **Distribution of NGFRs in a non-selected series of 363 human primary breast cancers.**

The distribution of breast cancer biopsies according to their TrkA and p75 mRNA expression is presented in figure 2. The median concentration of TrkA was 0.16 ranging from 0.005 to 3.48; the lower quartile was 0.079 and the upper quartile was 0.30. The median concentration of p75 was 0.19 ranging from 0.002 to 7.94; the lower quartile was 0.075 and the upper quartile was 0.52.

### **Relationships between NGFRs and other parameters.**

Table 1 shows that TrkA expression levels are related to the histoprognostic grading (HPG) (Chi square test), and that p75 mRNA expression levels are related to tumor type, with low levels being more frequently found in ductular type tumors.

A positive correlation was found between TrkA and p75 ( $P < 0.001$ ) and a negative correlation was found between TrkA and HPG ( $P = 0.034$ ) (Spearman test). Additionally, in the global population, we have found positive correlation between ER and PgR ( $P < 0.001$ ), ER and age ( $P < 0.001$ ), PgR and age ( $P = 0.019$ ), node involvement and tumor diameter ( $P < 0.001$ ), and tumor size and HPG ( $P = 0.01$ ). We found negative correlations between HPG and ER ( $P < 0.001$ ) on one hand and HPG and PgR ( $P < 0.001$ ) on the other hand, as well as between ER and tumor diameter ( $P < 0.001$ ).

TrkA ( $P = 0.037$ ), as well as p75 ( $P = 0.026$ ), were expressed to a higher level in PgR positive tumors compared to PgR negative tumors (Mann-Whitney non-parametric test). TrkA ( $P = 0.030$ ) and p75 levels ( $P = 0.054$ ) were also higher in well differentiated tumors (GHP 1) than in GHP 2 and 3. TrkA was found to be more highly expressed in small tumors (tumor size 1) than in large tumors ( $P = 0.088$ ). Finally, P75 level was higher in menopausal patients ( $> 50$  yr) than in non-menopausal patients ( $P = 0.019$ ).

### **Prognostic studies.**

*Cox univariate analyses* (Table 3, Fig. 3). In OS studies TrkA was a prognostic parameter, with high concentrations being associated to good prognosis. HPG, tumor diameter, node involvement, PgR and ER were also prognostic parameters. In relapse free survival (RFS) studies, only tumor diameter and node involvement were prognostic parameters. Figure 3 shows overall survival curves for all the population according to the expression of TrkA.

*Cox multivariate analyses.* By Cox analysis, TrkA was not a prognostic factor. In OS, node involvement, PgR and HPG were prognostic factors; in RFS, node involvement, HPG and tumor diameter were prognostic parameters.

## DISCUSSION

In the present study, NGF receptors were found to be expressed in all the breast cancer cell lines and breast cancer biopsies that we have studied. We have previously demonstrated by immunoprecipitation and western blotting experiments that the proteins corresponding to TrkA and p75 gene expression, p140<sup>trkA</sup> and p75<sup>NTR</sup> respectively, are present in breast cancer cell lines and are activated by NGF (10). Thus NGF receptors mRNA expression in breast cancer cells is associated with the expression of the respective proteins. In addition, by using specific antibodies raised against p140<sup>trkA</sup>, we immunolocalized TrkA in cancerous epithelial cells (data not shown) in agreement with Koizumi et al. (21). In our study, TrkA and p75 were found to be correlated in breast cancer and to be expressed in equivalent amounts since their median concentrations, upper and lower quartiles are very similar. Both receptors are also present in breast cancer cell lines. These results, and our previous demonstration that NGF is mitogenic for breast cancer cell lines (10), strongly suggest an implication of NGF in breast cancer development. The TrkA tyrosine kinase receptor is known to mediate the NGF mitogenic effect by activating the Ras/Raf/MAPK pathway. P75 has been shown to regulate TrkA activation by NGF, and it could also have a role in the regulation of apoptosis by activation of a specific pathway involving ceramides, jun-N-terminal kinase (JNK), caspases or nuclear factor-κB (NF-κB) (22). p75 has been recently shown to be responsible of the anti-apoptotic effect of NGF on Schwannoma cells (23) and could have a similar role in breast cancer cells (unpublished data). Considering the described effects of NGF, we can hypothesize that this growth factor is able to modify the equilibrium between proliferation and apoptosis to favour tumor growth .

In breast cancers, there was a wide range of variation in TrkA (0.05 to 3.48) and p75 (0.002 to 7.94) expression (normalized to TBP expression). We demonstrate that a first source

of variation is the tumor type, as TrkA level is lower in high grade tumors and p75 expression is higher in ductular carcinomas. We found that high concentrations of TrkA were related to high concentrations of PgR. The mechanism by which TrkA is regulated in breast cancer has never been described. The observed coexpression of TrkA and steroid receptors could suggest a common regulator of these receptors, so we can hypothesize that estradiol stimulates the expression of TrkA transcripts, as it has been shown for transcripts of insulin-like growth factor receptors (24). It has been shown in other cell types that NGF can modulate the expression of its own receptors (25). Two studies have reported the presence of NGF in milk (26) and in capsules surrounding breast implants (27), showing the presence of NGF in mammary gland. Thus the variation of NGFR expression that we have observed in breast cancer biopsies could also be related to NGF regulation of its own receptors.

We demonstrated that TrkA had a prognostic significance in overall survival in univariate Cox analyses, with a median duration of follow-up of 6.5 yr. A better prognosis was found associated with a higher level of TrkA. The best TrkA threshold defined was 0.30 (normalized relative to TBP), corresponding to the higher quartile. In contrast, in multiparameter Cox analyses, TrkA was not a prognostic parameter : this was not unexpected considering its relation with histoprogностic grading. It might be considered as paradoxical that a tumor containing a high level of receptors for the growth factor NGF exhibits a better prognosis than a tumor without. However, a relationship between TrkA and prognosis has already been reported in neuroblastoma for which higher level of TrkA is also associated with a better prognosis (28). A relationship between tyrosine kinase receptors and prognosis has already been reported in breast cancer for IGF-1 receptors (12) and FGF-2 receptors (13). We can hypothesize that tumors with high level of tyrosine kinase receptors have retained some physiological control of growth, which could explain the better prognosis. This hypothesis is sustained by the close link between TrkA and PgR.

In conclusion, the present study emphasizes the idea of an important role for NGF in human breast cancer growth and points out that patients with high level of TrkA receptors have a better prognosis. Then NGFRs are potential targets for new breast cancer therapies and the recent demonstration by Tagliabue et al (11) that p140<sup>trkA</sup> cooperates with p185<sup>Her-2</sup> in activating the growth of breast cancer cells suggests that blocking the NGF receptors could improve the effect of anti-erbB2 drugs.

## REFERENCES

1. Lewin, G.R., and Barde, Y.A. Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.*, **19** : 289-317, 1996.
2. Raffioni, S., Bradshaw, R.A., and Buxser, S.E. The receptors for nerve growth factor and other neurotrophins. *Ann. Rev.Biochem.*, **62** : 823-850, 1993.
3. Bothwell, M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, **18** : 223-253, 1995.
4. Anton, E.S., Weskamp, G., Reichardt, L.F., and Matthew W.D. Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, **91** : 2795-2799, 1994.
5. Lillien, L.E., and Claude, P. Nerve growth factor is a mitogen for cultured chromatffin cells. *Nature* , **317** : 632-634, 1985.
6. Otten, U., Ehrhard, P., and Pekh, R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **86** : 10059-10063, 1989.
7. Di Marco, E., Mathor, M., Bondanza, S., Cutuli, N., Marchisio, P.C., Cancedda, R., and De Luca, M. Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. *J. Biol. Chem.*, **268** : 22838-22846, 1993.
8. Djakiew, D., Delsite, R., Pflug, B.R., Wrathall, J., Lynch, J.H., and Onoda, M., Regulation of growth by a nerve growth factor-like protein which modulates paracrine interactions between a neoplastic epithelial cell line and stromal cells of the human prostate. *Cancer Res.*, **51** : 3304-3310, 1991.
9. Pflug, B.R., and Djakiew, D. Expression of p75NTR in a human prostate epithelial tumor cell line reduces nerve growth factor-induced cell growth by activation of programmed cell death. *Mol. Carcinog.* **23** : 106-114, 1998.
10. Descamps, S., Lebourhis, X., Delehedde, M., Boilly, B., and Hondermarck, H. Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **273** : 16659-16662, 1998.

11. Tagliabue, E., Castiglioni, F., Ghirelli, C., Modugno, M., Asnaghi, L., Somenzi, G., Melani, C., Ménard, S. Nerve growth factor cooperates with p185<sup>HER2</sup> in activating growth of human breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 275 : 5388-5394, 2000.
12. Bonneterre, J., Peyrat, J.P., Beuscart, R., and Demaille, A. Prognostic significance of insulin-like growth factor 1 receptors in human breast cancer. *Cancer Res.*, 50 : 6931-6935, 1990.
13. Blanckaert, V., Hebbar, M., Louchez, M.M., Vilan, M.O., Schelling, M.E., and Peyrat, J.P. Basic fibroblast growth factor receptor and their prognostic value in human breast cancer. *Clin Cancer Res.*, 4 : 2939-2947, 1998.
14. Contesso, G., Mouriesse, H., Friedman, S., Genin, J., Sarrazin, D., and Rouesse, J. The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1010 patients uniformly treated at Institut Gustave Roussy. *J. Clin. Oncol.*, 5 : 1378-1386, 1987.
15. Blankenstein, M.A., Comparison of ligand binding assay and enzyme immunoassay of estrogen receptor in human breast cancer cytosols. Experience of the E.O.R.T.C. Receptor Group. *Breast Cancer Res. Treat.*, 17 : 91-8, 1990.
16. Horwitz, K.B., and McGuire, W.L. Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids*, 25 : 497-505, 1975.
17. Bièche, I., Onody, P., Laurendeau, I., Olivi, M., Vidaud, D., Lidereau, R., and Vidaud, M. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clinical Chemistry*, 45 : 1148-1156, 1999.
18. Pawlowski, V., Révillion, F., Hornez, L., and Peyrat, J.-P. A real-time one-step RT-PCR method to quantify c-erbB-2 expression in human breast cancer. *Cancer Detection and Prevention* 24 : in press, 2000.
19. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11 : 1026-1030, 1993.
20. Cox, D. R . Regression models and lifetables. *J. R. Stat. Soc. U.*, 34 : 187-200, 1972.
21. Koizumi, H., Morita, M., Mikami, S., Shibayama, E., and Uchikoshi, T. Immunohistochemical analysis of TrkA neurotrophin receptor expression in human non-neuronal carcinomas. *Pathol. Int.*, 48 : 93-101, 1998.

- 22.Barker, A.B. p75<sup>NTR</sup>: A study in contrasts. *Cell Death Differ.*, 5 : 346-356, 1998.
- 23.Gentry, J.J., Casaccia-Bonelli, P., and Carter, B.D. Nerve growth factor activation of nuclear factor κB through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J. Biol. Chem.*, 17 : 7558-7565, 2000.
- 24.Stewart, A.J., Johnson, M.D., May, F.E.B., and Westley B.R. Role of insulin-like growth factors and the type I insulin-like growth factor receptor in the estrogen-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 265 : 21172-21178, 1990.
- 25.Haskell, B.E., Stach, R.W., Werrbach-Perez, K., Perez-Polo, J.R. Effect of retinoic acid on nerve growth factor receptors. *Cell Tissue Res.* 247 : 67-73, 1987.
- 26.Grueters, A., Lakshmanan, J., Tarris, R., Alm, J., and Fischer, D.A. Nerve growth factor in mouse milk during early lactation : lack of dependency on submandibular salivary glands. *Pediatr. Res.*, 19 : 934-937, 1985.
- 27.Lossing, C., and Hansson, H.A. Peptide growth factors and myofibroblasts in capsules around human breast implants. *Plast. Reconstru. Surg.*, 91 : 1277-1286, 1993.
- 28.Kogner, P., Barnany, G., Dominici, C., Castello, M.A., Rascella, G., and Persson, H. Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res.* 53 : 2044-2050, 1993.

**Table 1:** Prognostic factors for patients according to TrkA and p75 status.

		TrkA	TrkA	P value	p75	p75	P value
		(<upper quartile <sup>a</sup> )	(≥upper quartile <sup>a</sup> )		(<upper quartile <sup>b</sup> )	(≥upper quartile <sup>b</sup> )	
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
Age	< 50	16.9	6.4	NS <sup>c</sup>	15.8	7.1	NS <sup>c</sup>
	≥ 50	58.3	18.5		59	18.1	
Node	negative	37.8	11.4	NS	35.4	13	NS
	positive	37.2	13.6		39.7	11.9	
HPG	I	6.5	4.7	0.034	7	4.5	NS
	II	37.3	10.9		35.4	12.7	
	III	32	8.7		32.2	8.3	
Tumor type	ductular	51.5	17.1	NS	56.6	11.8	< 0.001
	lobular	8	3.3		7.3	3.9	
	others	15.4	4.7		11	9.3	
Tumor diameter	< 2 cm	6.3	2	NS	7	1.5	NS
	2-5 cm	47.3	19.4		49.1	18	
	> 5 cm	20.8	4.3		18.3	6.1	
ER	< 10 fmol/mg	21.5	4.7	NS	19.7	5.7	NS
ER	≥ 10 fmol/mg	53.1	20.7		56	18.6	
PgR	< 10 fmol/mg	22.4	5	NS	22.1	5.2	NS
PgR	≥ 10 fmol/mg	52.1	20.4		53.6	19.2	

<sup>a</sup>upper quartile : TrkA/TBP = 0.30<sup>b</sup>upper quartile : p75/TBP = 0.52<sup>c</sup>statistically not significant**Table 2:** Sequences of TrkA, p75 and TBP Primers and TaqMan Probe.

---

	Sequence (5'-3')	Position	Product size
<b>TrkA</b>			
Forward	CATCGTGAAGAGTGGTCTCCG	291U (21 b)	
			102 bp
Reverse	GAGAGAGACTCCAGAGCGTTGAA	392L (23 b)	
Probe <sup>1</sup>	AGGAGTGAAATGGAAGGCATCTGGCG	320-345	
<b>p75</b>			
Forward	CCTACGGCTACTACCAGGATGAG	442U (23 b)	
			147 bp
Reverse	TGGCCTCGTCGGAATACG	588L (18 b)	
Probe <sup>1</sup>	CTCGGGCCTCGTGTCTCCTGC	506-527	
<b>TBP</b>			
Forward	CACGAACCACGGCACTGATT	706U (23 b)	
			89 bp
Reverse	TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC	794L (18 b)	
Probe <sup>1</sup>	TGTGCACAGGAGCCAAGAGTGAAGA	745-769	

---

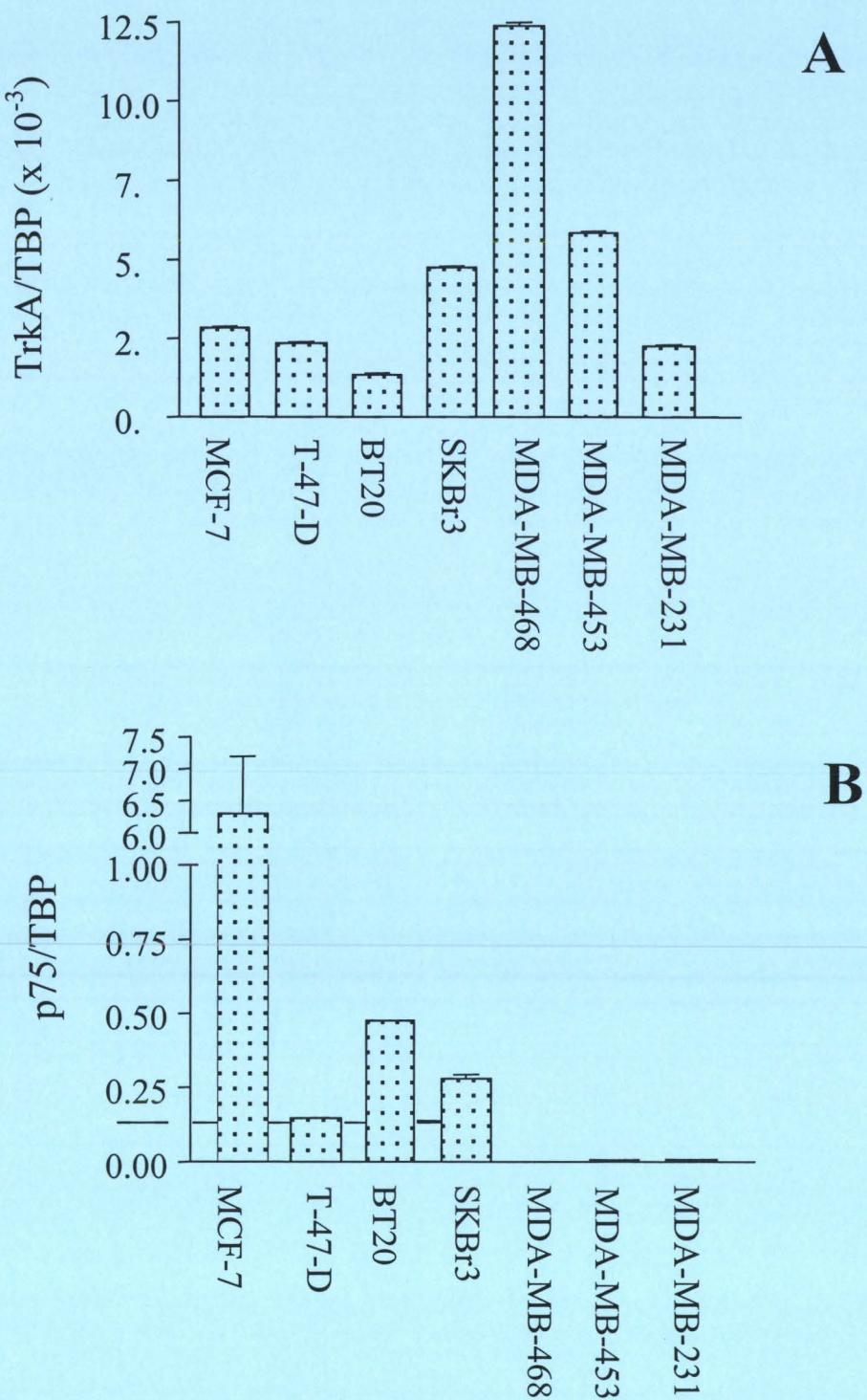
<sup>1</sup> The TaqMan probe carried a 5' FAM (6-carboxy-fluorescein) reporter dye (TrkA and p75) or a 5' VIC reporter dye (TBP), a 3' TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) quencher dye, and contained a 3' phosphate group to prevent extension during PCR.

**Table 3 :** Prognostic factors in Cox univariate analyses.

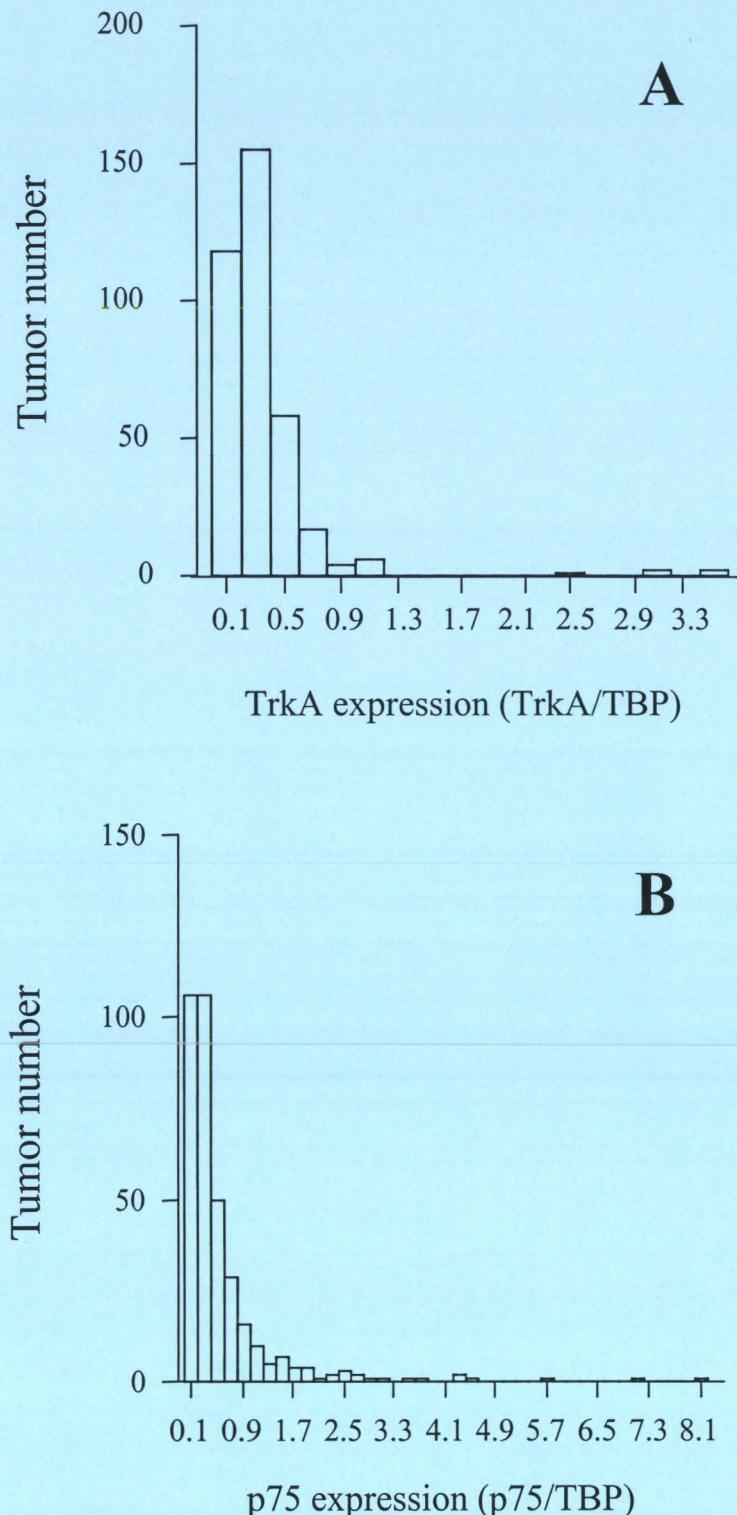
	O S		R F S		
	P value	RR	P value	RR	
TrkA	<b>0.034</b>	<b>0.56</b>	NS <sup>a</sup>		
p75	NS		NS		
ER	<b>0.044</b>	<b>0.64</b>	NS		
<u>(&lt; 10; ≥ 10 fmol/mg protein)</u>					
PgR	<b>0.0042</b>	<b>0.54</b>	NS		
<u>(&lt; 10; ≥ 10 fmol/mg protein)</u>					
Node involvement	<b>0.034</b>	<b>1.56</b>	<b>0.0088</b>	<b>1.61</b>	
<u>( 0; &gt; 0)</u>					
Tumor diameter	<b>0.0038</b>	<b>1.75</b>	<b>0.0022</b>	<b>1.66</b>	
<u>(&lt; 2; 2 to 5; &gt; 5 cm)</u>					
HPG (I, II, III)	<b>0.0008</b>	<b>1.84</b>	NS		

The thresholds (upper quartiles) were 0.30 (TrkA/TBP ratio)  
for TrkA and 0.52 (p75/TBP ratio) for p75.

