HAL
open science

Rôles du couple TrkB/BDNF et de l'autophagie dans la survie de cellules de cancer colorectal

Clément Mazouffre

To cite this version:

Clément Mazouffre. Rôles du couple TrkB/BDNF et de l'autophagie dans la survie de cellules de cancer colorectal. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0091 . tel-01501403

HAL Id: tel-01501403

https://theses.hal.science/tel-01501403v1

Submitted on 4 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE ED 524

EA 3842 HOMEOSTASIE CELLULAIRE ET PATHOLOGIES

THESE

Pour l'obtention de grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie-Santé

Option : Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

CLEMENT MAZOUFFRE

Le 12 décembre 2016

Rôles du couple TrkB/BDNF et de l'autophagie dans la survie de cellules de cancer colorectal

Thèse co-encadrée par : **Pr Muriel MATHONNET et Dr Mireille VERDIER**

Soutenue devant le Jury composé de :

Président	**Pr Jacques ROBERT** – Institut Bergonié, INSERM U916, Université Victor Segalen, Bordeaux 2.
Rapporteurs	**Dr Jean-Pierre COUTY** – Institut Cochin, INSERM U1016, Université Paris Descartes, Paris 5.
	Pr Alain MOREL – INSERM U892, Université d'Angers.
Examinateurs	**Pr Muriel MATHONNET** – EA 3842, Université de Limoges.
	Dr Mireille VERDIER – EA 3842, Université de Limoges.
	Dr Aurélie PERRAUD – EA 3842, Université de Limoges.

Université de Limoges

Thèse de doctorat

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE ED 524

EA 3842 HOMEOSTASIE CELLULAIRE ET PATHOLOGIES

THESE

Pour l'obtention de grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie-Santé

Option : Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

CLEMENT MAZOUFFRE

Le 12 décembre 2016

Rôles du couple TrkB/BDNF et de l'autophagie dans la survie de cellules de cancer colorectal

Thèse co-encadrée par : **Pr Muriel MATHONNET et Dr Mireille VERDIER**

Soutenue devant le Jury composé de :

Président	**Pr Jacques ROBERT** – Institut Bergonié, INSERM U916, Université Victor Segalen, Bordeaux 2.
Rapporteurs	**Dr Jean-Pierre COUTY** – Institut Cochin, INSERM U1016, Université Paris Descartes, Paris 5.
	Pr Alain MOREL – INSERM U892, Université d'Angers.
Examinateurs	**Pr Muriel MATHONNET** – EA 3842, Université de Limoges.
	Dr Mireille VERDIER – EA 3842, Université de Limoges.
	Dr Aurélie PERRAUD – EA 3842, Université de Limoges.

Université de Limoges

A mes parents

A ma femme

A ma fille

…

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **7**

LISTE DES ABREVIATIONS **11**

LISTE DES FIGURES **13**

LISTE DES TABLEAUX **15**

RESUME **16**

ABSTRACT **17**

AVANT PROPOS **18**

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **20**

CHAPITRE 1 : LE CANCER COLORECTAL **21**

I- LE COLON : ANATOMIE ET HOMEOSTASIE NORMALE ***21***

1- Anatomie du colon *21*

2- Homéostasie cellulaire *23*

II- LE CANCER COLORECTAL **24**

1- Généralités du CCR *24*

2- Epidémiologie du CCR *25*

3- Génétique des cancers colorectaux *26*

a- Le processus multi étapes 28

b- Les cellules souches cancéreuses 33

III- CLASSIFICATION DES CCR ***35***

IV- BASES THERAPEUTIQUES ET NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES ***38***