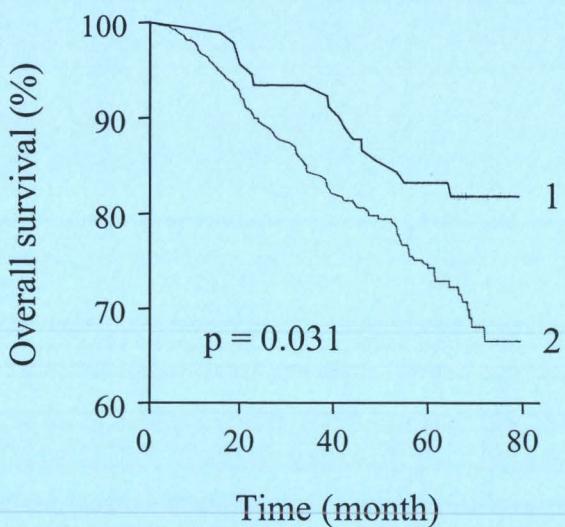
<sup>a</sup>statistically not significant



**Figure 1:** Distribution of TrkA (panel A) and p75 (panel B) mRNA expression in human breast cancer cell lines. The TrkA or p75 expression is normalized to the TBP expression and is expressed as a ratio (TrkA or p75 expression / TBP expression).



**Figure 2:** A, Distribution of TrkA mRNA expression in 363 non-selected primary breast cancers. B, Distribution of p75 mRNA expression in 355 non-selected primary breast cancers. Tumors are distributed according to the relative expression of TrkA or p75. The TrkA or p75 expression is normalized to the TBP expression and is expressed as a ratio (TrkA or p75 expression / TBP expression).



**Figure 3:** Overall survival in the whole population according to the presence of TrkA. The curve 1 corresponds to the patients with high level of TrkA expression ( $\text{TrkA/TBP} \geq 0.30$ ); the curve 2 corresponds to the patients with low TrkA expression ( $\text{TrkA/TBP} < 0.30$ ). A higher OS was found in TrkA positive patients.

### II.3. - Conclusion

Les résultats de cette étude montrent sur les lignées cellulaires en culture que :

- il existe peu de variations d'expression de TrkA d'un type cellulaire à un autre,
- p75 est fortement exprimé dans la lignée hormono-sensible MCF-7 et très peu exprimé dans les lignées hormono-insensibles MDA-MB-231, MDA-MB-453 et MDA-MB-468.

Ils mettent également en évidence dans les biopsies de cancer du sein :

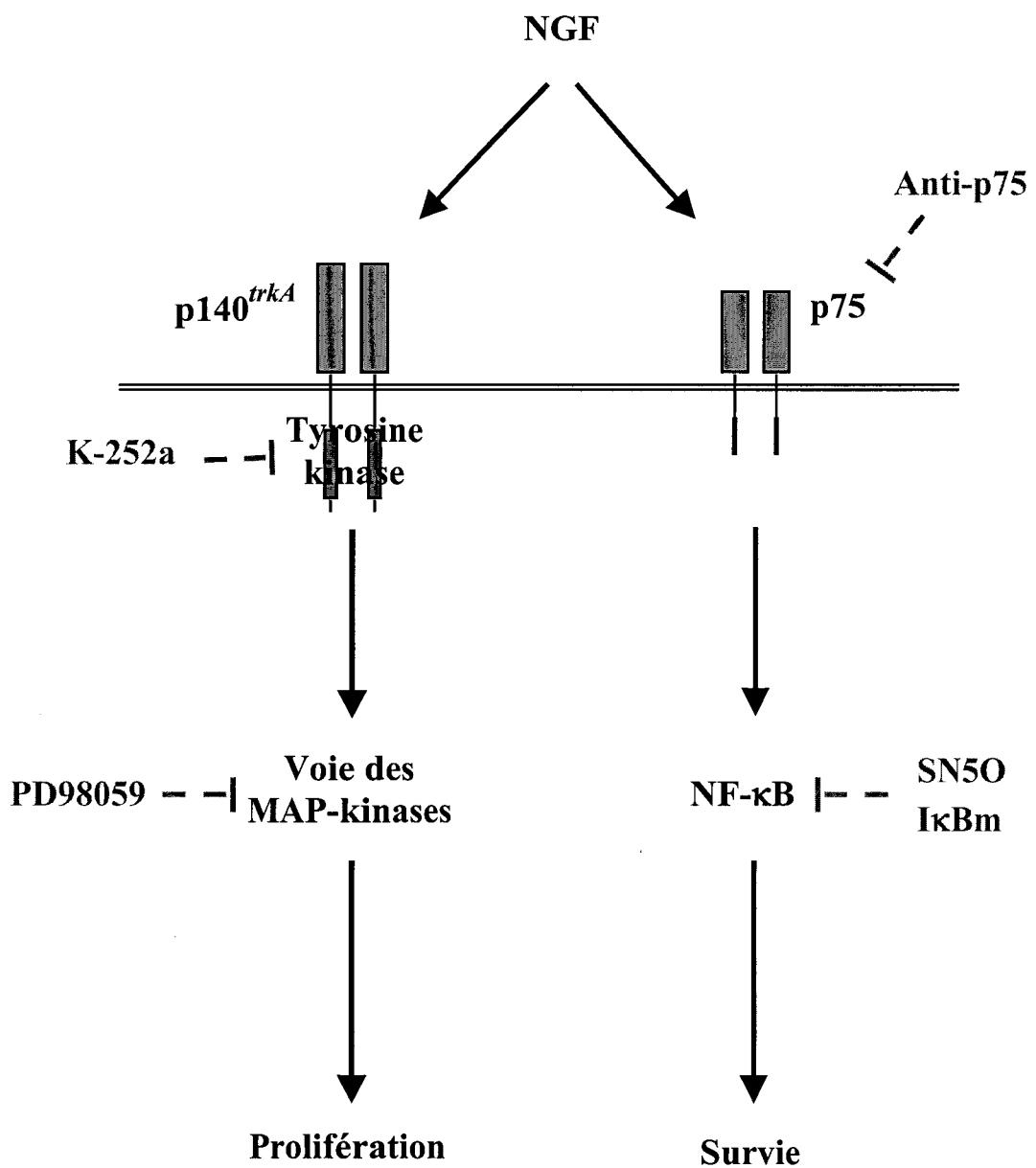
- une corrélation positive de l'expression de TrkA et p75,
- une expression préférentielle de p75 dans les cancers de type canalaire,
- une corrélation inverse entre TrkA et le grade histopronostique,
- une expression préférentielle de TrkA et p75 dans les cancers exprimant les récepteurs de la progestérone et les cancers bien différenciés,
- la valeur pronostique de TrkA, avec une survie plus longue chez les patientes exprimant beaucoup de récepteurs TrkA.

## *Conclusion générale*

---

Les résultats des travaux présentés dans cette thèse montrent pour la première fois que :

- Le NGF est un facteur mitogène puissant pour les cellules de cancer du sein. En effet, il stimule la prolifération de toutes les lignées cancéreuses mammaires que nous avons étudiées. Cet effet est spécifique des lignées cancéreuses puisque le NGF ne stimule pas la prolifération des cellules épithéliales mammaire normale issues de mammoplastie. Nous avons également démontré que ce facteur a une activité anti-apoptotique sur les cellules de cancer du sein. Nos résultats permettent donc de penser que le NGF régule le développement des tumeurs du sein en favorisant la croissance cellulaire par la stimulation de la prolifération et de la survie .
- Il existe une dichotomie des voies de signalisation empruntées par le NGF pour assurer ces deux activités. En effet, la stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses par le NGF implique l'activation de son récepteur tyrosine kinase TrkA et de la voie des MAP-kinases, indépendamment de p75. Au contraire, l'effet anti-apoptotique du NGF passe par p75 et l'activation du facteur de transcription NF-κB sans intervention de TrkA (figure 14). Ces deux voies de transduction du NGF semblent donc être bien distinctes. A notre connaissance, c'est la première fois qu'il a été montré que le NGF est capable de stimuler ses deux récepteurs pour aboutir à deux effets biologiques différents et ceci dans des types cellulaires exprimant naturellement et simultanément TrkA et p75.
- Les récepteurs TrkA possèdent une valeur pronostique dans le cancer du sein. Les analyses statistiques ont montré une corrélation entre l'expression de TrkA et celle de p75. p75 est plus exprimé dans les tumeurs de type canalaire et TrkA est négativement corrélé au grade histopronostique. TrkA et p75 sont également positivement corrélés aux récepteurs de la progestérone. Enfin, nous avons montré que TrkA est aussi un facteur pronostique avec une forte expression de ses ARNm associée à une survie plus longue des patientes.

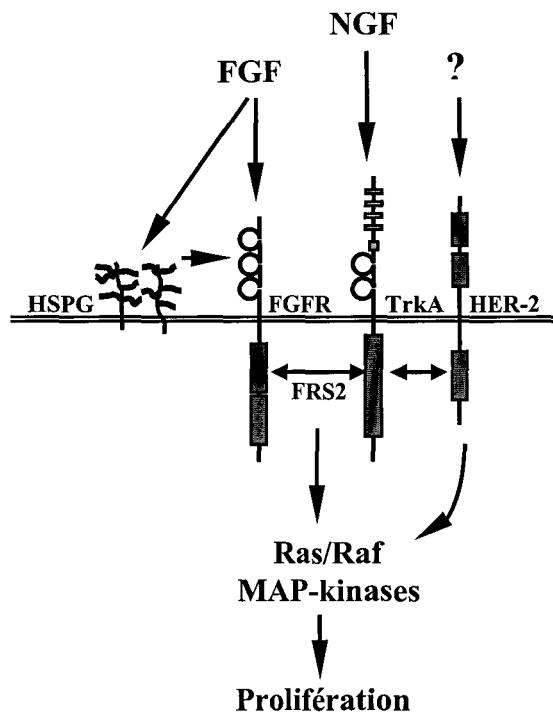


**Figure 14 :** Les deux voies de la signalisation intracellulaire du NGF dans les cellules de cancer du sein.

L'ensemble de nos résultats contribue à améliorer la compréhension des mécanismes de régulation de la croissance des cellules de cancer du sein et ouvre de nouvelles perspectives pour le pronostic et le traitement de cette pathologie.

L'activation de la voie Ras/Raf/MAP-kinases est essentielle à l'activité du NGF. Cependant, cette activité semble pouvoir être modulée par d'autres molécules n'appartenant pas à la cascade décrite pour TrkA. C'est le cas du récepteur p185<sup>HER-2</sup> qui semble pouvoir être activé par simple interaction avec TrkA en présence de NGF dans deux lignées de cancer du sein (Tagliabue *et al.*, 2000). L'effet mitogène du NGF est inhibé par la transfection des cellules avec un plasmide codant pour un anticorps anti-p185<sup>HER-2</sup>. Nous ne savons cependant pas si cette inhibition a lieu dans toutes les lignées et en particulier dans celles sur lesquelles nous avons travaillé, car cette étude a été réalisée notamment sur la lignée SKBr3 qui surexprime erb-B2. Sachant que les récepteurs de facteurs de croissance exprimés en grande quantité ont tendance à s'associer, on peut penser que cette activation de p185<sup>HER-2</sup> ne soit pas complètement spécifique au NGF et l'hypothèse d'une activation de p185<sup>HER-2</sup> par d'autres facteurs comme par exemple le fibroblast growth factor (FGF) ne peut être exclue.

En ce qui concerne les interactions entre TrkA et d'autres récepteurs de facteurs de croissance, il est possible que les effets du NGF soit modulés par le FGF. Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que les effets du FGF-2 médiés par son récepteur tyrosine kinase sont modulés par la nature et la quantité de ses sites de liaison de basse affinité, les protéoglycannes sulfatés (Delehedde *et al.*, 1996). Les variations d'expression des récepteurs de facteurs de croissance pourrait ainsi moduler l'activité de l'un de ces facteurs et expliquer les différences de sensibilité observées d'un type cellulaire à un autre. D'autre part, l'activation des récepteurs du NGF et du FGF par leur ligands respectifs conduit à la liaison et à la phosphorylation de FRS2 (Kouhara *et al.*, 1997). Certaines lignées de cancer du sein comme les MDA-MB-231 sont insensibles au FGF mais stimulées par le NGF. Les deux récepteurs ayant un même substrat, il n'est pas exclu que l'interaction de FRS2 avec l'un puisse moduler la signalisation de l'autre. D'autre part, comme FRS2 entre en compétition avec Shc pour se lier à TrkA (Meakin *et al.*, 1999), le FGF pourrait également moduler l'action du NGF en modifiant la nature des protéines interagissant avec TrkA. Il reste cependant à mettre en évidence les conséquences de ce possible cross-talk sur la croissance (figure 15).



**Figure 15 :** Cross-talk entre facteurs mitogènes dans les cellules de cancer du sein.  
(HSPG : heparan sulfate proteoglycan).

Dans le cas du récepteur p75, nous avons montré que la liaison du NGF conduisait aussi à l'activation de NF-κB. Cependant, les molécules de la cascade de transduction qui se situe entre p75 et NF-κB restent à préciser dans notre modèle. Les membres de la famille TRAF (TNF receptor-associated factor) ont récemment été décrits comme étant capables d'activer (TRAF2 et TRAF6) ou d'inhiber (TRAF4) NF-κB (Leo *et al.*, 1999). Des plasmides codant pour les formes sauvages et des dominants-négatifs de ces molécules sont à notre disposition et des transfections réalisées avec ces outils devraient permettre de mettre en évidence leur implication dans la signalisation p75/NF-κB dans notre modèle.

Dans notre étude, nous avons quantifié l'expression des récepteurs du NGF dans les cancers du sein. Ces récepteurs sont activés en présence de leur ligand, mais nous ne savons

pas encore quelle est la disponibilité du NGF au niveau de la tumeur. Wright et Gaull (1983) ont montré la présence de NGF dans le lait humain et on retrouve également le NGF dans le sein autour des implants mammaires (Lossing et Hansson, 1992) ainsi que dans le sang (Bonini et al., 1996). Récemment, nous avons adapté la technique de RT-PCR quantitative en temps réel au NGF et cela permet d'envisager l'utilisation de cette technologie pour approfondir les études sur de grandes séries de biopsies. L'étude quantitative de l'expression du NGF dans les tumeurs elles-mêmes devrait permettre de mieux comprendre les corrélations observées entre les récepteurs et le type de tumeur et de savoir si le NGF est produit par la tumeur elle-même et peut stimuler sa croissance de manière autocrine. Nous avons observé la production de NGF par des lignées de cellules épithéliales mammaires, ce qui va dans le sens de cette dernière hypothèse. Cette analyse pourrait d'autre part être utilement complétée par une mesure du NGF circulant dans le sérum des patientes qui donnerait une idée plus précise de la disponibilité réelle en NGF.

Notre travail ouvre par ailleurs des perspectives pour le traitement du cancer du sein. En effet, l'inhibition pharmacologique de l'effet mitogène du NGF peut être envisagée avec l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des récepteurs tyrosine kinase de la famille Trk comme le K-252a. La sauvegarde des cellules cancéreuses par le NGF pourrait également être bloquée par des inhibiteurs spécifiques de p75 ou NF- $\kappa$ B. Nous avons montré que TrkA est un facteur pronostique dans le cancer du sein. Sa valeur pronostique n'est pas réellement suffisante pour remplacer des facteurs tels que le grade histopronostique, la taille de la tumeur ou l'envahissement ganglionnaire qui sont utilisés dans la pratique. Cependant, la connaissance du niveau d'expression du NGF et de ses récepteurs pourrait permettre d'orienter le choix du traitement. En effet, la suramine qui est utilisée pour limiter la prolifération des cellules cancéreuses peut à elle-seule activer TrkA (Gill et al., 1996). Il serait donc peut-être préférable de ne pas utiliser la suramine pour traiter des patientes exprimant ce récepteur. L'inhibition de l'activité du NGF pourrait également potentialiser les effets d'autres traitements. Elle permettrait d'augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses en agissant d'une manière différente. On peut par exemple imaginer de potentialiser un traitement par l'herceptine grâce au K-252a qui inhiberait la signalisation de p185<sup>HER-2</sup> par l'intermédiaire de TrkA.

En conclusion, nos travaux montrent l'implication d'une nouvelle molécule dans le cancer du sein. Ils permettent une meilleure compréhension des mécanismes de la croissance des cellules de cancer du sein et ouvrent des perspectives nouvelles pour le pronostic et le traitement de cette pathologie encore très meurrière. Ces résultats obtenus dans le cancer du sein pourraient être étendus à d'autres cancers épithéliaux dont les mécanismes de croissance sont mal connus et pour lesquels on ne dispose pas encore de traitement efficace, comme le cancer du colon.

## *Bibliographie*

---

- Aaronson, A. (1991). Growth factors and cancer. *Science* **254** : 1146-1152.
- Adnane, J., Gaudray, P., Dionne, C.A., Crumley, G., Jaye, M., Schlessinger, J., Jeanteur, P., Birnbaum, D., Theillet, C. (1991). BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene* **6** : 659-663.
- Alleva, E., Aloe, L., Bigi, S. (1993). An update role for nerve growth factor in neurobehavioural regulation of adult vertebrates. *Rev. Neurosci* **4** : 41-63.
- Aloe, L., Bracci-Laudiero, L., Alleva, E., Lambiase, A., Micera, A., Tirassa, P. (1994). Emotional stress induced by parachute jumping changes blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91** : 10440-10444.
- Aloe, L., Tuveri, M.A., Carcassi, U., Levi-Montalcini, R. (1992). Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. *Arthritis Rheum.* **35** : 351-355.
- Aloe, L. (1988) The effect of nerve growth factor and its antibody on mast cells *in vivo*. *J. Neuroimmunol.* **18** : 1-12.
- Aloe, L., Alleva, E., Böhm, A., Levi-Montalcini, R. (1986). Aggressive behaviour induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83** : 6184-6187.
- Aloe, L., Alleva, E., De Simone, R. (1990). Changes of NGF level in mouse hypothalamus following intermale aggressive behavior: biological and immunohistochemical evidence. *Behav. Brain Res.* **39** : 53-61.
- Aloe, L., Bracci-Laudiero, L., Bonini, S., Manni, L. (1997). The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy* **52** : 883-894.
- Aloe, L., Levi, M.R. (1979). Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells *in vivo* into sympathetic neurons: effect of antiserum to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76** : 1246-1250.
- Aloe, L., Levi-Montalcini, R. (1977). Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. *Brain Res.* **133** : 358-366.
- Aloe, L., Skaper, S.D., Leon, A., Levi-Montalcini, R. (1994). Nerve growth factor and autoimmune diseases. *Autoimmunity* **19** : 141-150.

- Altin, J.G., Kujubu, D.A., Raffioni, S., Eveleth, D.D., Herschman, H.R., Bradshaw, R.A. (1991). Differential induction of primary-response (TIS) genes in PC12 pheochromocytoma cells and the unresponsive variant PC12nnr5. *J. Biol. Chem.* **266** : 5401-5406.
- Anand, P. (1995). Nerve growth factor regulates nociception in human health and disease. *Br. J. Anaesth.* **75** : 201-208.
- and p75NGFR nerve growth factor receptors mediate nerve growth factor-stimulated calcium uptake. *J. Biol. Chem.* **272** : 6835-6837.
- Anderson, D.J., Axel, R. (1986). A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell* **47** : 1079-1090.
- Angeletti, R.H., Bradshaw, R.A. (1971). Nerve growth factor from mouse submaxillary gland : amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68** : 2417-2420.
- Anton, E.S., Weskamp, G., Reichardt, L.F., Matthew, W.D. (1994). Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Neurobiology* **91** : 2795-2799.
- Apfel, S.C., Arezzo, J.C., Brownlee, M., Federoff, H., Kessler, J.A. (1994). Nerve growth factor administration protects against experimental diabeticsensory neuropathy. *Brain Res.* **634** : 7-12.
- Arteaga, C.L., Tandon, A.K., Von Hoff, D.D., Osborne, C.K. (1988). Transforming growth factor  $\beta$  : potential autocrine growth inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Cancer Res.* **48** : 3898-3904.
- Baker, S.B., Reddy, E.P. (1998). Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* **17** : 3261-3270.
- Barbacid, M. (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* **25** : 1386-1403.
- Barde, Y. (1989). Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* **2** : 1525-1534.
- Barker, P.A. (1998). P75<sup>NTR</sup> : A study in contrasts. *Cell Death Diff.* **5** : 346-356.
- Barker, P.A., Lomen-Hoerth, C., Gensch, E.M., Meakin, S.O., Glass, D.J., Shooter, E.M. (1993). Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkB receptor. *J. Biol. Chem.* **268** : 15150-15157.
- Barker, P.A., Murphy, R.A. (1992). The nerve growth factor receptor : a multicomponent system that mediates the actions of the neurotrophin family of proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **110** : 1-15.

- **Barker, P.A., Shooter, E.M.** (1994). Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75<sup>LNTR</sup> reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* **13** : 203-215.
- **Barker, P.A., Zeindler, C., Kryl, D., Lahance, C.** (1995). A cytoplasmic homology between p75LNTR, TNF-R1 and fas may define analogous functional domains. *Annual Meeting of the Society for Neuroscience* (Abstr.).
- **Barkett, M., Gilmore, T.D.** (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene* **18** : 6910-6924.
- **Basu, T., Warne, P.H., Downward, J.** (1994). Role of Shc in the activation of Ras in response to epidermal growth factor and nerve growth factor. *Oncogene* **9** : 3483-3491.
- **Bates, S.E., Davidson, E., Valverius, E.M., Freter, C.E., Dickson, R.B., Tam, J.P., Kudlow, J.E., Lippman, M.E., Salomon, D.S.** (1988). Expression of transforming growth factor  $\alpha$  and its messenger ribonucleic acid in human breast cancer : its regulation by estrogen and its possible functional significance. *Mol. Endocrinol.* **2** : 543-555.
- **Bates, S.E., Valverius, E.M., Ennis, B.W., Bronzert, D.A., Sheridan, J.P., Stampfer, M.R., Mendelsohn, J., Lippman, M.E., Dickson, R.B.** (1990). Expression of the transforming growth factor-a/epidermal growth factor receptor pathway in normal human breast epithelial cells. *Endocrinology* **126** : 596-607.
- **Bax, Blundell, Murray-Rust, McDonald** (1997). Structure of mouse 7S NGF : a complex of nerve growth factor with four binding proteins. *Structure* **5** : 1275-1285.
- **Berg, M.M., Sternberg, D.W., Hempstead, B.L., Chao, M.V.** (1991). The low-affinity p75 nerve growth factor (NGF) receptor mediates NGF-induced tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88** : 7106-7110.
- **Berkemeier, L.R., Winslow, J.W., Kaplan, D.R., Nikolics, K., Goeddel, D.V., Rosenthal, A.** (1991). Neurotrophin-5 : a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* **7** : 857-866.
- **Berns, E.M.J.J., Klijn, J.G.M., Van Putten, W.L.J., Van Staveren, I.L., Portengen, H., Foekens, J.A.** (1992). C-myc amplification is a better prognostic factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.* **52** : 1107-1113.
- **Berx, G., Nollet, F., Van Roy, F.** (1998). Dysregulation of the E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell Adhes. Commun.* **6** : 171-184.

- **Bibel, M., Hoppe, E., Barde, Y.-A.** (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors *trk* and p75<sup>NTR</sup>. *EMBO J.* **18** : 616-622.
- **Bièche, I., Onody, P., Laurendeau, I., Olivi, M., Vidaud, D., Lidereau, R., and Vidaud, M.** (1999). Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clinical Chemistry* **45** : 1148-1156.
- **Bilberback, T.R., Grigsby, R.J., Dobrowsky, R.T.** (1997). Association of p75NTR with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolisis to caveolae. *J. Biol. Chem.* **272** : 10922-10927.
- **Bischoff, S.C., Dahinden, C.A.** (1992). Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood* **79** : 2662-2669.
- **Bocchini, G., Angeletti, P.U.** (1996). The nerve growth factor : purification as a 30.000 molecular weight protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **64** : 787-794.
- **Bonini, S., Lambiase, A., Bonini, S., Angelucci, F., Magrini, L., Manni, L., Aloe, L.** (1996). Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** : 10955-10960.
- **Bono, F., Lamarche, I., Bornia, J., Savi, P., Della Valle, G., Herbert, J.M.** (1999). Nerve growth factor (NGF) exerts its pro-apoptotic effect via the p75NTR receptor in a cell cycle-dependent manner. *FEBS Lett.* **457** : 93-97.
- **Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., Yancopoulos, G.D.** (1991). ERKs : a family of protein-serine-threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65** : 663-675.
- **Bradshaw, R.A., Hondermarck, H.** (1996). Nerve growth factor receptors. *Biomembranes* **6** : 177-196.
- **Bradshaw, R.A., Murray-Rust, J., Ibanez, C.F., McDonald, N.Q., Lapatto, R., Blundell, T.L.** (1994). Nerve growth factor : structure/function relationships. *Protein Sci.* **3** : 1901-1913.
- **Brodie, C., Gelfand, E.W.** (1992). Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J. Immunol.* **148** : 3492-3497.
- **Brodie, C., Gelfand, E.W.** (1994). Regulation of immunoglobulin production by nerve growth factor : comparison with anti-CD40. *J. Neuroimmunol.* **52** : 87-96.

- Brodie, C., Oshiba, A., Renz, H., Bradley, K., Gelfand, E.W. (1996). Nerve growth factor and anti-CD40 provide opposite signals for the production of IgE in interleukin-4-treated lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **26** : 171-178.
- Bronzert, D.A., Pantazis, P., Antoniades, H.N., Kasid, A., Davidson, N., Dickson, R.B., Lippman, M.E. (1987). Synthesis and secretion of PDGF-like growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **84** : 5763-5767.
- Camoratto, A.M., Jani, J.P., Angeles, T.S., Maroney, A.C., Sanders, C.Y., Murakata, C., Neff, N.T., Vaught, J.L., Isaacs, J.T., Dionne, C.A. (1997). CEP-751 inhibits Trk receptor tyrosine kinase activity *in vitro* and exhibits anti-tumor activity. *Int. J. Cancer* **72** : 673-679.
- Carpentier, G., Wahl, M.I. (1990). The epidermal growth factor family. In *Peptide growth factors and their receptors*, Vol I, SPORN M.B. and ROBERTS A.B. ed., Springer Verlag Berlin Heidelberg pp. 69-133.
- Carter, B.D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhäuser, N., Böhm-Baeuerle, P.A., Barde, Y.-A. (1996). Selective activation of NF-κB by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* **272** : 542-545.
- Casaccia-Bonelli, P., Carter, B.D., Dobrowsky, R.T., Chao, M.V. (1996). Death of oligodendrocytes mediated by interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* **383** : 716-719.
- Casademunt, E., Carter, B.D., Benzel, I., Frade, J.M., Dechant, G., Barde, Y.-A. (1999). The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75NTR and participates in programmed cell death. *EMBO J.* **18** : 6050-6061.
- Casademunt, E., Carter, B.D., Benzel, I., Frade, J.M., Dechant, G., Barde, Y.-A. (1999). The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> and participates in programmed cell death. *EMBO J.* **18** : 6050-6061.
- Chao, M.V. (1992). Neurotrophin receptors : a window into neuronal differentiation. *Neuron* **9** : 583-593.
- Chao, M.V. (1995). Ceramide : a potential second messenger in the nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* **6** : 91-
- Chao, M.V., Hempstead, B.L. (1995). p75 and Trk : a two receptor system. *Trends Neurosci.* **19** : 321-326.

- **Chen, F.E., Ghosh, G.** (1999). Regulation of DNA binding by Rel/NF-κB transcription factors : structural views. *Oncogene* **18** : 6845-6852.
- **Chen, K.S., Gage, F.H.** (1995). Somatic gene transfer of NGF to the aged brain : behavioral and morphological amelioration. *J. Neurosci.* **15** : 2819-2825.
- **Chen, K.S., Nishimura, M.C., Armanini, M.P., Crowley, C., Spencer, S.D., Phillips, H.S.** (1997). Disruption of a single allele of the nerve growth factor gene results in atrophy of basal forebrain cholinergic neurons and memory deficits. *J. Neurosci.* **17** : 7288-7296.
- **Cimino, M., Cattabeni, F., Di Luca, M., Peruzzi, G., Andena, M., Tirassa, P., Angelucci, F., Cozzaric, C., Aloe, L.** (1996). Levels of NGF, p75 NGFR and ChAT immunoreactivity in brain of adult and aged microencephalic rats. *Neurobiol. Aging* **17** : 137-142.
- **Cox, D.R.** (1972). Regression models and lifetables. *J. R. Stat. Soc. U.* **34** : 187-200.
- **Coyle, J.T., Price, D.L., De Long, M.R.** (1983). Alzheimer's disease : a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* **219** : 1184-1190.
- **Cramer, P., Müller, C.** (1999). A firm hand on NF-κB : structures of the IκBα-NF-κB complex. *Structure* **7** : R1-R6.
- **Crowder, R.J., Freeman, R.S.** (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **18** : 2933-2943.
- **Crowley, C., Spencer, S.D., Nishimura, M.C., Chen, K.S., Pitts-Meek, S., Armanini, M.P., Ling, L.H., McMahon, S.B., Shelton, D.L., Levinson, A.D., Phillips, H.S.** (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* **76** : 1001-1011.
- **Cunningham, M.E., Greene, L.A.** (1998). A function-structure model for NGF-activated TRK. *EMBO J.* **17** : 7282-7293.
- **Cunningham, M.E., Stephens, R.M., Kaplan, D.R., Greene, L.A.** (1997). Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **272** : 10957-10967.
- **Davies, A.M.** (2000). Neurotrophins : neurotrophic modulation of neurite growth. *Curr. Biol.* **10** :R198-R200.
- **Davies, A.M., Bandtlow, C., Neumann, R., Korschning, S., Rohrer, H., Thoenen, H.** (1987). Timing and site of nerve growth factor and its mRNA in the rat hippocampus : comparison with choline acetyltransferase. *Nature* **326** : 353-358.

- **Davis, R.J.** (1993). The mitogen-Activated Protein kinase signal transduction Pathway. *J. Biol. Chem.* **268** : 14553-14556.
- **Dbaibo, G.S., Obeid, L.M., Hannun, Y.A.** (1993). Tumor necrosis factor-a (TNF-a) signal transduction through ceramide. Dissociation of growth inhibitory effects of TNF-a from activation of nuclear factor-kB. *J. Biol. Chem.* **268** : 17762-17766.
- **De Bernardi, M.A., Rabin, S.J., Colangelo, A.M., Brooker, G., Mocchetti, I.** (1996). TrkA mediates the nerve growth factor-induced intracellular calcium accumulation. *J. Biol. Chem.* **271** : 6092-6098.
- **De la Coste, A., Perret, C.** (1997). Bad est-elle la protéine cible des facteurs de survie ? *Med. Sci.* **13** : 384-386.
- **De Vicente, J.C., Garcia-Suarez, O., Esteban, I., Santamaria J., Vega, J.A.** (1998). Immunohistochemical localization of neurotrophins and neurotrophin receptors in human and mouse salivary glands. *Anat. Anz.* **180** : 157-163.
- **Dechant, G., Biffo, S., Okazawa, H., Kolbeck, R., Pottgiesser, J., Barde, Y.A.,** (1993). Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB. *Development* **119** : 545-558.
- **Dechant, G., Tsoufas, P., Parada, L.E., Barde, Y.A.** (1997). The neurotrophin receptor p75 binds neurotrophin-3 on sympathetic neurons with high affinity and specificity. *J. Neurosci.* **17** : 5271-5287.
- **Deckwerth, T.L., Johnson, Jr.E.M.** (1993). Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. *J. Cell Biol.* **123** : 1207-1222.
- **Delehedde, M., Deudon, E., Boilly, B., Hondermarck, H.** (1996). Heparan sulfate proteoglycans play a dual role in regulating fibroblast growth factor-2 mitogenic activity in human breast cancer cells. *Exp. Cell. Res.* **229** : 398-406.
- **Dent, P., Haser, W., Haystead, T.A., Vincent, L.A., Roberts, T.M., Sturgill, T.W.** (1992). Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH-3T3 cells and *in vitro*. *Science* **257** : 1404-1407.
- **DePlacido, S., Gallo, C., Perrone, R., Marinelli, A., Pagliarado, C., Carlomagno, C., Petrella, G., D'Istria, M., Decrio, G., Bianco, A.R.** (1990). Prolactin receptors does not correlate with estradiol and progesterone receptors in primary breast cancer and lacks prognostic significance. Ten years results of the naple adjuvant (GUN) study. *Br. J. Cancer* **62** : 643-646.

- Derynck, R. (1988). Transforming growth factor- $\alpha$ . *Cell* **54** : 593-595.
- Di Marco, E., Marchioso, P.C., Bondanza, S., Franzi, A.T., Cancedda, R., De Luca, M. (1991). Growth-regulated synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **266** : 21718-21722.
- Di Marco, E., Mathor, M., Bondanza, S., Cutuli, N., Marchisio, P.C., Cancedda, R., De Luca, M. (1993). Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. *J. Biol. Chem.* **268** : 22838-22846.
- Dickens, G., Lavarreda, M., Zheng, W.-H., Guroff, G. (1997). Involvement of protein kinase C in nerve growth factor- and K-252a-stimulated calcium uptake into PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **47** : 271-276.
- Dickson, R.B. (1990). Stimulatory and inhibitory growth factors in breast cancer. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **37** : 795.
- Dickson, R.B., Johnson, M.D., Bano, M., Shi, E., Kurebayashi, J., Ziff, B., Martinez-Lacaci, I., Amundadottir, L.T., Lippman, M.E. (1992). Growth factors in breast cancer : mitogenesis to transformation. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **43** : 69-78.
- Dikic, I., Batzer, A.G., Blaikie, P., Obermeier, A., Ullrich, A., Schlessinger, J., Margolis, B. (1995). Shc binding to nerve growth factor receptor is mediated by the phosphotyrosine interaction domain. *J. Biol. Chem.* **270** : 15125-15129.
- Dissen, G.A., Hill, D.F., Costa, M.E., Dees, W.L., Lara, H.E., Ojeda, S.R. (1996a). A role for *trkA* nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology* **137** : 198-209.
- Dissen, G.A., Mayerhofer, A., Ojeda, S.R. (1996c). Participation of nerve growth factor in the regulation of ovarian function. *Zygote* **4** : 309-312.
- Dissen, G.A., Mayerhofer, A., Parrot, J.A., Hill, D.F., Skinner, M.K., Ojeda, S.R. (1996b). Neurotrophins and ovarian function : activation of *trkA* receptors causes periovulatory-like changes in thecal activity. In *Proceedings of the Tenth International Congress on Endocrinology*, p.578 (abstract).
- Djakiew, D., Delsite, R., Pflug, B., Wrathall, J., Lynch, J., Onoda, M. (1991). Regulation of growth by a nerve growth factor-like protein which modulates paracrine interactions between a neoplastic epithelial cell line and stromal cells of the human prostate. *Cancer Res.* **51** : 3304-3310.

- Djakiew, D., Pflug, B.R., Delsite, R., Onoda, M., Lynch, J.H., Arand, G., Thompson, E.W. (1993). Chemotaxis and chemokinesis of human prostate tumor cell lines in response to human prostate stromal cell secretory proteins containing a nerve growth factor-like protein. *Cancer Res.* **53** : 1416-1420.
- Dobrowsky, R.T., Jenkins, G.M., Hannun, Y.A. (1995). Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75<sup>NTR</sup> with Trk Receptors. *J. Biol. Chem.* **270** : 22135-22142.
- Dobrowsky, R.T., Werner, M.W., Castellino, A.M., Chap, M.V., Hannun, Y.A. (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* **265** : 1596-1599.
- Dong-Lebourhis, X., Berthois, Y., Millot, G., Degeorges, A., Sylvi, M., Martin, P.M., and Calvo, F. (1997). Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in co-culture. *Int. J. Cancer* **71**, 42-48
- Donnerer, J., Schuligoi, R., Stein, C. (1992). Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissues : evidence for a regulatory function of nerve growth factor *in vivo*. *Neurosci.* **49** : 693-698.
- Donovan, S.M., Odle, J. (1994). Growth factors in milk as mediators of infant development. *Ann. Rev. Nutr.* **14** : 147-167.
- Drinkwater, C.C., Barker, P.A., Suter, U., Shooter, E.M. (1993). The carboxyl terminus of nerve growth factor is required for biological activity. *J. Biol. Chem.* **268** : 23202-23207.
- Drinkwater, C.C., Evans, B.A., Richards, R.I. (1988). Kallikreins, kinins and growth factor biosynthesis. *TIBS* **13** : 169-172.
- Durbec, P., Marcos, G.C., Kilkenny, C., Grigoriou, M., Wartiovaara, K., Suvanto, P., Smith, D. (1996). GDNF signaling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* **381** : 789-793.
- Easton, J.B., Moody, N.M., Zhu, X., Middlemas, D.S. (1999). Brain-derived neurotrophic factor induces phosphorylation of fibroblast growth factor receptor substrate 2. *J. Biol. Chem.* **274** : 11321-11327.
- Ehrhard, P.B., Ganter, U., Bauer, J., Otten, U. (1993). Expression of functional trk proto-oncogene in human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** : 5423-5427.

- **Ehrhard, P.B., Otten, U.** (1994). Postnatal ontogeny of the neurotrophin receptors trk and trkB mRNA in rat sensory and sympathetic ganglia. *Neurosci. Lett.* **166** : 207-210.
- **Eide, F.F., Lowenstein, D.H., Reichardt, L.F.** (1993). Neurotrophins and their receptors – current concepts and implications for neurologic disease. *Exp. Neurol.* **121** : 200-214.
- **Ervin, P.R.J., Kaminski, M.S., Cody, R.L., Wicha, M.S.** (1989). Production of mammastatin, a tissue-specific growth inhibitor, by normal human mammary cells. *Science* **244** : 1585-1587.
- **Espie, M., Gorins, A.** (1995). Le sein. Editions Eska, Paris.
- **Fagan, A.M., Garber, M., Barbacid, M., Silos-Santiago, I., Holtzman, D.M.** (1997). A role for TrkA during maturation of striatal and basal forebrain cholinergic neurons in vivo. *J. Neurosci.* **17** : 7644-7654.
- **Fantini, F., Johansson, O.** (1992). Expression of growth associated protein 43 and nerve growth factor receptor in human skin : a comparative immunohistochemical investigation. *J. Invest. Dermatol.* **99** : 734-742.
- **Feinstein, D., Larhammar, D.** (1990). Identification of a conserved protein motif in a group of growth factor receptors. *FEBS Lett.* **272** : 7-11.
- **Feinstein, E., Kimchi, A., Wallach, D., Boldin, M., Varfolomeev, E.** (1995). The death domain : a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends in Biochemical Sciences* **20** : 324-344.
- **Ferrari, G., Anderson, B.L., Stephens, R.M., Kaplan, D.R., Greene, L.A.** (1995). Prevention of apoptotic neuronal death by GM1 ganglioside. Involvement of Trk neurotrophin receptor. *J. Biol. Chem.* **270** : 3074-3080.
- **Fisher, W., Wiktorin, K., Björklund, A., Williams, L.R., Varon, S., Gage, F.H.** (1987). Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* **329** : 65-68.
- **Folkman, J.** (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent ? *J. Natl. Cancer Inst.* **82** : 1-5.
- **Francke, U., De Martinville, B., Coussen, L., Ullrich, A.** (1983). The human gene for the beta subunit of nerve growth factor is located on the proximal short arm of chromosome 1. *Science* **222** : 1248-1251.
- **Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C.** (1997). PI3K : Downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88** : 435-437.

- **Franz, T.** (1990). Defective ensheathment of motoric nerves in the Splotch mutant mouse. *Acta Anat.* **138** : 246-253.
- **Frierson, H.F., Gaffey, M.J., Zukerberg, L.R., Arnold, A., Wiliams, M.E.** (1996). Immunohistochemical detection and gene amplification of cyclin D1 in mammary infiltrating carcinoma. *Mol. Pathol.* **9** : 725-730.
- **Ganju, P., O'Bryan, J.P., Der, C., Winter, J., James, I.F.** (1998). Differential regulation of SHC proteins by nerve growth factor in sensory neurons and PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* **10** : 1995-2008.
- **Garaci, E., Caroleo, M.C., Aloe, L., Aquaro, S., Piacentini, M., Costa, N., Amendola, A., Micera, A., Calio, R., Perno, C.-F., Levi-Montalcini, R.** (1999). Nerve growth factor is an autocrine factor essential for the survival of macrophages infected with HIV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96** : 14013-14018.
- **Geldof, A.A., De Kleijn, M.A.T., Rao, B.R., Newling, D.W.W.** (1997). Nerve growth factor stimulates in vitro invasive capacity of DU145 human prostatic cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **123** : 107-112.
- **Gentry, J.J., Casaccia-Bonelli, P., Carter, B.D.** (2000). Nerve growth factor activation of nuclear factor kB through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J. Biol. Chem.* **275** : 7558-7565.
- **Gill, J.S., Connolly, D.C., McManus, M.J., Maihle, N.J., Windbank, A.J.** (1996). Suramin induces phosphorylation of the high affinity nerve growth factor receptor in PC12 cells and dorsal root ganglia neurons. *J. Neurochem.* **66** : 963-972.
- **Goldsmith, B.A., Koizumi, S.** (1997). Transient association of the phosphotyrosine phosphatase SHP-2 with TrkA is induced by nerve growth factor. *J. Neurochem.* **69** : 1014-1019.
- **Gotz, R., Koster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Schartl, M., Thoenen, H.** (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* **372** : 266-269.
- **Gotz, R., Schartl, M.** (1994). The conservation of neurotrophic factors during vertebrate evolution. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **108** : 1-10.
- **Graham, C.W., Lynch, J.H., Djakiew, D.** (1992). Distribution of nerve growth factor-like protein and nerve growth factor receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma. *J. Urol.* **147** : 1444-1447.

- **Greenberg, M.E., Greene, L.A., Ziff, E.B.** (1985). Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **260** : 14101-14110.
- **Gregory, H., Thomas, C.E., Willshire, I.R., Young, J.A., Anderson, H., Baldam, A., and Howell, A.** (1989). Epidermal and transforming growth factor alpha in patients with breast tumors. *Brit. J. Cancer* **59** : 605-609.
- **Grueters, A., Lakshmanan, J., Tarris, R., Alm, J., Fisher, A.** (1985). Nerve growth factor in mouse milk during early lactation : lack of dependency on submandibular salivary gland. *Pediatr. Res.* **19** : 934-937.
- **Gudat, F., Laubscher, A., Otten, U., Pletscher, A.** (1981). Shape changes induced by biologically active peptides and nerve growth factor in blood platelets of rabbits. *Br. J. Pharmacol.* **74** : 533-538
- **Haegerstrand, A., Jonzon, B., Dalsgaard, C.J., Nilsson, J.** (1989). Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86** : 5993-5996.
- **Hamada, A., Watanabe, N., Ohtomo, H., Matsuda, H.** (1996). Nerve growth factor enhances survival and cytotoxic activity of human eosinophils. *Brit. J. Haematol.* **93** : 299-302.
- **Hannun, Y.A., Obeid, L.M.** (1995). Ceramide : an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* **20** : 73-77.
- **Hantzopoulos, P.A., Suri, C., Glass, D.J., Goldfarb, M.P., Yancopoulos, G.D.** (1994). The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophin. *Neuron* **13** : 187-207.
- **Harel, L.** (1996). Les propriétés multiples de liaison des IGF (Insulin-like growth factor) : inhibiteurs et activateurs de la croissance. *Med. Sci.* **12** : 359-363.
- **Heimann, R., Lan, F., McBride, R., Hellman, S.** (2000). Separating from unfavorable prognostic markers in breast cancer : the role of E-Cadherin. *Cancer Res.* **60** : 298-304.
- **Hempstead, B.L., Rabin, S.J., Kaplan, L., Reid, S., Parada, L.F., Kaplan, D.R.** (1992). Overexpression of the trk tyrosine kinase rapidly accelerates nerve growth factor-induced differentiation. *Neuron* **9** : 883-896.

- **Herrmann, J.L., Beham, A.W., Sarkiss, M., Chiao, P.J., Rands, M.T., Bruckheimer, E.M., Brisbay, S., McDonnell, T.J.** (1997). Bcl-2 suppresses apoptosis resulting from disruption of the NF-κB survival pathway. *Exp. Cell Res.* **237**: 101-109
- **Herrmann, J.L., Menter, D.G., Hamada, J., Marchetti, D., Nakajima, M., Nicolson, G.L.** (1993). Mediation of NGF-stimulated extracellular matrix invasion by the human melanoma low-affinity p75 neurotrophin receptor : melanoma p75 functions independently of TrkA. *Mol. Biol. Cell* **4** : 1205-1216.
- **Heumann, R., Lindholm, D., Bandtlow, C., Meyer, M., Radeke, M.J., Misko, T.P., Shooter, E.M., Thoenen, H.** (1987). Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration : role of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84** : 8735-8739.
- **Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. et al.** (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, **11** : 1026-1030.
- **Hogue-Angeletti, R., Bradshaw, R.A.** (1971). Nerve growth factor from mouse submaxillary gland : amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68** : 2417-2420.
- **Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., Barde, Y.A.** (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* **344** : 339-341.
- **Holland, D.R., Cousens, L.S., Meng, W., Matthews, B.W.** (1994). Nerve growth factor in different crystal forms displays structural flexibility and reveals zinc binding sites. *J. Mol. Biol.* **239** : 385-400.
- **Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C.** (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253** : 49-53.
- **Holmes, W.E., Sliwkowski, M.X., Akita, R.W., Henzel, W.J., Lee, J., Park, J.W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G.D., Shepard, H.M., Kuang, W.J., Wood, W.I., Goeddel, D.V., Vandlen, R.L.** (1992). Identification of heregulin, a specific activator of p185 erbB2. *Science* **256** : 1205-1210.
- **Holtzman, D.M., Li, Y., Chen, K., Gage, F.H., Epstein, C.J., Mobley, W.C.** (1993). Nerve growth factor reverses neuronal atrophy in a Down's syndrome model of age-related neurodegeneration. *Neurology* **43** : 2668-2673.