1- La chimiothérapie *39*

2- Les modèles muins de CCR *40*

3- Les thérapies ciblées *41*

CHAPITRE 2 : LES NEUROTROPHINES **43**

I- GENERALITES ***43***

II- LES NEUROTROPHINES ***43***

III- LES RECEPTEURS DES NTs ***44***

1- Les récepteurs Trk à activité tyrosine kinase *46*

a - Le récepteur TrkA 47

b - Le récepteur TrkB 48

c - Le récepteur TrkC 50

2- Le récepteur $p75^{NTR}$ *51*

IV- VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR LES NTS ***53***

1- Les voies activées par les récepteurs de type Trks (formes entières) *53*

2- Les voies activées par le récepteur $p75^{NTR}$ *56*

V- CAS PARTICULIER DE LA SORTILINE ***58***

VI- LES NEUROTROPHINES ET LE CANCER ***59***

CHAPITRE 3 : L'AUTOPHAGIE **61**
I- LES DIFFERENTS TYPES D'AUTOPHAGIE ***61***
1- La microautophagie *62*
2- L'autophagie dépendante des chaperonnes *62*
3-La macroautophagie *62*
II- DEROULLEMENT DE L'AUTOPHAGIE ***64***
1- Mécanisme d'initiation de l'autophagosome *66*
2- Mécanisme d'élongation de l'autophagosome *67*
3- Fermetude de l'autophagosome *68*
4- Etapes de maturation de l'autophagosome *68*
III- REGULATEURS DIRECTS DU MECANISME D'AUTOPHAGIE ***71***
1- Mammalian Target Of Rapamycin: mTOR *71*
2- Adenosin MonoPhosphate activated Protein Kinase (AMPK) *71*
3- Protéine p53 ..... *72*
IV- REGULATEURS INDIRECTS DU MECANISME D'AUTOPHAGIE ***73***
1- La voie PhosphoInositide 3 Kinase (PI3K) / AKT *73*
2- La voie Mitogen Activated Protein Kinase (MAPKs) *74*
3 - Protéine Kinase C (PKC) *75*
V- FONCTIONS DE L'AUTOPHAGIE ***76***
1- La survie cellulaire médiée par l'autophagie *76*
2- La mort autophagique: un nouveau concept? *76*
3- Le double rôle de l'autophagie en cancérogénèse *77*
4- L'autophagie et le CCR *79*

OBJECTIFS DE LA THESE **81**

MATERIELS ET METHODES **83**

I- MATERIELS ***83***
1- Lignées cellulaires *83*
2- Molécules utilisées pour les traitements *83*
3- Tissus de patients atteints de CCR *84*
4- Anticorps *84*
II- METHODES ***86***
1- Culture cellulaire *86*
Conditions de culture et de conservation 86
Traitements cellulaires 87
Transfections 87
Mesure de la cytotoxicité 87
Analyse de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux 88
Analyse de l'apoptose par la cytométrie en flux 88
2- Analyse transcriptomique *88*
Extraction des ARN totaux 88
Reverse Transcription des ARN 89
PCR quantitative (qPCR) 89
3- Analyse protéique par Western Blot *91*
Extraction des protéines en condition dénaturante 92

Extraction des protéines à partir des tumeurs de patients de CCR 92
Electrophorèse, migration et transfert des protéines 92
Saturation de la membrane et incubation en présence des anticorps primaires 93
Révélation par chimioluminescence 93
4- Immunofluorescence Indirecte (IFI) 94
***5**- Dosage du BDNF dans le surnagent de culture par méthode ELISA 94*
6- Greffes hétérotopiques de cellules tumorales sur le modèle murin "nude" 95
Greffe sous cutanée 95
Suivi et mesure de la croissance tumorale 95
Traitements des souris 96
Sacrifice et prélèvement des tumeurs 96
7- Modèle murin de CCR chimiquement induit sur souris BALB-C 96
Traitements des souris 97
Sacrifice et prélèvement des tumeurs 97
8- Immunomarquage des coupes de tumeur 97
9- Analyses statistiques 98