- **Horigome, K., Bullock, E.D., Johnson, J.E.M.** (1994). Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells : survival promotion and immediate early gene induction. *J. Biol. Chem.* **269** : 2695-2702.
- **Hosobuchi, M., Stampfer, M.R.** (1989). Effect of TGF $\beta$  on growth of human mammary epithelial cells in culture. *In Vitro* **25** : 705-713.
- **Hosokawa, Y., Arnold, A.** (1998). Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells : analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes Cancer* **22** : 66-71.
- **Huber, L.J., Chao, M.V.** (1995). A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation. *J. Neurosci. Res.* **40** : 557-563.
- **Ibanez, C.F., Ebendal, T., Barbany, G., Murray-Rust, J., Blundell, T.L., Persson, H.** (1992). Disruption of the low affinity receptor-binding site in NGF allows neuronal survival and differentiation by binding to the trk gene product. *Cell* **69** : 329-341.
- **Ibanez, C.F., Ilag, L.L., Murray-Rust, J., Persson, H.** (1993). An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin. *EMBO J.* **12** : 2281-2293.
- **Ilag, L.L., Lonnerberg, P., Persson, H., Ibanez, C.F.** (1994). Role of variable beta-hairpin loop in determining biological specificities in neurotrophin family. *J. Biol. Chem.* **269** : 19941-19946.
- **Indo, Y., Tsuruta, M., Hayashida, Y., Karim, M.A., Ohta, K., Kawano, T., Mitsubuchi, H., Tonoki, H., Awaya, Y., Matsuda, I.** (1996). Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhydrosis. *Nature Genet.* **13** : 485-488.
- **Ip, M.M., Shoemaker, S.F., Darcy, K.M.** (1992). Regulation of rat mammary epithelial cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Endocrinology* **130** : 2833-2843.
- **Ip, N.Y., Stitt, T.N., Tapley, P., Klein, R., Glass, D.J., Fandl, J., Greene, L.A., Barbacid, M., Yancopoulos, G.D.** (1993). Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron* **10** : 137-149.
- **Irie, S., Hachiya, T., Rabizadeh, S., Maruyama, W., Mukai, J., Li, Y., Reed, J.C., Bredesen, D.E., Sato, T.-A.** (1999). Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75<sup>NTTR</sup> and their effect on NF- $\kappa$ B activation. *FEBS Lett.* **460** : 191-198.

- **Jarvis, W.D., Fornari, F.A., Browning, J.L., Gewirtz, D.A., Kolesnick, R.N., Grant, S.** (1994). Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglyceride in human myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **269** : 31685-31692.
- **Jiang, H., Ulme, D.S., Dickens, G., Chabuk, A., Lavarreda, M., Lazarovici, P., Guroff, G.** (1997). Both p140(trk) and p75(NGFR) nerve growth factor receptors mediate nerve growth factor-stimulated calcium uptake. *J. Biol. Chem.* **272** : 6835-6837.
- **Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P.L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R.** (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* **85** : 1113-1124.
- **Jing, S.Q., Tapley, P., Barbacid, M.** (1992). Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* **9** : 1067-1079.
- **Kahle, P., Burton, L.E., Schmelzer, C.H., Hertel, C.** (1992). The amino terminus of nerve growth factor is involved in the interaction with the receptor tyrosine kinase p140trkA. *J. Biol. Chem.* **267** : 22707-22710.
- **Kanaka-Gantenbein, C., Dicou, E., Czernichow, P., Scharfmann, R.** (1995). Presence of nerve growth factor and its receptors in an *in vitro* model of islet cell development implication in normal islet morphogenesis. *Endocrinology* **136** : 3154-3162.
- **Kanaka-Gantenbein, C., Tazi, C.A., Czernichow, P., Scharfmann, R.** (1995). *In vivo* presence of the high affinity nerve growth factor Trk-A in the rat pancreas : differential localization during pancreatic development. *Endocrinology* **136** : 761-769.
- **Kannan, Y., Usami, K., Okada, M., Shimizu, S., Matsuda, H.** (1992). Nerve growth factor suppresses apoptosis of murine neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186** : 1050-1056.
- **Kannan, Y., Ushio, H., Koyama, H., Okada, M., Oikawa, M., Yoshihara, T., Kaneko, M., Matsuda, H.** (1991). 2.5S nerve growth factor enhances survival, phagocytosis, and superoxide production of murine neutrophils. *Blood* **77** : 1320-1325.
- **Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V., Parada, L.F.** (1991). The trk proto-oncogene product : A signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* **252** : 554-558.
- **Kaplan, D.R., Stephens, R.M.** (1994). Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J. Neurobiol.* **25** : 1404-1417.

- **Karey, K.P., Sirbasku, D.A.** (1988). Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D to growth factors and 17 $\beta$ -estradiol. *Cancer Res.* **48** : 4083-4092.
- **Kawamoto, K., Okada, T., Kannan, Y., Ushio, H., Matsumoto, M., Matsuda, H.** (1995). Nerve growth factor prevents apoptosis of rat peritoneal mast cells through the trk proto-oncogene receptor. *Blood* **86** : 4638-4644.
- **Keles, G.E., Berger, M.S., Schofield, D., Bothwell, M.** (1993). Nerve growth factor receptor expression in medulloblastomas and the potential role of nerve growth factor as a differentiating agent in medulloblastom cell lines. *Neurosurgery* **32** : 274-280.
- **Kelly, P.A., Djiane, J., Boutin, J.M., Edery, M.** (1991). The prolactine-growth hormone receptor family. *Endocrine Rev.* **12** : 235-251.
- **Kern, F.G., McLeskey, S.W., Zhang, L., Kurebayashi, J., Liu, Y., Ding, L.Y.F., Kharbanda, S., Chen, D., Miller, D., Cullen, K., Paik, S., Dickson, R.B.** (1994). Transfected MCF-7 cells as a model for breast cancer progression. *Breast Cancer Res. Treat.* **31** : 153-165.
- **Khursigara, G., Orlinick, J.R., Chao, M.V.** (1999). Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J. Biol. Chem.* **274** : 2597-2600.
- **Klagsbrun, M., Baird, A.** (1991). A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity, *Cell* **67** : 229-231.
- **Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., Barbacid, M.** (1991). The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* **65** : 189-197.
- **Klein, R., Lamballe, F., Bryant, S., Barbacid, M.** (1992). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* **8** : 947-956.
- **Klijn, J.G.M., Berns, E.M.J.J., Schmitz, P.I.M., Foekens, J.A.** (1992). The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer : a review of 5232 patients. *Endocrine Reviews* **13** : 3-17.
- **Knabbe, C., Lippman, M.E., Wakefield, L.M., Flanders, K.C., Kasid, A., Deryck, R., Dickson, R.B.** (1990). Evidence that transforming growth factor-a is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* **48** : 417-428.
- **Knight, C.H., Peaker, M.** (1982). Development of the mammary gland. *J. Reprod. Fertil.* **65** : 521-536.
- **Kogner, P., Barbany, G., Dominici, C., Castello, M.A., Raschella, G., Persson, H.** (1993). Coexpression of messenger RNA for *trk* protooncogene and low affinity nerve

growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res.* **53** : 2044-2050.

- **Koizumi, H., Morita, M., Mikami, S., Shibayama, E., Uchikoshi, T.** (1998). Immunohistochemical analysis of TrkA neurotrophin receptor expression in human non-neuronal carcinomas. *Pathol. Int.* **48** : 93-101.
- **Kokunai, T., Sawa, H., Tamaki, N.** (1996). Functional analysis of trk proto-oncogene product in medulloblastoma cells. *Neurol. Med. Chir.* **36** : 796-804.
- **Korschning, S.** (1987). The role of NGF in the CNS. *Trends Neurosci.*, 1986 ; **9** : 570-573.
- **Korschning, S.** (1993). The neurotrophic factor concept : a reexamination. *J.Neurosci*, **13** : 2739-2748.
- **Kouhara, H., Hadari, Y.R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., Schlessinger, J.** (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* **89** : 693-702.
- **Kozak, A., Nikodijevic, B., Yavin, E, Guroff, G.** (1992). Intracellular calcium levels regulate the actions of nerve growth factor on calcium uptake in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **33** : 30-36.
- **Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C., Aaronson, S.A.** (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family : evidence for overexpression in a subject of human mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **86** : 9193-9197.
- **Kremer, N.E., D'Arcangelo, G., Thomas, S. M., DeMarco, M., Brugge, J.S., Halegoua, S.** (1991). Signal transduction by nerve growth factor and fibroblast growth factor in PC12 cells requires a sequence of src and ras actions. *J. Cell Biol.* **115** : 809-819.
- **Kujubu, D.A., Lim, R.W., Varnum, B.C., Herschman, H.R.** (1987). Induction of transiently expressed genes in PC12 pheochromocytoma cells. *Oncogene* **1** : 257-262.
- **Kurtz, A., Vogel, F., Funa, K., Heldin, C.H., Grosse, R.** (1990). Developmental regulation of mammary-derived growth inhibitor expression in bovine mammary tissue. *J. Cell Biol.* **110** : 1779-1789.
- **Lai, K.O., Fu, W.Y., Ip, F.C.F., Ip, N.Y.** (1998). Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from Carp. *Mol. Cell Neurosci.* **11** : 64-76.
- **Laurenzi, M.A., Barbany, G., Timmus, T., Lindgren, J.A., Persson, H.** (1994). Expression of mRNA encoding neurotrophins and neurotrophin receptors in rat thymus,

spleen tissue and immunocompetent cells. Regulation of neurotrophin-4 mRNA expression by mitogens and leukotriene B4. *Eur. J. Biochem.* **223** : 733-741.

- Lavenius, E., Gestblom, C., Johansson, I., Nanberg, E., Pahlman, S. (1995). Transfection of Trk-A into human neuroblastoma cells restores their ability to differentiate in response to nerve growth factor. *Cell Growth & Differ.* **6** : 727-736.
- Le Bourhis, X., Toillon, R.A., Boilly, B., Hondermarck, H. (2000). Autocrine and paracrine growth inhibitors of breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **1722** : 1-8.
- Lee, K.-F., Li, E., Huber, L.J., Landis, S.C., Sharpe, A.H., Chao, M.V., Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell* **69** : 737-749.
- Leibrock, J., Lottspeich, F.H., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., Barde, Y.A. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* **341** : 149-152.
- Levi-Montalcini, R., (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237** : 1154-1162.
- Lewin, G.R., Ritter, A.M., and Mendell, L.M. (1993). Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. *J. Neurosci.*, **13** : 2136-2148.
- Li, A.K.C., Koroly, M.J., Schattenkerk, M.E., Malt, R.A., Young, M. (1980). Nerve growth factor : acceleration of the rate of wound healing in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77** : 4379-4381.
- Li, A.K.C., Koroly, M.J., Schattenkerk, M.E., Malt, R.A., Young, M. (1980). Nerve growth factor: acceleration of the rate of wound healing in mice. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77** : 4379-4381.
- Liberini, P., Cuello, A.C. (1994). Effects of nerve growth factor in primate models of neurodegeneration : potential relevance in clinical neurology. *Rev. Neurosci.* **5** : 89-104.
- Liepinsh, E., Ilag, L.L., Otting, G., Ibanez, C.F. (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* **16** : 4999-5005.
- Lièvremont, J.P., Sciorati, C., Morandi, E., Paolucci, C., Bunone, G., Della-Valle, G., Meldolesi, J., Clementi, E. (1999). The p75<sup>NTR</sup>-induced apoptotic program develops through a ceramide-caspase pathway negatively regulated by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **274** : 15466-15472.

- **Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., Collins, F.** (1993). GDNF : a glia cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* **260** : 1130-1132.
- **Lin, Y.Z., Yao, S.Y., Veach, R.A., Torgerson, T.R., Hawiger, J.** (1995). Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J. Biol. Chem.* **270** : 14255-.
- **Lindsay, R.M., Harmar, A.J.** (1989). Nerve growth factor regulates expression of neuropeptides genes in adult sensory neurones. *Nature* **337** : 362-364.
- **Lindvall, O., Kokaia, Z., Bengzon, J., Elmér, E., Kokaia, M.** (1994). Neurotrophins and brain insults. *TINS* **17** : 490-496.
- **Lippman, M.E., Dickson, R.B.** (1989). Mechanisms of growth control in normal and malignant breast epithelium. *Recent Prog. Horm. Res.* **45** : 383-440.
- **Liu, J.P., Powell, K.A., Sudhof, T.C., Robinson, P.J.** (1994). Dynamin I is a Ca(2+)-sensitive phospholipid-binding protein with very high affinity for protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **269** : 21043-21050.
- **Lo, D.C.** (1995). Neurotrophic factors and synaptic plasticity. *Neuron* **15** : 979-981.
- **Loeb, D., Stephens, R., Copeland, T., Kaplan, D., Greene, L.** (1994). A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C-gamma 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **269** : 8901-8910.
- **Lossing, M.D., Hansson, H.A.** (1993). Peptide growth factors and myofibroblasts in capsules around human breast implants. *Plast. Reconstr. Surg.* **91** : 1277-1286
- **Mackay, D.J., Hall, A.** (1998). Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* **273** : 20685-20688.
- **MacPhee, I., Barker, P.A.** (1999). Extended ceramide exposure activates the trkA receptor by increasing receptor homodimer formation. *J. Neurochem.* **72** : 1423-1430.
- **Mahadeo, D., Kaplan, L., Chao, M.V., Hempstead, B.L.** (1994). High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J. Biol. Chem.* **269** : 6884-6891.
- **Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M., Yancopoulos, G.D.** (1990). Neurotrophin-3 : a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* **247** : 1446-1451.

- **Manning, P.T., Russel, J.H., Simmons, B., Johnson, E.M.** (1985) Protection from guanethdine-induced neuronal destruction by nerve growth factor : effects of NGF on immune function. *Brain Res.* **340** : 61-69.
- **Marchetti, D., Parikh, N., Sudol, M., Gallick, G.E.** (1998). Stimulation of the protein tyrosine kinase c-Yes but not c-Src by neurotrophins in human brain-metastatic melanoma cells. *Oncogene* **16** : 3253-3260.
- **Massague, J.** (1990). The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6** : 597-641.
- **Matsuda, H., Coughlin, M.D., Bienenstock, J., Denburg, J.A.** (1988). Nerve growth factor promotes human hemopoietic colony growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85** : 6508-6512.
- **Matsuda, H., Kannan, Y., Ushio, H., Kiso, Y., Kanemoto, T., Suzuki, H., Kitamura, Y.** (1991). Nerve growth factorinduces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J. Exp. Med.* **174** : 7-14.
- **Matsuda, M., Hashimoto, Y., Muroya, K., Hasegawa, H., Kurata, T., Tanaka, S., Nakamura, S., Hattori, S.** (1994). CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* **14** : 5495-5500.
- **Matsushima, H., Bogenmann, E.** (1993). Expression of trkA cDNA in neuroblastomas mediates differentiation *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **13** : 7447-7456.
- **Mazurek, N., Weskamp, G., Otten, U.** (1986). Nerve growth factor induces mast cell degranulation without changing intracellular calcium levels. *FEBS Lett.* **198** : 315-320.
- **McClure, S.J., Robinson, P.J.** (1996). Dynamin, endocytosis and intracellular signalling (review). *Mol. Membr. Biol.* **13** : 189-215.
- **McDonald, N.Q., Chao, M.V.** (1995). Structural determinants of neurotrophin action. *J. Biol. Chem.* **270** : 19669-19672.
- **McDonald, N.Q., Lapatto, R., Murray-Rust, J., Gunning, J., Wlodawer, A., Blundell, T.L.** (1991). New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* **354** : 411-414.
- **Meakin, S.O., MacDonald, J.I., Gryz, E.A., Kubu, C.J., Verdi, J.M.** (1999). The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA. A model for discriminating proliferation and differentiation. *J. Biol. Chem.* **274** : 9861-9870.

- **Mercurio, F., Manning, A.M.** (1999). NF-kB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* **18** : 6163-6171.
- **Middlemas, D.S., Lindberg, R.A., Hunter, T.** (1991). *trkB*, a neural receptor protein-tyrosine kinase : evidence for a full lenght and two truncated receptors. *Mol. Cell. Biol.* **11** : 143-153.
- **Miknyoczki, S.J., Klein-Szanto, A.J.P., Ruggeri, B.A.** (1996). Neurotrophin-Trk receptor interactions in neoplasia : a possible role in interstitial and perineural invasion in ductal pancreatic cancer. *Crit. Rev. Oncog.* **7** : 89-100.
- **Missale, C., Boroni, F., Sigala, S., Buriani, A., Fabris, M., Leon, A., Dal Toso, R., Spano, P.** (1996). Nerve growth factor in the anterior pituitary : localization in mammotroph cells and cosecretion with prolactin by a dopamine-regulated mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** : 4240-4245.
- **Mobley, W., Woo, J., Edwards, R., Riopelle, R., Longo, F., Weskamp, G., Otten, U., Valletta, J., Johnston, M.** (1989). Developmental regulation of nerve growth factor and its receptor in the rat caudate-putamen. *Neuron* **3** : 655-664.
- **Moodie, S.A., Willimsen, B.M., Weber, N.J., Wolfman, A.** (1993). Complexes of ras-GTP with raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* **260** : 1655-1661.
- **Müller, T., Kurtz, A., Vogel, F., Breter, H., Schneider, F., Angström, U., Mieth, M., Böhmer, F.D., Grosse, R.** (1989). A mammary-derived growth inhibitor (MDGI) related 70 kDa antigen identified in nuclei of mammary epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* **138** : 415-423.
- **Muller, Y., Clos, J.** (1997). P75LNTR : l'énigmatique récepteur des neurotrophines. *Med. Sci.* **13** : 978-986.
- **Muragaki, Y., Chou, T.T., Kaplan, D.R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.** (1997). Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrkA receptors. *J. Neurosci.* **17** : 530-542.
- **Muroya, K., Hattori, S., Nakamura, S.** (1992). Nerve growth factor induces rapid accumulation of the GTP-bound form of p21ras in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Oncogene* **7** : 277-281.
- **Murphy, L.J., Dubik, D., Bell, G.J., Stice, R.P.** (1988). Epidermal growth factor gene expression in human breast cancer cells : regulation of expression by progestins. *Cancer Res.* **48** : 4555-4560.

- **Mutoh, T., Tokuda, A., Inokuchi, J., Kuriyama, M.** (1998). Glucosylceramide synthase inhibitor inhibits the action of nerve growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **273** : 26001-26007.
- **Mutoh, T., Tokuda, A., Miyadai, T., Hamaguchi, M., Fujiki, N.** (1995). Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** : 5087-5091.
- **Nakagawara, A.** (1998). The NGF story and neuroblastoma. *Med. Pediatr. Oncol.* **31** : 113-115.
- **Nakagawara, A., Arima-Nakagawara, M., Scavarda, N.J., Azar, C.G., Cantor, A.B., Brodeur, G.M.** (1993). Association between high levels of expression of the *trk* gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* **328** : 847-854.
- **Nakamura, T., Muraoka, S., Sanokawa, R., Mori, N.** (1998). N-Shc and Sck, two neuronally expressed Shc adapter homologs. Their differential regional expression in the brain and roles in neurotrophin and Src signaling. *J. Biol. Chem.* **273** : 6960-6967.
- **Nass, S.J., Dickson, R.B.** (1997). Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* **44** : 1-22.
- **Nicoll, C.S., Bern, H.A.** (1972). In *Wolstenholme Gen and Knight (eds)*. "Lactogenic hormones", 1972, 299-327.
- **Nikodijevic, B., Guroff, G.** (1991). Nerve growth factor-induced increase in calcium uptake by PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **28** : 192-199.
- **Nikodijevic, B., Guroff, G.** (1992). Nerve growth factor-stimulated calcium uptake into PC12 cells : uniqueness of the channel and evidence for phosphorylation. *J. Neurosci. Res.* **31** : 591-599.
- **Nilsson, A.S., Fainzilber, M., Falck, P., Ibanez, C.F.** (1998). Neurotrophin-7 : a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett.* **424** : 285-290.
- **Noakes, P.G., Bennet, M.R.** (1987). Growth of axons into developing muscles of the chick forelimb is preceded by cells that stain with Schwann cell antibodies. *J. Comp. Neurol.* **259** : 330-347.
- **Noakes, P.G., Bennet, M.R., Stratford, J.** (1988). Migration of Schwann cells and axons into developing chick forelimb muscles following removal of either the neural tube or the neural crest. *J. Comp. Neurol.* **277** : 214-233.

- Obermeier, A., Bradshaw, R.A., Seedorf, K., Choidas, A., Schlessinger, J., Ullrich, A. (1994). Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *EMBO J.* **13** : 1585-1590.
- Obermeier, A., Lammers, R., Wiesmuller, K.H., Jung, G., Schlessinger, J., Ullrich, A. (1993). Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J. Biol. Chem.* **268** : 22963-22966.
- Oh, Y., Müller, H.L., Lamson, G., Rosenfeld, R.G. (1993). Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **268** : 14964-14971.
- Ohnishi, H., Yamada, M., Kubota, M., Hatanaka, H., Sano, S. (1999). Tyrosine phosphorylation and association of BIT with SHP-2 induced by neurotrophins. *J. Neurochem.* **72** : 1402-1408.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E., Lisanti, M.P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing « preassembled signaling complexes » at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273** : 5419-5422.
- Oppenheim, R.W. (1996). Neurotrophic survival molecules for motoneurons : an embarrassment of riches. *Neuron* **17** : 195-197.
- Orioli, D., Klein, R. (1997). The Eph receptor family : axonal guidance by contact repulsion. *Trends Genet.* **13** : 354-359.
- Osborne, C.K., Coronado, E.B., Kitten, L.J., Arteaga, C.I., Fuqua, S.A.W., Ramasharma, K., Marshall, M., Li, C.H. (1989). Insulin-like growth factor-II (IGF-II) : a potential autocrine/paracrine growth factor for human breast cancer acting via the IGF-I receptor. *Mol. Endocrinol.* **3** : 1701-1709.
- Oshima, M., Sithanandam, G., Rapp, U.R., Guroff, G. (1991). The phosphorylation and activation of B-Raf in PC12 cells stimulated by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **266** : 23753-23760.
- Otten, U., Baumann, J.B., Girard, J. (1979). Stimulation of the pituitary-adrenocortical axis by nerve growth factor. *Nature* **282** : 413-414.
- Otten, U., ehrhard, P., Peck, P. (1989). Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86** : 10059-10063.
- Oudard, S. (1997). Le cancer du sein : épidémiologie, anatomie pathologique, dépistage, diagnostic, évolution, pronostic, principes du traitement. *Bull. Cancer* **84** : 107-116.

- **Paul, A.B., Grant, E.S., Habib, F.K.** (1996). The expression and localization of  $\beta$ -nerve growth factor ( $\beta$ -NGF) in benign and malignant human prostate tissue : relationship to neuroendocrine differentiation. *Br. J. Cancer* **74** : 1990-1996.
- **Pawlowski, V., Révillion, F., Hornez, L., and Peyrat, J.-P.** (2000). A real-time one-step RT-PCR method to quantify c-erbB-2 expression in human breast cancer. *Cancer Detection Prevention* **24** : sous presse.
- **Pearce, F.L., Thompson, H.L.** (1986). Some characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated with nerve growth factor. *J. Physiol.* **372** : 379-393.
- **Peng, X., Greene, L.A., Kaplan, D.R., Stephens, R.M.** (1995). Deletion of a conserved juxtamemebrane sequence in Trk abolishes NGF-promoted neuritogenesis. *Neuron* **15** : 395-406.
- **Pennica, D., Arce, V., Swanson, T.A., Vejsada, R., Pollock, R.A., Armanini, M., Dudley, K.** (1996). Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron* **17** : 63-74.
- **Perez, M., Regan, T., Pflug, B., Lynch, J., Djakiew, D.** (1997). Loss of low-affinity nerve growth factor receptor during malignant transformation of the human prostate. *Prostate* **30** : 274-279.
- **Peréz, P., Coll, P.M., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V.** (1995). NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol. Cell. Neurosci.* **6** : 97-105.
- **Perkins, C.S., Bray, G.M., Aguayo, A.J.** (1981). Ongoing block of Schwann cell differentiation and deployment in dystrophic mouse spinal roots. *Brain Res.* **227** : 213-220.
- **Peyrat, J.P., Bonneterre, J., Vennin, P.H., Jammes, H., Beuscart, R., Hecquet, B., Djiane, J., Lefevre, J., Demaille, A.** (1990). Insulin-like growth factor-I receptors (IGF-I-R) and IGF-I in human breast tumors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **37** : 823-827.
- **Peyrat, J.-P., Vanleemmen, L., Fournier, J., Huet, G., Révillion, F., Bonneterre, J.** (1998). Prognostic value of p53 and urokinase-type plasminogen activator in node-negative human breast cancers. *Clin. Cancer Res.* **4** : 189-196.
- **Pflug, B., Djakiew, D.** (1998). Expression of p75NTR in a human prostate epithelial tumor cell line reduces nerve growth factor-induced cell growth by activation of programmed cell death. *Mol. Carcinog.* **23** : 106-114.

- Pflug, B.R., Dionne, C., Kaplan, D.R., Lynch, J., Djakiew, D. (1995). Expression of a Trk high affinity nerve growth factor receptor in the human prostate. *Endocrinology* **136** : 262-268.
- Pflug, B.R., Onoda, M., Lynch, J.H., Djakiew, D. (1992). Reduced expression of the low affinity nerve growth factor receptor in benign and malignant human prostate tissue and loss of expression in four metastatic prostate tumor cell lines. *Cancer Res.* **52** : 5403-5406.
- Pincelli, C., Sevignani, C., Manfredini, R., Grande, A., Fantini, F., Bracci-Landerio, L., Aloe, L., Ferrari, S., Cossarizza, A., Giannetti, A. (1994). Expression and function of nerve growth factor and nerve growth factor receptor on cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **103** : 13-18.
- Pingsheng, L., Anderson, R.G.W. (1995). Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J. Biol. Chem.* **270**: 27179-27185.
- Poluha, W., Poluha, D.K., Ross, A.H. (1995). TrkA neurogenic receptor regulates differentiation of neuroblastoma cells. *Oncogene* **10** : 185-189.
- Porter-Jordan, K., Lippman, M.E. (1994). Overview of the biologic markers of breast cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **8** : 73-100.
- Pritchard, K. (1997). Breast cancer : the real challenge. *The Lancet* **349** : sI24-sI26.
- Qian, X., Riccio, A., Zhang, Y., Ginty, D.D. (1998). Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. *Neuron* **21** : 1017-1029.
- Qiu, M.S., Green, S.H. (1991). NGF and EGF rapidly activate p21ras in PC12 cells by distinct, convergent pathways involving tyrosine phosphorylation. *Neuron* **7** : 937-946.
- Rabi, S.J., Cleghon, V., Kaplan, D.R. (1993). SNT, a differentiation-specific target of neurotrophic factor-induced tyrosine kinase activity in neurons and PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* **13** : 2203-2213.
- Rakowicz-Szulczynska, E.M. (1993). Identification of the cell surface and nuclear receptors for NGF in a breast carcinoma cell line. *J. Cell. Physiol.* **154** : 64-70.
- Rennie, P.S., Mawji, N.R., Coldman, A.J., Godolphin, W., Jones, E.C., Vielkind, J.R., Bruchovsky, N.(1993). Relationship between variant forms of estrogen-receptor RNA and an apoptosis-related RNA, TRPM-2, with survival in patients with breast cancer. *Cancer* **72** : 3648-3654.
- Révillion, F., Bonneterre, J., Peyrat, J.-P. (1998). *ERBB2* oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur. J. Cancer* **34** : 791-808.

- **Ribon, V., Saltiel, A.R.** (1996). Nerve growth factor stimulates the tyrosine phosphorylation of endogenous Crk-II and augments its association with p130Cas in PC-12 cells. *J. Biol. Chem.* **271** : 7375-7380.
- **Roberts, A.B., Sporn, M.B.** (1989). Transforming growth factor  $\beta$ . *Advances in Cancer Res.* **34** : 107-145.
- **Rodriguez-Tebas, A., Dechant, G., Gotz, R., Barde, Y.A.** (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* **11** : 917-922.
- **Rosenbaum, T., Vidaltamayo, R., Sanchez-Soto, M.C., Zentella, A., Hiriart, M.** (1998). Pancreatic b cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** : 7784-7788.
- **Ross, A.H., Daou, M.C., McKinnon, C.A., Condon, P.J., Lachyankar, M.B., Stephens, R.M., Kaplan, D.R., Wolf, D.E.** (1996). The neurotrophin receptor, gp75, forms a complex with the receptor tyrosine kinase trkA. *J. Cell Biol.* **132** : 945-953.
- **Rother, K.I., Imai, Y., Caruso, M., Beguinot, F., Formisano, P., Accili, D.** (1998). Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **273** : 17491-17497.
- **Rouayre, J.F.** (1997). Les inhibiteurs de croissance des cellules mammaires. *Médecine / Sciences* **13** : 89-92.
- **Rozengurt, E., Sinnett-Smith, J., Taylor-Papadimitriou, J.** (1985). Production of PDGF-like growth factor by breast cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **36** : 247-252.
- **Rush, R.A.** (1984). Immunohistochemical localization of endogenous nerve growth factor. *Nature* **312** : 364-367.
- **Russo, J., Russo, I.H.** (1987). Development of the mammary gland. In : Neville M.C., Daniel P., eds. *The mammary gland*. New York : Plenum, 1987 : 67-93.
- **Ryden, M., Ibanez, C.F.** (1997). A second determinant of binding to the p75 neurotrophin receptor revealed by alanine-scanning mutagenesis of a conserved loop in nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **272** : 33085-33091.
- **Ryden, M., Murray-Rust, J., Glass, D., Ilag, L., Trupp, M., Yancopoulos, G.D., McDonald, N.Q., Ibanez, C.F.** (1995). Functional analysis of mutant neurotrophins deficient in low-affinity binding reveals a role for p75LNGFR in NT-4 signalling. *EMBO J.* **14** : 1979-1990.

- Saglier, J., Antoine, E.-C. (1996). Cancer du sein, questions et réponses au quotidien. Editions Masson, Paris.
- Sato, K., Otsuki, T., Kimoto, M., Kakimoto, M., Tokmakov, A.A., Watanabe, Y., Fukami, Y. (1998). c-Src and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in NGF-dependent tyrosine phosphorylation of Shc in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250** : 223-228.
- Schechter, A.L., Bothwell, M.A. (1981). Nerve growth factor receptor on PC12 cells : evidence for two receptor classes with differing cytoskeletal association. *Cell* **24** : 867-874.
- Schneider, R., Schweiger, M. (1991). A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene* **6** : 1807-1811.
- Scimeca, J.C., Nguyen, T.T., Filloux, C., Van Obberghen, E. (1992). Nerve growth factor-induced phosphorylation cascade in PC12 pheochromocytoma cells. Association of S6 kinase II with the microtubule-associated protein kinase, ERK1. *J. Biol. Chem.* **267** : 17369-17374.
- Scott, J., Selby, M., Urdea, M., Quiroga, M., Bell, G.I., Rutter, W.J. (1983). Isolation of nucleotide of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor. *Nature* **302** : 538-540.
- Scott, S.A., Crutcher, K.A. (1994). Nerve growth factor and Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* **5** : 179-211.
- Sendtner, M., Carrol, P., Holtmann, B., Hughes, R.A., Thoenen, H. (1994). Ciliary neurotrophic factor. *J. Neurobiol.* **25** : 1436-1453.
- Shibayama, E., Koizumi, H. (1996). Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am. J. Pathol.* **148** : 1807-1818.
- Shih, A., Laramee, G.R., Schmelzer, C.H., Burton, L.E., Winslow, J.W. (1994). Mutagenesis identifies amino-terminal residues of nerve growth factor necessary for Trk receptor binding and biological activity. *J. Biol. Chem.* **269** : 27679-27686.
- Smeyne, R.J., Klein, R., Scnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A., Barbacid, M. (1994). Severe sensory ans sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* **368** : 246-248.
- Snider, W.D. (1994). Functions of neurotrophins during nervous system development : what the knockouts are teaching us. *Cell* **77** : 627-638.

- **Snider, W.D., Johnson, E.M.Jr.** (1989). Neurotrophic molecules. *Ann. Neurol.* **26** : 489-506.
- **Soilu-Hanninen, M., Ekert, P., Bucci, T., Syroid, D., Bartlett, P.F., Kilpatrick, T.J.** (1999). Nerve growth factor signaling through p75 induces apoptosis in Schwann cells via a Bcl-2-independent pathway. *J. Neurosci.* **19** : 4828-4838.
- **Sortino, M.A., Condorelli, F., Vancheri, C., Chiarenza, A., Bernardini, R., Consoli, U., Canonico, P.L.** (2000). Mitogenic effect of nerve growth factor (NGF) in LNCaP prostate adenocarcinoma cells : role of the high- and low-affinity NGF receptors. *Mol. Endocrinol.* **14** : 124-136.
- **Soule H.D., Mc Grath C.M.** (1986). A simplified method for passage and long-term growth of human mammary epithelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **22** :6-12.
- **Sporn, M.B., and Roberts, A.B.** (1990). Transforming growth factor  $\beta$  : problems and prospects. *Cell Regul.* **1** : 875-882.
- **Stahl, N., Yancopoulos, G.D.** (1994). The tripartite CNTF receptor complex : activation and signaling involves components shared with other cytokines. *J. Neurobiol.* **25** : 1454-1466.
- **Steeg, P.S.** (1992). Suppressor genes in breast cancer : an overview. *Cancer Treat. Res.* **61** : 45-57.
- **Steeg, P.S., de la Rosa, A., Flatow, U., MacDonald, N.J., Benedict, M., Leone, A.** (1993). Nm23 and breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* **25** : 175-187.
- **Stephens R.M., Loeb, D.M., Copeland, T.D., Pawson, T., Greene, L.A., Kaplan, D.R.** (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* **12**: 691-705.
- **Stevens, A., Lowe, J.** (1992). Histologie. Editions Pradel/Edisem, Paris.
- **Strobl, J.S., Wonderlin, W.F., Flynn, D.C.** (1995). Mitogenic signal transduction in human breast cancer cells. *Gen. Pharmacol.* **26** : 1643-1649.
- **Susen, K., Heumann, R., Blöchl, A.** (1999). Nerve growth factor stimulates MAPK via the low affinity receptor p75<sup>LNTR</sup>. *FEBS Lett.* **463** : 231-234.
- **Sutter, A., Riopelle, R.J., Harris-Warrick, R.M., Shooter, E.M.** (1979). Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J. Biol. Chem.* **254** : 5972-5982.

- Tagliabue, E., Castiglioni, F., Ghirelli, C., Modugno, M., Asnaghi, L., Somenzi, G., Melani, C., Ménard, S. (2000). Nerve growth factor cooperates with p185<sup>HER2</sup> in activating growth of human breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **275** : 5388-5394.
- Taglialatela, G., Angelucci, L., Scaccianoce, S., Foreman, P.J., Perez-Polo, J.R. (1991). Nerve growth factor modulates the activation of the hypothalamopituitary-adrenocortical axis during the stress response. *Endocrinology* **129** : 2212-2218.
- Tajima, Y., Molina, R.P.Jr., Rorke, L.B., Kaplan, D.R., Radeke, M., Feinstein, S.C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. (1998). Neurotrophins and neuronal versus glial differentiation in medulloblastomas and other pediatric brain tumors. *Acta Neuropathol.* **95** : 325-332.
- Takei, Y., Kurobe, M., Uchida, A., Hayashi, K. (1984). Serum concentration of basic fibroblast growth factor in breast cancer. *Clin. Chem.* **40** : 1980-1981.
- Tapley, P., Lamballe, F., Barbacid, M. (1992). K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the *trk* family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* **7** : 371-381.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H.W., Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74** : 845-853.
- Tessarollo, L. (1998). Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9** : 125-137.
- Thoenen, H. (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* **270** : 593-598.
- Thoenen, H., Bandtlow, C., Heumann, R. (1987). The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system : comparison with the periphery. *Rev. Physiol. Biochem.* **109** : 145-178.
- Thoenen, H., Barde, Y.A. (1980). Physiology of nerve growth factor. *Physiol. Rev.* **60** : 1284-1335.
- Thyss, A. et Pivot, X. (1998). Traitements médicaux des cancers. Editions Masson, Paris.
- Torres, M., Bogenmann, E. (1996). Nerve growth factor induces a multimeric TrkA receptor complex in neuronal cells that includes Crk, SHC and PLC-gamma 1 but excludes P130CAS. *Oncogene* **12** : 77-86.
- Treanor, J.J., Goodman, L., De, S.F., Stone, D.M., Poulsen, K.T., Beck, C.D., Gray, C. (1996). Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* **382** : 80-83.
- Treanor, J.J.S., Schmelzer, C., Winslow, J.W., Shelton, D.L., Hefti, F., Nikolics, K., Burton, L.E. (1995). Heterodimeric neurotrophins induce phosphorylation of Trk

- receptors and promote neuronal differentiation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **270** : 23104-23110.
- **Trupp, M., Arenas, E., Fainzilber, M., Nilsson, A.S., Sieber, B.A., Grigoriou, M., Kilkenny, C.** (1996). Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* **381** : 785-788.
  - **Tsihlias, J., Kapusta, L., Slingerland, J.** (1999). The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu. Rev. Med.* **50** : 401-423.
  - **Tsuda, T., Wong, D., Dolovich, J., Bienenstock, J., Marshall, J., Denburg, J.A.** (1991). Synergistic effects of nerve growth factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on human basophilic cell differentiation. *Blood* **77** : 971-979.
  - **Tuszynski, M., Cage, F.** (1995). Maintaining the neuronal phenotype after injury in the adult CNS. Neurotrophic factors, axonal growth substrates, and gene therapy. *Mol. Neurobiol.* **10** : 151-167.
  - **Ullrich, A., Schlessinger, J.** (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61** : 203-212.
  - **Urfer, R., Tsoulfas, P., O'Connel, L., Shelton, D.L., Parada, L.F., Presta, L.G.,** (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J.* **14** : 2795-2805.
  - **Urfer, R., Tsoulfas, P., Soppet, D., Escandon, E., Parada, L.F., Presta, L.G.** (1994). The binding epitopes of neurotrophin-3 to its receptors trkB and gp75 and the design of a multifunctional human neurotrophin. *EMBO J.* **13** : 5896-5909.
  - **Valenzuela, D.M., Maisonpierre, P.C., Glass, D.J., Rojas, E., Nunez, L., Kong, Y., Gies, D.R., Stitt, T.N., Ip, N.Y., Yancopoulos, G.D.** (1993). Alternative forms of rat TrkB with different functional capabilities. *Neuron* **10** : 963-974.
  - **Van Golen, K., Milliron, K., Davies, S., Merajver, S.D.** (1999). BRCA-associated cancer risk : molecular biology and clinical practice. *J. Lab. Clin. Med.* **134** : 11-18.
  - **Verdi, J., Birren, S., Ibanez, C., Persson, H., Kaplan, D., Benedetti, M., Chao, M.V., Anderson, D.J.** (1994). p75LNGFR regulates TrkB signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron* **13** : 733-745.
  - **Verdi, J.M., Birren, S.J., Ibanez, C.F., Persson, H., Kaplan, D.R., Benedetti, M., Chao, M.V., Anderson, D.J.** (1994). p75LNGFR regulates TrkB signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron* **12** : 733-745.

- **Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Kolesnick, R.N.** (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* **380** : 75-79.
- **Vinore, S.A., Perez-Polo, J.R.** (1983). Nerve growth factor and neural oncology. *J. Neurosci. Res.* **9** : 81-100.
- **Vogel, P.M., Georgiade, N.G., Fetter, B.F., Vogel, F.S., McCarty, K.S.Jr.** (1981). The correlation of histologic changes in the human breast with the menstrual cycle. *Am. J. Pathol.* **104** : 23-34.
- **Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., Cooper, J.A.** (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74** : 205-214.
- **Volonte, C., Angelastro, J.M., Greene, L.A.** (1993). Association of protein kinases ERK1 and ERK2 with p75 nerve growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **268** : 21410-21415.
- **Walch, E.T., Albino, A.P., Marchetti, D.** (1999). Correlation of overexpression of the low-affinity p75 neurotrophin receptor with augmented invasion and heparanase production in human malignant melanoma cells. *Int. J. Cancer* **82** : 112-120.
- **Walch, E.T., Marchetti, D.** (1999). Role of neurotrophins and neurotrophins receptors in the in vitro invasion and heparanase production of human prostate cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* **17** : 307-314.
- **Watson, F.L., Porcionatto, M.A., Bhattacharyya, A., Zhao, W., Presta, L.G.** (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J. Neurobiol.* **39** : 323-336.
- **Wellstein, A.** (1994). Growth factor targeted and conventional therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **31** : 141-152.
- **Whittemore, S.R., Holets, V.R., Keane, R.W., Levy, D.J., McKay, R.D.** (1991). Transplantation of a temperature-sensitive, nerve growth factor-secreting, neuroblastoma cell line into adult rats with fimbria-fornix transection lesion rescues cholinergic septal neurons. *J. Neurosci. Res.* **28** : 156-170.
- **Whittemore, S.R., Seiger, A.** (1987). The expression, localization and functional significance of  $\beta$ -nerve growth factor in the central nervous system. *Brain Res.* **12** : 439-464.

- **Wiesmann, C., Ultsch, M.H., Bass, S.H., De Vos, A.M.** (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* **401** : 184-188.
- **Wolf, D.E., McKinnon, C.A., Daou, M.-C., Stephens, R.M., Kaplan, D.R., Ross, A.H.** (1995). Interaction with TrkA immobilizes gp75 in the high affinity nerve growth factor receptor complex. *J. Biol. Chem.* **270** : 2133-2138.
- **Wright, C.E., Gaull, G.E.** (1983). Nerve growth factor is present in human milk. *Pediatr. Res.* **17** : 144(Abstr.).
- **Wright, J.H., Drueckes, P., Bartoe, J., Zhao, Z., Shen, S.H., Krebs, E.G.** (1997). A role for the SHP-2 tyrosine phosphatase in nerve growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol. Biol. Cell* **8** : 1575-1585.
- **Wu, B.Y., Fodor, E.J., Edwards, R.H., Rutter, W.J.** (1989). Nerve growth factor induces the proto-oncogene c-jun in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **264** : 9000-9003.
- **Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E.** (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270** : 1326-1331.
- **Xu, H., Lee, K.W., Goldfarb, M.** (1998). Novel recognition motif on fibroblast growth factor receptor mediates direct association and activation of SNT adapter proteins. *J. Biol. Chem.* **273** : 17987-17990.
- **Yaar, M., Grossman, K., Eller, M., Gilchrest, B.A.** (1991). Evidence for nerve growth factor-mediated paracrine effects in human epidermis. *J. Cell. Biol.* **115**, 821-828.
- **Yamashita, H., Avraham, S., Jiang, S., Dikic, I., Avraham, H.** (1999). The Csk homologous kinase associates with TrkA receptors and is involved in neurite outgrowth of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **274** : 15059-15065.
- **Yamashita, T., Tucker, K.L., Barde, Y.A.** (1999). Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* **24** : 585-593.
- **Yang, Y., Spitzer, E., Kenney, N., Zschiesche, W., Li, M., Kromminga, A., Müller, T., Spener, F., Lezius, A., Veerkamp, J.H., Smith, G.H., Salomon, D.S., Grosse, R.** (1994). Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland. *J. Cell Biol.* **127** : 1097-1104.
- **Yang, Z., Costanzo, M., Golde D.W.** (1993). Tumor necrosis factor activation of the sphingomyelin pathway signals nuclear factor κB translocation in intact HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **268** : 20520-20523.

- **Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J.J.L., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C.A., Reed, J.C., Bredesen, D.E.** (1999). TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J. Biol. Chem.* **274** : 30202-30208.
- **Yee, D., Paik, S., Lebovic, G.S., Marcus, R.R., Favoni, R.E., Cullen, K.J., Lippman, M.E., Rosen, N.** (1989). Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy : evidence for a paracrine role in human breast cancer. *Mol. Endocrinol.* **3** : 509-517.
- **York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W., Stork, P.J.** (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* **392** : 622-626.

## *Annexes*

---

## Annexe 1 : Matériaux et Méthodes

### I - Matériaux

#### I.1. CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES HUMAINES

##### 1) *Lignées cellulaires épithéliales mammaires cancéreuses*

MDA-MB-231 est une lignée cellulaire établie à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome métastatique du sein. Cette lignée se caractérise par une morphologie de cellules épithéliales et possède un nombre de chromosomes hypotriплоïde (en moyenne 67) (Cailleau *et al.*, 1974). Les cellules MDA-MB-231 n'expriment pas de récepteurs pour les oestrogènes et la progestérone. Elles sont tumorigènes et forment des métastases chez la souris nude.

MDA-MB 453 est une lignée cellulaire établie à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome métastatique. Elle surexprime le récepteur erb-B2.

MDA-MD-468 est une lignée cellulaire établie à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome métastatique. Elle surexprime le FGF-2.

SK-Br-3 est une lignée cellulaire d'adénocarcinome métastatique qui surexprime le récepteur erb-B2.

MCF-7 est une lignée établie à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome du sein de type canalaire invasif (Soule *et al.*, 1973). Le nombre de chromosomes varie entre les formules hypertriploïdes et hypotétraploïdes. Cette lignée a conservé certaines caractéristiques d'un épithélium mammaire différencié. Ainsi, les cellules MCF-7 présentent des récepteurs de haute affinité pour les hormones stéroïdiennes telles que les oestrogènes, la progestérone et les glucocorticoïdes (Brooks *et al.*, 1973 ; Lippman *et al.*, 1976, 1977 ; Horwitz *et al.*, 1978).

T47D est une lignée établie à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome de type canalaire invasif. Elle est triploïde et forme un épithélium différencié et présente des récepteurs au 17 beta-oestradiol et à d'autres stéroïdes.

BT20 est une lignée établie en 1958 par E.Y. Lasfargues et L. Ozzello par isolement et culture de cellules échappées d'une tumeur en culture primaire. Elle est hyperdiploïde avec des chromosomes fragmentés et forme des adénocarcinomes de grade II dans les souris nude.

## *2) Cellules épithéliales mammaires humaines normales*

Les cellules épithéliales mammaires humaines normales sont issues de mammoplasties réalisées chez des patientes saines agées de 20 à 40 ans dans le département de chirurgie plastique (Docteur Pellerin) du Centre Hospitalier Universitaire de Lille. Leur culture a été réalisée par le Docteur Xuefen Dong-Lebourhis (Dong-Lebourhis *et al.*, 1997).

## I.2. TUMEURS MAMMAIRES HUMAINES

L'étude retrospective a été faite sur 363 patientes ayant un cancer du sein et ayant subi une intervention chirurgicale en traitement locorégional au Center Oscar Lambret (Centre de Recherche Contre le Cancer du Nord de la France) entre Mai 1989 et Décembre 1991. L'âge moyen des patientes est de 58 ans (de 26 à 90). Les patientes ont été traitées par segmentectomie lorsque la taille de la tumeur était inférieure à 3 cm de diamètre et par mastectomie totale lorsque la tumeur était de taille supérieure ou en position centrale. La chirurgie était suivie d'une radiothérapie. Les patientes préménopausées présentant des ganglions (N+) et les patientes postménopausées à tumeur ne présentant pas de récepteurs pour l'oestradiol (ER-négative) et la progestérone (PgR-négative) ont reçu un traitement adjuvant correspondant à six cycles de chimiothérapie. Les patientes postménopausées ER- et PgR- positives présentant des ganglions ont été traitées au tamoxifène pendant 2 ans. Les patientes ne présentant pas de ganglion n'ont reçu aucun traitement adjuvant.

La durée moyenne de suivi des patientes vivantes est de 79 mois. Le nombre de décès est de 94, et le nombre de récidives de 126.

### I.3. LES CELLULES DE NEUROBLASTOME HUMAIN

La lignée de neuroblastome SY5Y est un sous clone de la lignée SK-N-SH. Les cellules SY5Y sont capables de se différencier en présence d'acide rétinoïque ou de NGF. Elles nous ont été fournies par le Dr Luc Buée (INSERM, U422, Lille, France).

### I.4. SEQUENCES OLIGONUCLEOTIDIQUES DES AMORCES ET SONDES UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION ET LA DETECTION PAR RT-PCR QUANTITATIVE

Les séquences d'ARNm ont été obtenues sur le site NCBI (Entrez Nucleotide, accession number : TrkA, NM 002529 ; p75, NM 002507). Les amorces de PCR et les sondes fluorogènes TaqMan ont été conçues grâce au logiciel Primer Express (Perkin Elmer, Demo version 1.0) à partir de régions dont l'absence d'homologie avec d'autres molécules a été vérifiée sur Blast Search Nucléotide Results. Des amplicons de 102 pb et 147 pb ont été obtenus pour TrkA et p75, respectivement, correspondant à des séquences situées dans les domaines extracellulaires de chacune des protéines. Un amplicon de 89 pb a été obtenu pour TBP en utilisant les amorces élaborées par Bièche *et al.* (1999). La sonde TaqMan porte à son extrémité 5' un groupement rapporteur fluorescent FAM (6-carboxy-fluorescein) (5' FAM (6-carboxy-fluorescein) reporter dye) dans les cas de TrkA et p75 et un groupement rapporteur fluorescent VIC (5' VIC reporter dye) dans le cas de TBP et chacune des sondes porte un groupement quenchant TAMRA (3' TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine)) à son extrémité 3'. De plus, la sonde contient un groupement phosphate en 3' pour éviter son élongation pendant la PCR. Les séquences des sondes et des amorces (Amorces et sondes pour TrkA et p75, sonde pour TBP : Eurogentec, Belgique ; amorces pour TBP: Genset, France) sont présentées dans la table 1.

**Table 1 : Séquences des amorces et sondes TaqMan pour TrkA, p75 et TBP**

	Séquence (5'-3')	Position	Taille du produit de PCR
<b>TrkA</b>			
Sens	CATCGTGAAGAGTGGTCTCCG	291U (21 b)	102 pb
Antisens	GAGAGAGACTCCAGAGCGTTGAA	392L (23 b)	
Sonde <sup>1</sup>	AGGAGTGAAATGGAAGGCATCTGGCG	320-345	
<b>p75</b>			
Sens	CCTACGGCTACTACCAGGATGAG	442U (23 b)	147 pb
Antisens	TGGCCTCGTCGGAATACG	588L (18 b)	
Sonde <sup>1</sup>	CTCGGGCCTCGTGTCTCCTGC	506-527	
<b>TBP</b>			
Sens	CACGAACCACGGCACTGATT	706U (23 b)	89 pb
Antisens	TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC	794L (18 b)	
Sonde <sup>1</sup>	TGTGCACAGGAGCCAAGAGTGAAGA	745-769	

<sup>1</sup> La sonde TaqMan porte un groupement fluorescent 5' FAM (6-carboxy-fluorescein) (TrkA et p75) ou 5' VIC (TBP), un groupement quenchant 3' TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), et contient un groupement 3' phosphate (p) pour éviter l'élongation pendant la PCR.

Les amorces et sondes pour TrkA and p75, la sonde pour la TATA Box binding protein (TBP) proviennent de chez Eurogentec (Belgique) et les amorces pour la TBP ont été obtenues chez Genset (France).

## II - Méthodes

### II.1 CULTURE CELLULAIRE

#### 1) *Culture des lignées cancéreuses mammaires*

Les cellules épithéliales cancéreuses MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SK-Br-3, T47D, BT20 et MCF-7 sont cultivées en boîtes de 75 cm<sup>2</sup> (Falcon) dans du milieu composé de MEM (Milieu essentiel minimum de Eagle avec sels de Earle) (BioWhittaker) complémenté avec 10% de SVF décomplémenté, 1% d'acides aminés non essentiels (Biowhittaker), 2 mM de L-glutamine, 5 µg/ml d'insuline (endopancrine, Organon) et de la pénicilline (40 UI/ml) et de la streptomycine (40 µg/ml) (Gibco-BRL). Le milieu est ajusté à pH 7,4 avec de l'HEPES (25 mM), et 0,22% de bicarbonate de sodium. Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide et enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>.

Lorsque les cellules sont à confluence, le milieu de culture est éliminé et les cellules fixées sur le fond de la boîte sont rincées avec du PBS stérile pH 7,4 pour éliminer les traces de sérum. Les cellules sont ensuite incubées en présence de 1 ml de trypsine/EDTA (Versène) solution 1X (Eurobio). Lorsqu'elles sont décollées, l'action de la trypsine est inhibée en ajoutant 5 ml de milieu complet. Les cellules sont ensuite réensemencées au 1/10 dans de nouvelles boîtes de culture en présence de milieu complet. En sevrage, les cellules sont incubées dans un milieu MEM auquel sont ajoutés 30 µg/ml de transferrine, 2 µg/ml de fibronectine et les même quantités d'acides aminés non essentiels, de glutamine et d'antibiotiques que pour le milieu complet.

#### 2) *Culture primaire des cellules épithéliales mammaires normales*

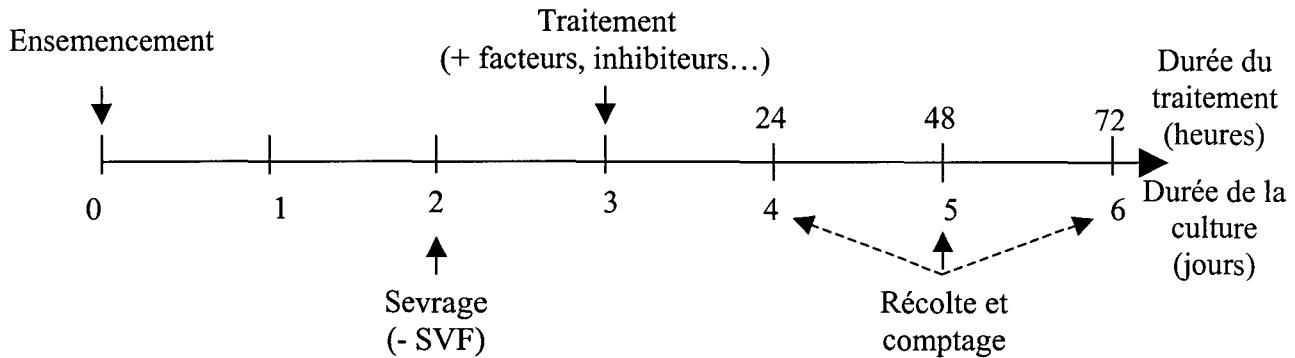
Les cellules épithéliales mammaires normales humaines sont obtenues à partir de réduction mammaires et préparées selon la technique décrite par Soule et Mc Grath (1986). Après avoir été dégraissé, l'échantillon mammaire est dilacéré en petits fragments à l'aide de ciseaux stériles dans du sérum de veau fœtal (SVF). Les fragments sont ensuite digérés, à 37°C sous agitation, avec de la collagénase de type XI (450 à 500 UI/ml) et de la hyaluronidase (150 UI/ml) pendant 4 à 5 h en milieu dépourvu de sérum. Les organoïdes issus

de cette digestion sont séparés par centrifugation sur gradient de densité au Ficoll (10 ml/tube 50 ml) (1000 g, 30 min). Les organoïdes situés à l'interface sont rincés deux fois avec du milieu dépourvu de sérum, après chaque lavage, le culot est récupéré par centrifugation (1000 g, 15 min). Le culot est ensuite repris dans du milieu de base (constitué de DME/HAM F12 (vol/vol), Hepes 10 mM, NaOH 20 mM, bicarbonate de sodium 0,22%, glutamine 2 mM, pénicilline-streptomycine (100 UI/ml, 100 µg/ml), gentamycine 4 µg/ml, fongizone 0,25 ng/ml) puis centrifugé rapidement à 200 g. Le surnageant qui contient les fibroblastes est éliminé et le culot est repris dans un milieu de culture enrichi constitué de milieu de base auquel sont ajoutés : 10 µg/ml d'insuline, 2 ng/ml d'EGF, 100 ng/ml de toxinecholérique,  $5 \cdot 10^{-6}$  M de cortisol, 10% de SVF, 5% de sérum de cheval et 1,05 mM de CaCl<sub>2</sub>. La haute teneur en Ca<sup>2+</sup> permet une bonne adhérence des organoïdes au plastique des boîtes de culture. Après 7 à 10 jours (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>), les cellules épithéliales essaient à partir des organoïdes et se dispersent au fond de la boîte de culture. Lorsqu'elles atteignent la confluence, les cellules sont mises en présence d'un milieu à faible teneur en Ca<sup>2+</sup>. Ce milieu est constitué du milieu enrichi contenant seulement 40 mM de CaCl<sub>2</sub> et du SVF chélaté en Ca<sup>2+</sup> sur résine Chelex 100 (Sigma). La faible teneur en Ca<sup>2+</sup> facilite la division cellulaire et permet aux cellules de rester en suspension dans le milieu de culture. Les cellules en suspension sont récupérées par centrifugation puis réparties dans de nouvelles boîtes de culture en présence de milieu enrichi.

## II.2. TESTS BIOLOGIQUES

### 1) Analyse de l'effet mitogène du NGF

L'ensemencement est réalisé à la concentration de 30.000 cellules par boîte de Pétri de 35 mm de diamètre dans du milieu complet. Après 48 h, les cellules sont rincées deux fois 1 h avec du milieu sans SVF puis incubées 24 h dans du milieu de sevrage (sans SVF). A ce moment, le milieu de sevrage est renouvelé et les cellules sont traitées pendant une durée déterminée (24, 48 ou 72 h) en présence ou en absence de NGF (R&D System) et/ou des différents inhibiteurs et anticorps neutralisant étudiés. A la fin du traitement, les cellules sont décollées grâce à la trypsine puis comptées à l'aide d'une cellule de Malassez.



## 2) Analyse de l'effet anti-apoptotique du NGF

On ensemence 50.000 cellules par boîte de Pétri de 35 mm de diamètre contenant une lamelle traitée au collagène de queue de rat. Après 24 h, les cellules sont rincées deux fois 1 h avec du milieu sans SVF puis incubées 24 h dans du milieu de sevrage en présence ou en absence de 2 µM de C2 (N-acétyl-D-sphingosine, Sigma), de 100 ng/ml de NGF et des différents inhibiteurs et anticorps neutralisant étudiés. Après 24 h de traitement, les cellules sont fixées dans le méthanol froid (-20°C) pendant 10 min ou dans le paraformaldéhyde (4°C) dans le cas des cellules transfectées puis rincées deux fois dans le PBS avant coloration par 1 µg/ml de Hoechst 33258 (Sigma) pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules sont alors rincées au PBS et montées sous une lamelle dans le glycergel (Dako). Les cellules apoptotiques présentant des noyaux condensés ou fragmentés sont comptées grâce à un microscope à fluorescence Olympus-BH2 dans des champs sélectionnés au hasard. Un minimum de 500 à 1000 cellules est analysé pour chaque condition de culture et les résultats sont exprimés en nombre de cellules apoptotiques par rapport à la population totale de cellules analysées (pourcentage de cellules apoptotiques).

## II.3. IMMUNOPRECIPITATION ET TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

### 1) *Préparation des lysats cellulaires*

Les cellules sont ensemencées à la concentration de 250 000 cellules par boîte de Pétri de 100 mm de diamètre. Elles sont ensuite sevrées puis traitées comme décrit ci-dessus. Après traitement, les cellules sont selon les cas:

- lysées dans du tampon de lyse pour immunodétection et immunoprecipitation (NaCl 150 mM ; Tris 50 mM pH7,5 ; NP40 1% ; SDS 0,1% ; orthovanadate 1 mM ; PMSF 1 mM ; Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1 mM ; leupeptine 10 µg/ml ; aprotinine 10 µg/ml ; pepstatine A 1 µg/ml), puis chauffées 10 min à 100°C et centrifugées (10000 g ; 1 min).
- lysées dans du tampon de lyse "PARP" riche en urée (Tris/HCl 62,5 mM, pH 6,8; urée 6 M; glycerol 10%; SDS 2%), puis soniquées et incubées à 65°C pendant 15 min.

La quantité de protéines contenue dans les lysats est dosée grâce au kit Biorad Protein Assay.

### 2) *Préparation d'extrait nucléaire pour l'étude de l'activation de NF-κB.*

Les préparations d'extraits nucléaires de cellules cancéreuses mammaires a été réalisée d'après la méthode décrite par Herrmann *et al.* (1997). Les cellules sont décollées à la trypsine puis centrifugées dans du MEM SVF10%. Le culot est rincé dans du tampon PBS froid pH 7,4 puis resuspendu dans 400µl de tampon hypotonique froid (Hepes 10 mM, pH 7,8 ; KCl 10 mM ; MgCl<sub>2</sub> 2 mM ; EDTA 0,1 mM ; aprotinine 10 µg/ml ; leupeptine 0,5 µg/ml ; PMSF 3 mM ; DTT 3 mM). Après 10 min sur la glace, on ajoute 25 µl de NP40 à 10% et on centrifuge 5 min, à 13000 tour/mn et à 4°C. Le surnageant (fraction cytoplasmique) est ensuite éliminé et le culot est resuspendu dans du tampon à forte concentration en sels (Hepes 50 mM, pH 7,4 ; KCl 50 mM ; NaCl 300 mM ; EDTA 0,1 mM ; glycérol 10% (v/v) ; DTT 3 mM ; PMSF 3 mM). Après 30 min sur la glace, avec de fréquentes agitations, le matériel nucléaire insoluble est sédimené par centrifugation (10 mn, 13000 tour/mn, 4°C). Le surnageant est congelé très rapidement sur un bain carboglace/éthanol. Après décongélation, la fraction nucléaire peut être reprise dans le tampon d'échantillon pour électrophorèse.

*3) Immunoprecipitation pour la détection des récepteurs du NGF et la mesure de l'activité tyrosine kinase de TrkA et des MAP-kinases*

500 µg de lysat protéique sont incubés 1 h à 4°C en présence de protéine A-agarose (Transduction Laboratories) (10 µl/250 µl) (preclearing). Après centrifugation (10 000 g, 2 min), le surnageant est incubé (60 min, 4°C) avec un anticorps anti-TrkA polyclonal (SantaCruz) (10 µl/250 µl), anti-p75 monoclonal (Euromedex) (20 µl/250 µl) ou anti MAP-kinase monoclonal (anti-ERK2) (Transduction Laboratories) (10 µl/250 µl). La protéine A-agarose (10 µl) est additionnée et incubée 60 min à 4°C puis centrifugée (10 000 g, 2 min). Le culot est ensuite rincé trois fois avec du tampon de lyse.

*4) Electrophorèse en gel de polyacrylamide*

Les lysats protéiques et les culots d'immunoprecipitation sont bouillis 5 min et les lysats protéiques "PARP" sont chauffés 10 min à 65°C dans du tampon de Laemmli (SDS 1% ; βmercaptoéthanol 1% ; glycerol 20% ; Tris 10mM, pH 6,8 ; bleu de bromophénol 30 µl/5 ml). Les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont réalisées sur plaques (80 x 60 x 1,5 mm) dans un MiniSystem Biorad. La migration est réalisée dans du tampon de migration (Tris 20mM ; glycine 200 mM ; SDS 0,1%) en gel de 10% d'acrylamide. Les protéines (20 à 50 µg) migrent 45 min à 100 V et les poids moléculaires sont déterminés par rapport à des témoins de masse standard (Pharmacia Biotech).

*5) Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose*

Après la migration, le gel est équilibré quelques minutes dans le tampon de transfert (Tris 25 mM ; glycine 200 mM ; méthanol 20%) puis les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Schleisser et Schüll). Le transfert est réalisé à 200 mA pendant 1 h. Le transfert des protéines sur la membrane est contrôlé par coloration au rouge Ponceau (Sigma).

*6) Immunorévélation des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose*

La membrane de nitrocellulose est saturée 3 h à température ambiante dans une solution de TBS pH7,6 (NaCL 150 mM ; Tris 10 mM ; Tween 20 0,1%) contenant 3% de SAB. Après trois lavage au TBS, la membrane est incubée une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire. Elle est ensuite lavée 6 fois pendant 8 min avec du TBS puis incubée 3 h avec l'anticorps

secondaire conjugué à la peroxydase. La membrane est lavée 4 fois au TBS et le complexe antigène-anticorps est révélé par chimioluminescence à l'aide du kit ECL (Amersham).

#### II.4. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES ARNm DES RECEPTEURS DU NGF

##### 1) Extraction d'ARN totaux.

Les ARN totaux sont extraits d'échantillons de tumeurs (poids 40 mg) grâce au kit d'extraction RNeasy Mini Kit (Qiagen, France). L'homogénéisation des échantillons de tumeurs est réalisée grâce au Rotor-Stator Homogenizer (Ribolyzer, Hybaid). La quantité d'ARN extraits est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm, et est comprise entre 1.5 µg et 194 µg (moyenne 40 µg). La pureté des ARN est contrôlée par le rapport des absorbances mesurées à 260 nm et 280 nm et les valeurs obtenues sont comprises entre 1.83 and 2.05. L'absence de dégradation des ARN est ensuite confirmée par électrophorèse des ARN sur gel d'agarose 1.5% contenant du bromure d'éthidium.

##### 2) Préparation des standards

###### *Préparation d'ADNc*

Les ADN complémentaires sont préparés à l'aide du kit Ready To Go-You Prime First Strand Bead (Pharmacia Biotech). 1 µg d'ARN totaux sont incubés 10 min à 65°C en présence d'H<sub>2</sub>O DEPC (qsp 25 µl), puis placés 2 min dans la glace avant d'être transférés dans le tube contenant les billes du kit, les hexamères 0.2 µg et de l'H<sub>2</sub>O DEPC (qsp 33 µl) et maintenus 1 min à température ambiante et incubés 60 min à 37°C. L'ADNc est ensuite conservé à -20°C.

###### *Extraction de l'ADNc du gel d'agarose*

Le kit d'extraction de l'ADN du gel d'agarose (QIAEX-II for DNA extraction) provient de chez Qiagen. Les produits de PCR sont évaporés puis déposés sur gel d'agarose 2%. Après migration 1h à 100V, on découpe la bande du gel d'agarose et on lyse le gel en présence de 6 volumes de tampon QX1 (600µl pour 100 mg) puis on ajoute 30 µl de tampon QIAEX-II. On incube alors 10 min à 50°C en vortexant régulièrement, on centrifuge 1 mn à 12000 g, on

élimine le surnageant. Le culot est lavé avec 500 µl de tampon QX1 puis deux fois avec 500 µl de tampon PE. Après avoir laissé sécher le culot (30 min), on élue l'ADN avec 20 µl d'eau.

#### *Ligation de l'insert dans le plasmide*

La ligation de l'insert se fait dans le plasmide pGEM (Promega). Le produit de PCR est dilué au 1/10<sup>ème</sup> puis incubé (5 ng) une nuit à 4°C en présence de tampon 10 X ligase, de plasmide pGEM (50 ng) et de T4 DNA ligase (Promega, France).

#### *Transformation par choc thermique*

Le produit de ligation (plasmide + insert) (2 µl) et les bactéries compétentes (E. coli, JM109) sont placés 20 min dans la glace, 48 sec à 42°C puis 2 min dans la glace. On ajoute ensuite 250 µl de milieu SOC (Promega) et on incube 15 min à 37°C avant de laisser sous agitation douce à 37°C pendant 75 min. Le produit de la transformation est étalé en boîte de Pétri sur du milieu LB (bactotryptone 10 g ; extrait de levure 5 g ; NaCl 10 g ; eau ultrapure qsp 1 l ; pH 7 ; agar 1,5 g/100 ml ; ampicilline 25 mg/ml ; X-Gal 20 mg/ml ; IPTG 25 mg/ml).

#### *Contrôle de la transformation*

Les colonies bactériennes blanches obtenues après 24h d'incubation à 37°C sont contrôlées par PCR. (tampon 10 X ; MgCl<sub>2</sub> 25 mM ; DNTP 2.5 mM ; amorce sens 100 nM ; amorce antisens 100 nM ; Taq Gold polymérase 1,25 unités ; 36 cycles, température d'elongation 60°C). La présence du plasmide contenant l'insert est vérifiée par observation d'une bande à 102 pb pour TrkA ou 147 pb pour p75 sur gel d'agarose 2%. Les bactéries contenant l'insert sont cultivées à 37°C dans 50 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline

#### *Extraction de l'ADN plasmidique*

L'ADN plasmidique est extrait grâce au kit QIAGEN Plasmid purification (MaxiPrep). La culture bactérienne est centrifugée (5500 g ; 20 min ; 4°C). Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu avec 10 ml de tampon P1 + Rnase A. On ajoute ensuite 10 ml de tampon P2 et on incube 5 min à température ambiante. Après incubation, 10 ml de tampon P3 sont ajoutés et l'ensemble est transféré immédiatement dans la colonne QIAFilter puis incubé 10 min à température ambiante. Le filtrat est ensuite passé sur la colonne QIAGEN-tip et lavé 2 fois avec 30 ml de tampon QC. L'ADN est élue avec 15 ml de tampon QF, précipité avec 10.5 ml d'isopropanol à température ambiante et centrifugé (15000 g; 30

min, 4°C). Le culot est lavé avec 5 ml d'éthanol 70% à température ambiante et centrifugé (15000 g ; 10 min, 4°C), puis séché 10 min à l'air avant d'être dissous dans 500 µl de tampon TE (Tris/EDTA).

#### *Séquençage du plasmide (réaction de Sanger)*

Le séquençage de l'ADN plasmidique permet de vérifier que la séquence de l'insert est correct et de savoir dans quel sens s'est faite l'insertion. La réaction de séquence de l'ADN plasmidique (250 ng) se fait grâce aux amorces forward (Amersham, PucM13) en présence de Mix Amersham (Taq polymérase + dNTP + didéoxynucléotides marqués). La réaction se fait sur 25 cycles (96°C - 10 sec / 50°C - 5 sec / 60°C - 4 mn). Les produits de réaction sont purifiés par gel filtration sur résine P10 (centrifugation : 1 mn / 2500 rpm). Après évaporation, chaque échantillon est repris dans 3 µl de bleu dextran + formamide et dénaturé (2 mn / 90°C) juste avant dépôt sur gel d'acrylamide à 6%. Le séquençage est réalisé sur 373 DNA Sequencer (Applied Biosystem).

#### *Linéarisation*

La linéarisation du plasmide se fait à l'aide d'une enzyme de restriction (4 unités enzymatiques/µg d'ADN) choisie en fonction du sens de l'insert (NCO1 pour TrkA et PstI pour p75) dans du tampon 10X, 75 min à 37°C. La linéarisation est contrôlée sur gel d'agarose 1%. Le plasmide linéarisé est extrait par le phénol (200 µl), agité et centrifugé (3 min ; 2500 rpm). La phase supérieure est récupérée et on y ajoute 220 µl d'acétate d'ammonium 4 M et 880 µl d'éthanol 100%. L'ensemble est placé une nuit à -20°C. Le plasmide linéarisé est ensuite centrifugé (30 min ; 12000 g ; 4°C), lavé à l'éthanol, centrifugé (15 min ; 12000 g ; 4°C), séché et repris dans 50 µl d'eau stérile.

#### *Retrotranscription*

La région du plasmide contenant l'insert est ensuite retrotranscrit par la T7 (TrkA) ou la SP6 (p75) polymérase (RiboMAX<sup>TM</sup> large scale RNA Production Systems, Promega) : Buffer 5X 50 µl ; rNTPs 50 µl ; ADN plasmidique 50 µl ; Mix 25 µl ; H<sub>2</sub>O 75 µl ; 3 h à 37°C. Le produit de la retrotranscription est ensuite traité à la DNase (RNase A : 2 unités/µg d'ADN) 15 min à 37°C.

### *Extraction de l'ARN du Mimic*

Après traitement à la DNase, on ajoute un volume de phénol / chloroforme / alcool isoamyllique (25/24/1), on agite 1 mn, on centrifuge (2 min ; 12000 g ; 4°C) et on transvase la phase aqueuse supérieure dans un nouveau tube avec un volume de chloroforme / alcool isoamyllique (24/1). On agite 1 mn et on centrifuge (2 min ; 12000 g ; 4°C). 1/10 acétate d'ammonium 3M et 1 volume d'isopropanol sont ajoutés au surnageant (~200 µl). Après au moins une heure à -20°C et lavage à l'éthanol, le culot est repris dans 200 µl d'H<sub>2</sub>O DEPC, puis la concentration en ARN est déterminée par mesure de la DO à 260 nm. Le nombre de copies d'ARNc est calculé grâce à la masse moléculaire des fragments de TrkA, p75 et TBP contenus dans le plasmide et au nombre d'Avogadro. Une solution contenant 10<sup>16</sup> molécules/µl est préparée, aliquotée, conservée à -80°C et utilisée pour réaliser les dilutions ultérieures.

### *3) Reverse transcription-polymerase chain reaction.*

La transcription inverse et la PCR sont réalisées en une seule étape (one-step) comme précédemment décrit par Pawlowski *et al.* (sous presse). Le mélange de réaction (50 µl de volume final) contient 50 ng d'ARN totaux de lignées cellulaires ou d'échantillons de tumeurs, du tampon TaqMan 10X (5µl) (500 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 100 mM tris HCl, pH 8.3, 600 nM ROX, qui est un dérivé de la rhodamine utilisé comme référence interne passive pour normaliser la fluorescence), 6 mM MgCl<sub>2</sub> pour TrkA, 3 mM pour p75 et 5 mM pour TBP, 20 unités d'inhibiteur de RNase (Perkin Elmer), 12.5 unités de transcriptase inverse MuLV (Promega), 1.25 unités d'ADN polymérase AmpliTaq Gold, 300 µM de dATP, dCTP, dGTP, 600 µM de dUTP, 200 nM d'amorces sens et antisens, 200 nM de sonde. La transcription inverse est à 48°C pendant 30 min. L'ADN polymérase AmpliTaq Gold est alors activée par chauffage à 95°C pendant 10 min. Suivant les recommandations du fabricant, un protocole de PCR à deux températures, comprenant une étape de dénaturation et une étape combinant hybridation et élongation, est mené de la façon suivante : 15 sec à 95°C et 90 sec à 60°C pendant 40 cycles.

Nous avons utilisé l'expression de l'ARNm codant la TATA box-binding protein (TBP, un composant du DNA-binding protein complex TFIID) pour normaliser le niveau d'expression des ARNm de TrkA et p75. Ainsi, l'expression normalisée de TrkA et p75

correspond au rapport entre l'expression de TrkA ou de p75 (nombre de copies) et celle de TBP (nombre de copies).

Un contrôle sans échantillon est inclus dans chaque expérience. Les contrôles sans échantillon, les dilutions du standard d'ARN, et les échantillons de tumeurs sont analysés en duplicate.

Après la RT-PCR, on vérifie qu'une bande unique à 102 pb pour TrkA, 147 pb pour p75 ou 89 pb pour TBP est visible après électrophorèse sur gel d'agarose.

#### *4) Analyse et expression des données de la RT-PCR en temps réel.*

##### *Mesure de la quantité d'ARNm*

La mesure de la quantité d'ARNm dans un échantillon inconnu est réalisée grâce à une courbe étalon préparée à partir de dilutions d'une quantité connue des ARN standards respectifs. Pour chaque dilution, le logiciel Abi-Prism 7700 génère une courbe d'amplification en temps réel construite en rapportant l'intensité du signal fluorescent ( $\Delta Rn$ ) au nombre de cycle. La valeur  $\Delta Rn$  correspond à la variation de l'intensité de fluorescence du rapporteur avant et après la PCR, normalisée d'après la fluorescence de la référence interne passive présente dans le tampon (ROX).

Le nombre de cycles auquel une augmentation significative du signal fluorescent est détectable est défini comme seuil (cycle threshold, Ct). Grâce à des dilutions successives de l'ARN standard, la courbe étalon est générée sur la base d'une relation linéaire existant entre la valeur Ct et le logarithme de la quantité de départ (Higuchi *et al.*, 1993). La quantification dans un échantillon inconnu est réalisée par le logiciel qui calcule la valeur Ct pour chaque échantillon et détermine alors la quantité initiale d'ARNm grâce à la courbe étalon.

##### *Analyses statistiques.*

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au programme SPSS (Version 9.0.1). Les relations entre variables qualitatives ont été déterminées grâce au test du  $\chi^2$  (avec corrections de Yates, lorsque cela s'avérait nécessaire). Les corrélations entre paramètres ont été estimées d'après le test non paramétrique de Spearman. Les survies globales (overall survival : OS) et sans récidives (relapse-free survival : RFS) ont été analysées d'après la méthode de Kaplan Meier. La comparaison entre les courbes est réalisée grâce au test du "log

rank". La méthode de régression de Cox (risque relatif) (Cox, 1972) a été utilisée pour estimer la signification pronostique des paramètres associés.

## II.7. ETUDE DU ROLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NF-κB DANS L'EFFET ANTI-APOPTOTIQUE DU NGF

### 1) *Méthodologie.*

La méthodologie utilisée pour mettre en évidence le rôle de NF-κB dans la signalisation de p75 induite par le NGF a été dans un premier temps d'inhiber la sauvegarde par le NGF des cellules apoptotiques traitées par le C2 en utilisant un inhibiteur spécifique de NF-κB, le SN50 (Tebu). Dans un second temps, nous avons mesurer l'activation de NF-κB en présence de NGF, c'est-à-dire observer la translocation de NF-κB dans le noyau. Pour cela, nous avons réalisé une électrophorèse suivie d'une immunorévélation avec un anticorps anti-NF-κB p65 sur des préparations d'extraits nucléaires de cellules traitées par le C2 et le NGF. Dans un troisième temps, nous avons réalisé des transfections avec des membres de la famille NF-κB, afin de savoir si la forme active de NF-κB (c-rel ou relA) est capable de mimer les effets du NGF et si un mutant dominant-négatif de IκB $\alpha$  peut inhiber l'effet anti-apoptotique du NGF.

### 2) *Transfactions*

Les cotransfections ont été réalisées grâce au Lipofectin reagent (GibcoBRL). Le plasmide exprimant un mutant dominant-négatif de IκB $\alpha$  contenant une substitution Ser/Ala au niveau des résidues 32 et 36 nous a été fourni par le Dr Jean Feuillard (UPRES EA 1625, Bobigny, France). Les cDNA de p65 (rel-A) et c-rel ont été clonés dans les sites ecoRI du plasmide d'expression PSVK3. Tous les vecteurs ont été obtenus auprès du Dr Pascale Crépieux (Mc Gill University, Montreal, ).

Les cellules sont ensemencées à la concentration de 200 000 / boîte de Pétri de 35 mm de diamètre contenant une lamelle recouverte de collagène en présence de MEM SVF10%.

Après 24 h, les cellules sont rincées puis incubées 5 h dans 1 ml de milieu pour transfection OptiMEM (GibcoBRL) contenant 8 µl de Lipofectin reagent, 0.8 µg de vecteur contenant la green fluorescent protein (GFP) (Clontech ) et 0.2 µg de vecteur vide PCDNA3 ou 0.2 µg de vecteur PCDNA3 exprimant le mutant dominant-négatif de IκB $\alpha$  (IκBm). Dans le cas de c-rel ou rel-A, les cellules sont cotransférées avec 0.8 µg de GFP et 0.6 µg de PSVK<sub>3</sub> (plasmide vide), c-rel ou rel-A. Les cellules sont alors cultivées 24 h dans du MEM SVF10% puis rincées 2 h dans du milieu sans sérum avant incubation dans du milieu sans sérum en présence ou en absence de 100 ng/ml de NGF (R&D Systems) et/ou 2 µM de C2 (Sigma) pendant encore 24 h. Les cellules sont alors fixées dans du paraformaldéhyde 4% (4°C) pendant 30 min et montées dans le glycergel. Le pourcentage de noyaux cellulaires apoptotiques dans la population de cellules marquées par la GFP est déterminé comme décrit plus haut.

## Annexe 2 : Article 5

**Differential regulation of FGF-1 and -2 mitogenic activity is related to their kinetics of binding to heparan sulfate in MDA-MB-231 human breast cancer cells.**

Cet article a été publié dans la revue: "Biochemical and Biophysical Research Communication", (vol. 267, pp 770-776).

## Differential Regulation of FGF-1 and -2 Mitogenic Activity Is Related to Their Kinetics of Binding to Heparan Sulfate in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells

David G. Fernig,\* Hai-Lan Chen,\* Hassan Rahmoune,\* Simon Descamps,†  
Benoni Boilly,† and Hubert Hondermarck†<sup>1</sup>

\*School of Biological Sciences, Life Sciences Building, University of Liverpool, Crown Street, Liverpool L69 7ZB, United Kingdom; and †Equipe Facteurs de Croissance, UPRES EA1033 Biologie du Développement, Université de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Received November 17, 1999

The growth of the malignant human mammary MDA-MB-231 cells is stimulated by fibroblast growth factor-1 (FGF-1) but not by FGF-2. When these cells are cultured in the presence of chlorate, an inhibitor of heparan sulfate (HS) sulfation, their proliferation is stimulated by both FGF-1 and FGF-2. We analyzed the interactions of FGF-1 and FGF-2 with HS purified from the cell layer and the culture medium of control and chlorate-treated MDA-MB-231 cells. The HS from the cell layer bound FGF-1 with faster association kinetics than the HS from the culture medium, and so had a higher affinity for FGF-1. Chlorate treatment had no significant effect on the FGF-1 binding kinetics of the HS. In contrast to FGF-1, chlorate treatment of the cells significantly altered the FGF-2 binding kinetics. The HS from untreated cells possessed two binding sites for FGF-2, one with fast association kinetics ( $k_{on}$  470,000 to 610,000 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) and a high affinity ( $K_d$  46 to 70 nM) and one with slower association kinetics ( $k_{on}$  74,000 to 100,000 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) and a lower affinity ( $K_d$  290 to 400 nM). HS from chlorate-treated cells possessed just a single binding site for FGF-2 with fast association kinetics ( $k_{on}$  270,000 to 290,000 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) and a high affinity ( $K_d$  41 to 57 nM). These results show that there is a relationship between the binding kinetics of FGFs and their ability to stimulate cell growth. © 2000 Academic Press

The fibroblast growth factors (FGF), a family of heparan sulfate (HS)-binding polypeptides, play im-

Abbreviations used: FGF-1 fibroblast growth factor-1, acidic fibroblast growth factor; FGF-2, fibroblast growth factor-2 basic FGF; FGFR, fibroblast growth factor receptor; HS, heparan sulfate; PBS, phosphate-buffered saline, 137 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; PBST, PBS with 0.02% (v/v) Tween 20, pH 7.2.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Fax: 33(3)20434038. E-mail: Hubert.Hondermarck@univ-lille1.fr.

portant roles in the stimulation of cell migration and cell division in the course of the development of multicellular organisms, and in mammals they also play a pivotal role in adult tissue repair (1, 2). In the mammary gland at least two FGFs, FGF-1 (acidic FGF) and FGF-2 (basic FGF) have been suggested to stimulate the growth of the mammary ductal tree (3–6). In breast cancers these FGFs are expressed ectopically by about 20% of malignant epithelial cell lines and human malignant tumors, where they are likely to be involved in the stimulation of cancer cell proliferation and angiogenesis (7, 8).

FGF-2 and FGF-1 interact with two types of receptors: tyrosine kinase receptors termed FGFRs and HS proteoglycans (1). The interaction of FGF-2 with the HS receptor is dependent upon the presence of a specific pattern of sulfation and epimerization of glucuronic acid to iduronic acid in a subdomain of the polysaccharide, and it would appear that FGF-1 and FGF-2 recognize different structures within HS (9–16). The interaction of FGF-2 and FGF-1 with the HS receptor regulates both the local bioavailability of the growth factors (6, 17) and the activation of the tyrosine kinase activity of the FGFR by the ligand (18, 19). Moreover, at least some forms of HS interact not only with the FGF ligand, but also with the FGFR (20), which may determine, at least in part, the specificity of the FGF-FGFR interaction (21).

A number of studies also suggest that there exist forms of the HS receptor for FGF-2 which are inhibitory and therefore the presence of a FGF-2-binding HS does not guarantee a growth response (22–26). For example, the malignant MDA-MB-231 human breast cancer cells possess FGFRs and HS receptors for FGF-2, and yet are refractory to stimulation by this growth factor (27). The inability of these cells to respond to FGF-2 appears to result from the pattern of

sulfation of their HS receptors, since they can be switched into FGF-2-responsive cells simply by reducing the overall level of sulfation of their HS, using a mild chlorate treatment (23).

In the present study we have used the MDA-MB-231 cells, which can be switched from a FGF-2-unresponsive to a FGF-2-responsive state, to determine whether there is a relationship between the FGF-2-binding kinetics of HS and the ability of FGF-2 to stimulate cell growth.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

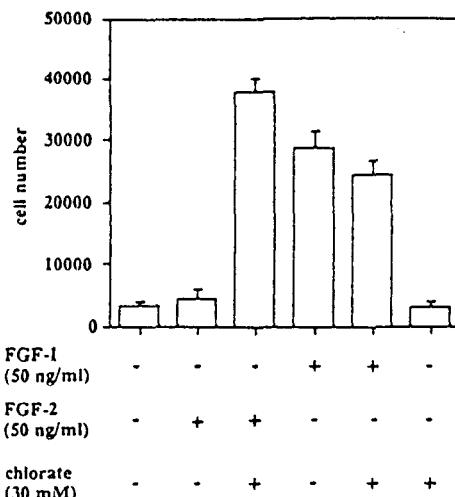
**Materials.** Human recombinant FGF-1 and FGF-2 were prepared as described previously (28, 29). Chondroitinase ABC, pronase and micrococcal nucleases were obtained from Sigma (Poole, UK). Sialidase enzyme collection (EC 3.2.1.18) was from Oxford GlycoScience (Oxford, UK) and endo- $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.03) and bovine pancreatic RNase were from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Eagle's minimal essential medium as well as fetal calf serum and insulin were from BioWhittaker, NaClO<sub>3</sub>, from Prolabo (France).

**Cell growth assay.** The human breast tumor cell line MDA-MB-231 was cultured in Eagle's medium containing 5% heat-inactivated fetal calf serum, 20 mM HEPES, 2 g/l sodium bicarbonate, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 10  $\mu$ g/ml gentamycin sulfate, and 0.6  $\mu$ g insulin (23). For growth assays, cells were seeded at 60,000 cells/35-mm petri dish and maintained in complete medium for 24 h. The exponentially-growing cells were washed twice and cultured for another 24 h in fresh serum-free medium containing fibronectin (2  $\mu$ g/ml) and transferrin (30  $\mu$ g/ml). Then, FGF-1 or FGF-2 were added at various concentrations (0 to 400 ng/ml) in the serum-free medium and the cells were incubated for 48 h. Cells were harvested by trypsinization and counted using a hemacytometer. Cell morphology and viability were assessed by microscopic examination before each measurement. In some experiments, 30 mM chlorate was included in the culture medium. Under these conditions, the inhibition of sulfation of HS is only partial (23).

**Preparation of HS.** HS chains were purified as peptidoglycans from MDA-MB-231 cells by anion-ion change chromatography on Diethylaminoethyl Sepharose Fast Flow (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and enzymatic digestion of anionic contaminants as described. The HS chain are 90–96% pure (30). The HS chains were biotinylated on the amino group(s) of the residual peptide using N-hydroxysuccinimide amino caproate (LC) biotin (Pierce-Warriner, Chester, UK) in dimethylsulfoxide for 72 h, and unreacted biotin was removed by fractionation on a Sephadex G-25 column (1  $\times$  25 cm). Under these conditions, 90% to 97% of the biotin is linked to the peptide moiety of the peptidoglycan (30).

**Binding assays.** Binding reactions were carried out at 20°C in an Asys resonant mirror biosensor (Affinity Sensors, Saxon Hill, Cambridge, UK) using streptavidin-derivatized 3-dimensional carboxymethyl dextran and planar aminosilane surfaces (30). Binding parameters were calculated from the association and dissociation phases of the binding reactions using the non-linear curve fitting BestFit software (Affinity Sensors) provided with the instrument. FGF-1 and FGF-2 did not bind to the streptavidin-derivatized surfaces (30).

Analysis of binding kinetics in optical biosensors may generate artefactual second phase binding sites (e.g., 31, 32). This artifact has two principle sources. The first occurs when the rate of diffusion of the soluble ligand from the bulk, stirred solution, through the boundary layer of immobile solution which exists next to the surface of the sensor, is equivalent or slower than  $k_{on}$ . In this case, after the initial



**FIG. 1.** Effect of FGF-1 and FGF-2 on MDA-MB-231 cell growth. MDA-MB-231 cells were seeded at 60,000 cells/35 mm diameter culture dish. After 24 h in the complete medium and starvation in serum-free medium for 24 h, FGF-1 or FGF-2 was added at the indicated concentrations for a 48 h period. Cells were counted (after trypsin release) using a hemacytometer. For sodium chloride treatment, 30 mM chloride was present in culture medium at all stages of the growth assay from cell seeding to cell counting. Values are the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations.

rapid depletion of soluble ligand from the solution near the surface, the observed association kinetics reflect diffusion rates rather than association rates (32). The second results from the steric hindrance of binding sites that arises when the immobilized ligand is at high density and/or randomly oriented and is most prominent on three-dimensional carboxymethyl dextran surfaces (31). Four steps were taken to avoid these possible artifacts. First, in some experiments the minimum amount of HS required to give a useful signal was immobilized, the equivalent of 0.05 ng and 0.15 ng FGF-2 binding sites per mm<sup>2</sup> on carboxymethyl dextran and on aminosilane surfaces, respectively. Second, since HS chains were immobilized as peptidoglycans through their peptide moiety, immobilization was oriented rather than random, thus reducing steric hindrance between the surface and the HS. Third, since  $k_{on}$  depends directly on concentration, concentrations of FGF-2 were kept as low as possible to reduce the possibility of the rate of diffusion controlling the FGF-2-HS binding reaction. Fourth, for the experiments with FGF-2 both three-dimensional carboxymethyl dextran and planar aminosilane surfaces were employed, since diffusion into the bulk phase is faster with the latter surface (31).

## RESULTS

### Effect of FGF-1 and FGF-2 on the Proliferation of MDA-MB-231 Cells

FGF-2 has no effect on the proliferation of MDA-MB-231 cells at any of the concentrations tested (up to 400 ng/ml, result not shown) (Fig. 1). However, as previously described (23), mild treatment with chlorate switches the MDA-MB-231 cells into a FGF-2 responsive state. This effect was only observed for chlorate concentrations between 10 and 30 mM (23). In marked

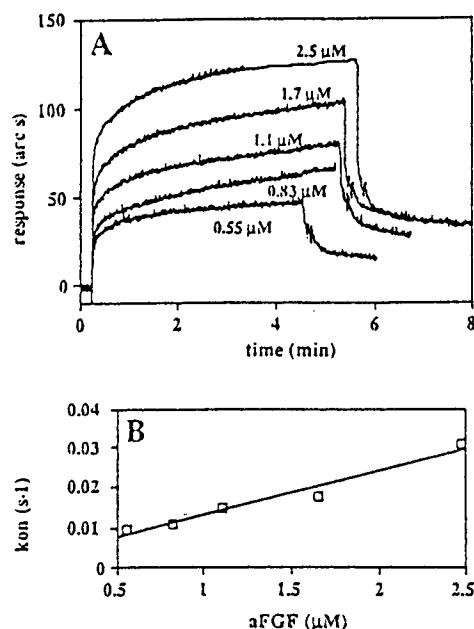


FIG. 2. Binding of FGF-1 to HS. HS purified from the culture medium of MDA-MB-231 grown in the presence of 30 mM chlorate was biotinylated and immobilized on a streptavidin-aminosilane surface. (A) Following the addition of FGF-1 to the biosensor cuvette, the binding of FGF-1 was followed in real-time for at least 4 min. The cuvette was then quickly washed three times with 200  $\mu$ l PBST and the dissociation of bound FGF-1 into 200  $\mu$ l PBST was followed over the next 1–2 min. For clarity, the dissociation curve of 0.83  $\mu$ M FGF-1 has been omitted. (B) A plot of  $k_{on}$  against ligand concentration, the slope of which is the association rate constant,  $k_{ass}$ . The  $k_{on}$  of FGF-1 for HS at each concentration of FGF-1 was determined using the FastFit software.

contrast, the growth of untreated MDA-MB-231 cells was stimulated by FGF-1. Moreover, treatment of the cells with chlorate did not affect their growth response to FGF-1 (Fig. 1). This result demonstrates that the effect of 30 mM chlorate was specific for FGF-2 and did not result in a wholesale reduction in the sulfation of HS, as observed under more stringent conditions (30, 33). Previous results, using HS purified from a series of rat and human mammary cell lines, have suggested that HS which prevents the delivery of a growth-stimulatory signal by FGF-2 possessed different FGF-2 binding kinetics to HS which activated this growth factor (30). Therefore we examined the FGF-1 and FGF-2 binding kinetics of HS from untreated and chlorate-treated MDA-MB-231 cells.

#### Kinetics of Binding of FGF-1 to HS

FGF-1 bound HS slowly (Fig. 2). The rapid rise in signal observed in the initial 3–5 s mixing phase of the association reaction was due to the difference in the refractive indices of PBST and PBST containing FGF-1, since relatively high concentrations of FGF-1

were required to produce a signal. With all four samples of HS, the association binding reactions at all concentrations of FGF-1 were monophasic. In other words, there was no evidence for more than one binding site for FGF-1 in the HS (Table 1). Analysis of the FGF-1 binding data revealed that there was a single binding site for FGF-1 in the HS from the MDA-MB-231 cells, with an association rate constant of 33,000  $M^{-1} s^{-1}$  and a dissociation rate constant of 0.024  $s^{-1}$  (Table 1). Consequently the  $K_d$  of this interaction was 0.73  $\mu$ M. The HS from the culture medium of MDA-MB-231 cells possessed a slower association rate constant, but the same dissociation rate constant as the cellular HS, and therefore its affinity for FGF-1 was lower.

The HS purified from cells treated with chlorate possessed the same FGF-1 binding kinetics as the HS from control, untreated cells (Table 1). The HS isolated from the culture medium of the chlorate-treated cells had the same association rate constant for FGF-1 as the HS from the culture medium of control cells, but a slightly faster dissociation rate constant. Consequently the affinity of this interaction was ( $K_d$  4  $\mu$ M) was lower than that between FGF-1 and the corresponding HS from untreated cells (Table 1).

#### Kinetics of Binding of FGF-2 to HS

The binding of FGF-2 to HS purified from the MDA-MB-231 cells and the culture medium of these cells was characterized by an initial fast phase and a slower second phase (Fig. 3). Analysis of the association phase

TABLE I  
Kinetics of FGF-1 Binding to HS Purified  
from MDA-MB-231 Cells

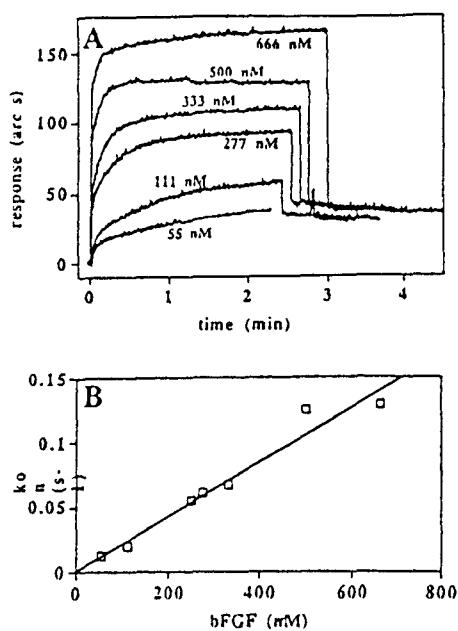
Source of HS	$k_{ass}(1) (M^{-1} s^{-1})^a$	$r^b$	$K_d(1) (\mu M)^c$	$k_{diss}^d$
MDA-MB-231				
Cells	$33,000 \pm 5000$	0.98	$0.73 \pm 0.27$	$0.024 \pm 0.008$
Medium	$12,000 \pm 3400$	0.92	$1.5 \pm 0.8$	$0.017 \pm 0.008$
MDA-MB-231 grown in 30 mM NaClO <sub>1</sub>				
Cells	$36,000 \pm 8000$	0.97	$0.79 \pm 0.43$	$0.028 \pm 0.014$
Medium	$14,000 \pm 3000$	0.97	$4.0 \pm 1.0$	$0.056 \pm 0.008$

<sup>a</sup> The SE is derived from the deviation of the data from a one-site binding model, calculated by matrix inversion using the FastFit software provided with the instrument (Experimental Procedures). No evidence was found for a two-site model of association and so the FGF-1 binding sites in each sample of HS were homogenous in this respect. The value for  $k_{ass}$  is the combined value from at least two determinations.

<sup>b</sup> The correlation coefficient of the linear regression through the values of  $k_{on}$  for the binding model.

<sup>c</sup>  $K_d$  was calculated from the ratio of  $k_{diss}/k_{ass}$  and the SE is the combined SE of the two kinetic parameters.

<sup>d</sup> The  $k_{diss}$  is the mean  $\pm$  SE of at least six values, obtained at high concentrations ( $>1 \mu M$ ) of FGF-1.



**FIG. 3.** Binding of FGF-2 to HS. HS purified from the culture medium of MDA-MB-231 grown in the presence of 30 mM chlorate was biotinylated and immobilized on a streptavidin-aminosilane surface. (A) Following the addition of FGF-2 to the biosensor cuvette, the binding of FGF-2 was followed in real time for at least 2.5 min. The cuvette was then quickly washed three times with 200  $\mu$ l PBST and the dissociation of bound FGF-2 into 200  $\mu$ l PBST was followed over the next 2 min. For clarity, the data for 55 nM FGF-2 have been truncated at 2.25 min. (B) A plot of  $k_{on}$  against ligand concentration, the slope of which is the association rate constant,  $k_{ass}$ . The  $k_{on}$  of FGF-2 for HS at each concentration of FGF-2 was determined using the FastFit software.

of the binding reaction indicated that the HS possessed two distinct classes of binding sites for FGF-2. One site had a fast association rate constant, ranging between 470,000 and 610,000  $M^{-1} s^{-1}$ . The second binding site possessed a slower association rate constant, which ranged from 74,000 to 100,000  $M^{-1} s^{-1}$ . This result was obtained regardless of the surface used, 3-dimensional carboxymethyl dextran or planar aminosilane, at low immobilization densities of FGF-2-binding sites and at low concentrations of FGF-2. Moreover, hepatocyte growth factor/scatter factor, which has a molecular weight 4.5-fold greater than FGF-2 and so a correspondingly slower rate of diffusion, binds HS and dermatan sulfate monophasically with values of  $k_{ass}$  up to 20-fold faster than those observed with FGF-2 (33). Therefore it seems unlikely that the biphasic association kinetics observed with FGF-2 are due to a diffusion or a steric hindrance artefact. Analysis of the dissociation phase of the binding reaction indicated that there was a single dissociation rate constant of 0.021  $s^{-1}$ . Thus, the two classes of binding site identified in the analysis of the association phase of the binding reacted were governed by the same dissociation

rate. Therefore the binding site in the HS with a fast association rate constant for FGF-2 has a high affinity ( $K_d$  46 to 70 nM) for the growth factor. This binding site is analogous to that described previously for HS purified from a series of rat and human mammary cells (30), which possessed an association rate constant that ranged between 320,000 and 520,000  $M^{-1} s^{-1}$  and is therefore classified as "fast/high." The binding site in the HS with a slow association rate constant for FGF-2 is of lower affinity,  $K_d$  290 to 400 nM and is again analogous to that observed previously (30) and is thus termed "slow/low."

The HS purified from the MDA-MB-231 cells cultured in the presence of 30 mM chlorate possessed just one class of binding site for FGF-2. This binding site exhibited fast association kinetics and had an association rate constant of 290,000  $M^{-1} s^{-1}$ . The HS purified from the culture medium of the MDA-MB-231 cells cultured in the presence of chlorate also possessed a single binding site for FGF-2 with a fast association rate constant which was similar to that identified for the cellular HS (Table 2). The dissociation rate constant of FGF-2 for both samples of HS was very similar and ranged from 0.011 to 0.016  $s^{-1}$ . The affinity of these binding sites for FGF-2 was high ( $K_d$  41–57 nM) and they are therefore also classed as fast/high.

## DISCUSSION

To stimulate cell growth, FGF-2 must interact with both its tyrosine kinase and its HS receptors. However, HS that is able to bind FGF-2 does not always activate the growth factor and allow it to stimulate cell proliferation. HS that inhibits the growth-stimulatory activity of FGF-2 has been observed in a number of different biological systems, including brain (25, 34), mammary gland (23, 30), endothelial cells (24) and in wound healing (26). One such system, the MDA-MB-231 breast cancer cell line, provides a unique homogenous experimental model to explore the differences between HS which activates and inhibits FGF-2, since these cells can readily be switched from a FGF-2 unresponsive to a FGF-2 responsive state (23). Thus the human MDA-MB-231 cells are normally refractory to the growth-stimulatory effects of FGF-2 and the HS purified from these cells does not activate FGF-2 in HS-deficient cells. In contrast, when the MDA-MB-231 cells are treated with chlorate under conditions where the inhibition of sulfation is only partial, FGF-2 is able to stimulate their growth. HS from the chlorate-treated MDA-MB-231 cells is also able to activate FGF-2 in HS-deficient cells.

The first set of experiments (Fig. 1) show that in marked contrast to FGF-2, the mild treatment of the MDA-MB-231 cells with chlorate does not alter their growth response to FGF-1. This result demonstrates

TABLE 2  
Kinetics of FGF-2 Binding to HS Purified from MDA-MB-231 Cells

Source of HS	$k_{diss}(1)$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$r^b$	$K_d(1)$ (nM) <sup>c</sup>	$k_{diss}(2)$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$r^b$	$K_d(2)$ (nM) <sup>d</sup>	$k_{diss}$ <sup>e</sup>
MDA-MB-231							
Cells	470,000 ± 120,000	0.94	46 ± 16	74,000 ± 22,000	0.94	290 ± 110	0.021 ± 0.005
Medium	610,000 ± 230,000	0.93	70 ± 43	100,000 ± 42,000	0.94	400 ± 250	0.042 ± 0.021
MDA-MB-231 grown in 30 mM NaClO <sub>3</sub>							
Cells	290,000 ± 59,000	0.96	57 ± 18	ne <sup>f</sup>	ne <sup>f</sup>	ne <sup>f</sup>	0.016 ± 0.002
Medium	270,000 ± 51,000	0.96	41 ± 16	ne <sup>f</sup>	ne <sup>f</sup>	ne <sup>f</sup>	0.011 ± 0.004

<sup>a</sup> The SE is derived from the deviation of the data from a one-site model or from the first and second sites of a two site binding model, and was calculated by matrix inversion using the FastFit software provided with the instrument (Experimental Procedures). For each set of values of  $k_{diss}$ , the resulting values for  $k_{diss}$  and their associated SE were combined. Data are from at least two experiments on carboxymethyl dextran surfaces and one on a planar aminosilane surface. The likelihood of a two-site model describing the association phase of the binding reaction was determined by four parameters of "goodness of fit," as described previously (Fernig *et al.*, 1992). First, if a one-site model could not fit the data, a two-site model was favored. Second, a direct statistical comparison of "goodness of fit" of a one-site model and a two-site model was made for each data set using the *F* statistic; a two-site model was favored at a probability below 0.005. Third, the randomness of the distribution of the data about the model was examined; a two-site model was favored over a one-site model when the data were nonrandomly distributed about the latter. Fourth, the model had to yield realistic values, e.g., a positive value of  $k_{diss}$  at all concentrations of FGF-2.

<sup>b</sup> The correlation coefficient of the linear regression through the values of  $k_{diss}$  for the appropriate binding model.

<sup>c</sup>  $K_d(1)$  was calculated from the ratio of  $k_{diss}/k_{diss}(1)$  and the SE is the combined SE of the two kinetic parameters. For association phase data that fit a one-site model, the value of  $k_{diss}$  was used. In the case of association phase data fitting a two-site model the value of  $k_{diss}(1)$  was used.

<sup>d</sup>  $K_d(2)$  was calculated from the ratio of  $k_{diss}/k_{diss}(2)$  and the SE is the combined SE of the two kinetic parameters. For association phase data that fitted a one-site model there is no  $k_{diss}(2)$  and hence no  $K_d(2)$ .

<sup>e</sup> The  $k_{diss}$  is the mean ± SE of at least six values obtained at high concentrations (>500 nM) of FGF-2.

<sup>f</sup> ne, no evidence.

that the HS is able to regulate differently the growth-stimulatory response of MDA-MB-231 cells to FGF-1 and FGF-2, as has been found in other systems (21, 26, 34, 30, 35).

The HS chains purified from control and chlorate-treated cultures of MDA-MB-231 cells represent the population of HS on the cells, which would normally bind FGF-1 or FGF-2 added to the culture medium in a growth assay. Analysis of the kinetics of binding of FGF-1 to these populations of HS shows that there is little difference between the FGF-1 binding kinetics of HS purified from untreated MDA-MB-231 cells and from chlorate-treated cells. This result agrees with that of the growth assays and indicates that the chlorate treatment has had little effect on the structures in the HS that bind FGF-1.

In marked contrast to FGF-1, the binding of FGF-2 to these populations of HS reveals a striking difference between untreated and chlorate-treated cells. The HS from the untreated cells possesses two distinct classes of binding site for FGF-2, one fast/high, the other slow/low. The HS from the chlorate-treated cells possesses just a single fast/high binding site for FGF-2. This result correlates with the ability of FGF-2 to stimulate cell proliferation in untreated and chlorate-treated MDA-MB-231 cells, respectively. Thus, the presence of both a fast/high and a slow/low binding site for FGF-2 in a population of HS chains results in the bound FGF-2 being unable to deliver a growth-stimulatory signal to the cells, whereas, the presence of just a

single fast/high binding site in the HS enables FGF-2 to stimulate the growth of the MDA-MB-231 cells.

Previous work has indicated that HS with two binding sites, one fast/high the other slow/low, also prevented the stimulation of cell growth by FGF-2, whereas HS with a single slow/low binding site was activating (30). One interpretation of the latter result was that it was the fast/high binding site which was responsible for the inhibition of the growth-stimulatory activity of FGF-2 by the HS. The single fast/high binding site observed in HS purified from chlorate-treated MDA-MB-231 cells has an association rate constant which is about half that of the fast/high binding site in the HS from control MDA-MB-231 cells (Table 2), but which is nevertheless in the range of fast/high binding sites observed in HS from other mammary cells (30). Therefore, the present results suggest that it is not the presence of the fast/high binding site for FGF-2 in itself which is inhibitory, but the combined presence of the fast/high and the slow/low binding sites. The key feature of HS which activates FGF-2 is that it only contains a single class of binding site and this site may have either a slow or a fast association rate constant. In both a series of mammary cell lines (30), and now in a human mammary cell line which can be switched between a FGF-2 sensitive and a FGF-2 insensitive state, there is a clear association between the FGF-2-binding kinetics and the ability of the HS to promote or inhibit the growth-stimulatory activity of this growth factor. Therefore, the ob-

servation that HS with a single binding site promotes the growth-stimulatory activity of FGF-2, whereas HS with two binding sites for FGF-2 is inhibitory may be a more general observation applicable to other biological systems, e.g., brain, wound healing and 3T3 fibroblasts (26, 34, 35). Recently, a study has indicated that a degree of FGF-ligand specificity for the different FGFRs is imparted by HS (21). While the present results do not directly support this contention, one interpretation of the discrimination between FGF-1 and FGF-2 by HS from untreated and chlorate-treated MDA-MB-231 cells is that the inhibitory HS with two binding sites for FGF-2 prevents an interaction with the FGFR that is conducive to cell proliferation.

Heparinase III treatment of HS releases highly sulfated oligosaccharides (36). Interestingly, when inhibitory HS is cleaved by heparinase III, the resulting oligosaccharides have been shown to activate, rather than inhibit, FGF-2 (26, 30). The ability of treatment with heparinase III to convert the inhibitory HS chains into activating oligosaccharides raises the possibility that a hitherto unrecognized glucuronic acid-containing region of the HS chain may play an important role in the structure of the two binding sites in the inhibitory HS. In addition, endogenous heparanases (26, 37-39) may play a critical role in mobilizing latent FGF-2 (5, 17, 40) stored on inhibitory HS in the course of normal development, in wound healing and in cancer. The advent of sequencing strategies for HS chains (41-44) now opens up the exciting possibility of determining directly the structure of the HS chains found in mammary and other cell systems that activate and inhibit the activity of FGF-2.

#### ACKNOWLEDGMENTS

D.G.F. was a USTL-supported visiting professor. We thank Affinity Sensors for the loan of an IAsys biosensor. We thank the Cancer and Polio Research Fund, the Ligue National Contre le Cancer (Comité du Nord), the FEGEFLUC, the Medical Research Council, the Mizutani Foundation for Glycoscience, the Royal Society and the North West Cancer Research Fund for financial support.

#### REFERENCES

- Fernig, D. G., and Gallagher, J. T. (1994) *Prog. Growth Factor Res.* **5**, 353-377.
- McKeehan, W. L., Wang, F., and Kan, M. (1998) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **59**, 135-176.
- Barraclough, R., Fernig, D. G., Rudland, P. S., and Smith, J. A. (1990) *J. Cell. Physiol.* **144**, 333-344.
- Colemankrnacik, S., and Rosen, J. M. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 218-229.
- Rudland, P. S., Platt-Higgins, A. M., Wilkinson, M. C., and Fernig, D. G. (1993) *J. Histochem. Cytochem.* **41**, 887-898.
- Rudland, P. S., Barraclough, R., Fernig, D. G., and Smith, J. A. (1996) *Stem Cells and Cancer*, pp. 147-232, Churchill Livingstone, London.
- Anandappa, S. Y., Winstanley, J. H. R., Leinster, S., Green, B., Rudland, P. S., and Barraclough, R. (1994) *Br. J. Cancer* **69**, 772-776.
- Relf, M., LeJeune, S., Scott, P. A. E., Fox, S., Smith, K., Leek, R., Moghaddam, A., Whitehouse, R., Bicknell, R., and Harris, A. L. (1997) *Cancer Res.* **57**, 963-969.
- Guimond, S., Maccarana, M., Olwin, B. B., Lindahl, U., and Rapraeger, A. C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23906-23914.
- Ishihara, M. (1994) *Glycobiology* **4**, 817-824.
- Ishihara, M., Takano, R., Kanda, T., Hayashi, K., Hara, S., Kikuchi, H., and Yoshida, K. (1995) *J. Biochem. (Tokyo)* **118**, 1255-1260.
- Ishihara, M., Tyrrell, D. J., Stauber, G. B., Brown, S., Cousens, L. S., and Stack, R. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4675-4683.
- Maccarana, M., Casu, B., and Lindahl, U. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23898-23905.
- Turnbull, J. E., Fernig, D. G., Ke, Y. Q., Wilkinson, M. C., and Gallagher, J. T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10337-10341.
- Tyrrell, D. J., Ishihara, M., Rao, N., Horne, A., Kiefer, M. C., Stauber, G. B., Lam, L. H., and Stack, R. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4684-4689.
- Walker, A., Turnbull, J. E., and Gallagher, J. T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 931-935.
- Vlodavsky, I., Barshavit, R., Ishaimichaeli, R., Bashkin, P., and Fuks, Z. (1991) *TIBS* **16**, 268-271.
- Rapraeger, A. C., Kruska, A., and Olwin, B. B. (1991) *Science* **252**, 1705-1708.
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P., and Ornitz, D. M. (1991) *Cell* **64**, 841-848.
- Kan, M. K., Wang, F., Xu, J. M., Crabb, J. W., Hou, J. Z., and McKeehan, W. L. (1993) *Science* **259**, 1918-1921.
- Kan, M., Wu, X. C., Wang, F., and McKeehan, W. L. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 15947-15952.
- Aviezer, D., Levy, E., Safran, M., Svahn, C., Buddecke, E., Schmidt, A., David, G., Vlodavsky, I., and Yayon, A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 114-121.
- Delehedde, M., Deudon, E., Boilly, B., and Hondermarck, H. (1996) *Exp. Cell Res.* **229**, 398-406.
- Forsten, K. E., Courant, N. A., and Nugent, M. A. (1997) *J. Cell. Physiol.* **172**, 209-220.
- Hondermarck, H., Deudon, E., and Boilly, B. (1992) *Dev. Brain Res.* **68**, 247-253.
- Kato, M., Wang, H., Kainulainen, V., Fitzgerald, M. L., Ledbetter, S., Ornitz, D. M., and Bernfield, M. (1998) *Nat. Med.* **4**, 691-697.
- Peyrat, J. P., Bonneterre, J., Hondermarck, H., Hecquet, B., Adenis, A., Louchez, M. M., Lefebvre, J., Boilly, B., and Demaille, A. (1992) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 87-94.
- Ke, Y. Q., Fernig, D. G., Smith, J. A., Wilkinson, M. C., Anandappa, S. Y., Rudland, P. S., and Barraclough, R. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 963-971.
- Ke, Y., Wilkinson, M. C., Fernig, D. G., Smith, J. A., Rudland, P. S., and Barraclough, R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1131**, 307-310.
- Rahmoune, H., Gallagher, J. T., Rudland, P. S., and Fernig, D. G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 7303-7310.
- Edwards, P. R., Gill, A., Pollardknight, D. V., Hoare, M., Buckle, P. E., Lowe, P. A., and Leatherbarrow, R. J. (1995) *Anal. Biochem.* **231**, 210-217.
- Schuck, P. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 541-566.

- 33. Rahmoune, H., Gallagher, J. T., Rudland, P. S., and Fernig, D. G. (1998) *Biochemistry* **37**, 6003–6008.
- 34. Nurcombe, V., Ford, M. D., Wildschut, J. A., and Bartlett, P. F. (1993) *Science* **260**, 103–106.
- 35. Zhou, F. Y., Owens, R. T., Hermoenen, J. M. J., and Hook, M. (1997) *Eur. J. Cell. Biol.* **73**, 166–174.
- 36. Linhardt, R. J., Turnbull, J. T., Wang, H. M., Loganathan, D., and Gallagher, J. T. (1990) *Biochemistry* **29**, 2611–2617.
- 37. Bame, K. J., Hassall, A., Sanderson, C., Venkatesan, I., and Sun, C. (1998) *Biochem. J.* **336**, 191–200.
- 38. Nicolson, G. L., Nakajima, M., Wakabayashi, H., Boyd, D. D., Diaz, D., and Irimura, T. (1998) *Adv. Enzyme Reg.* **38**, 19–32.
- 39. Pikas, D. S., Li, J. P., Vladavsky, I., and Lindahl, U. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 18770–18777.
- 40. Gonzalez, A.-M., Buscaglia, M., Ong, M., and Baird, A. (1990) *J. Cell. Biol.* **110**, 753–765.
- 41. Merry, C. L. R., Lyon, M., Deakin, J. A., Hopwood, J. J., and Gallagher, J. T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 18455–18462.
- 42. Turnbull, J. E., Hopwood, J. J., and Gallagher, J. T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2698–2703.
- 43. Vives, R. R., Pye, D. A., Salmivirta, M., Hopwood, J. J., Lindahl, U., and Gallagher, J. T. (1999a) *Biochem. J.* **339**, 767–773.
- 44. Vives, R. R., Pye, D. A., Salmivirta, M., Hopwood, J. J., Lindahl, U., and Gallagher, J. T. (1999) *Biochem. J.* **340**, 871.