RESULTATS 99

PARTIE I : APPROCHE IN VITRO : ETUDE DE L'INHIBITION DES SIGNALISATIONS NEUROTROPHIQUES ET AUTOPHAGIQUES DANS LES LIGNEES CELLULAIRES DE CCR 101
I- 1- Utilisation du K252a et effet sur les signalisations intracellulaires 101
I-1-1 Expression des neurotrophines et de leurs récepteurs en conditions basales 101
I-1-2 Effets du K252a sur les transcrits TrkB/BDNF/p75NTR et sortiline. 102
I-1-3 K252a et protéines TrkB/BDNF/p75NTR et sortiline : expression et localisation 104
I-1-4 Effet du K252a sur les signalisations en aval de TrkB : PI3K/AKT/mTOR et Erk 108
I-1-5 K252a et devenir cellulaire 110
I-1-6 K252a et induction d'une autophagie fonctionnelle 111
I-2- Effet de l'inhibition pharmacologique (CQ) et génétique (siRNA ATG5) de l'autophagie dans les lignées de CCR. 113
I-2-1 Validation de l'inhibition de l'autophagie par siRNA ATG5. 114
I-2-2 Inhibition de l'autophagie et devenir cellulaire 116
I-2-3 Inhibition de l'autophagie et transcrits TrkB, BDNF, p75NTR et sortiline.. 118
I-2-4 Inhibition de l'autophagie et protéines TrkB, BDNF: expression et localisation. 120
I-2-5 Inhibition de l'autophagie et effet sur la signalisation PI3K/AKT/mTOR médiée par le couple BDNF/TrkB.. 124
I-3- Etude et effets de la double inhibition neurotrophines/autophagie dans les lignées de CCR. 125
I-3-1 Effet de la double inhibition sur la sécrétion de BDNF 125
I-3-2 Effet de la double inhibition sur la localisation de BDNF et de TrkB 126
I-3-3 Effet de la double inhibition sur le devenir cellulaire 127
I-3-4 Conséquences du renouvellement (24h) des différents traitements sur l'activité métabolique à 72h 128
I-3-5 Effet des traitements sur l'apoptose cellulaire 129

PARTIE II : APPROCHE IN VIVO DES INHIBITIONS NEUROTROPHIQUE ET AUTOPHAGIQUE. MISE EN EVIDENCE DE CES SIGNALISATIONS CHEZ LES PATIENTS 132

I-1- Effet de l'inhibition des neurotrophines et de l'autophagie sur la croissance tumorale dans le modèle murin Nude..... 132

I-1-1 Mise en place de greffes sous cutanées dans le modèle murin Nude 132

I-1-2 Effet des différents traitements sur la croissance tumorale. 135

I-2- Présence des signalisations neurotrophique et autophagique dans les tissus de patients présentant un CCR : étude ex vivo..... 136

PARTIE III : DEVELOPPEMENT D'UN MODELE MURIN DE CCR CHIMIQUEMENT INDUIT CHEZ LES SOURIS BALB-C. 138

I-1- Analyse des paramètres macroscopiques des côlons chez le modèle murin chimiquement induit. 138

I-2- Analyse histologique des côlons chez le modèle murin de CCR chimiquement induit..... 139

DISCUSSION..... 143

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 153

ANNEXES 155

PUBLICATION: Dual inhibition of BDNF/TrkB and autophagy: a promising therapeutic approach for colorectal cancer..... 156

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 188

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui ont accepté de consacrer de leur temps à examiner cette thèse.

Merci au **Pr. Jacques ROBERT** qui a bien voulu accepter de présider ce jury de thèse. Recevez, Monsieur le Professeur, toute mon estime et mes plus sincères remerciements.

Je souhaite remercier le **Pr. Alain MOREL** et le **Dr. Jean-Pierre COUTY** qui me font l'honneur de juger ce travail. Merci profondément du temps que vous y avez consacré. Soyez assurés de mon plus profond respect.

Je tiens à remercier profondément le **Pr. Marie Odile JAUBERTEAU** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de m'y épanouir personnellement et professionnellement.

Un grand merci au **Pr. Muriel MATHONNET**. Merci pour tout chef ! Je garderais toujours de vous l'image de quelqu'un de véritablement passionné par son métier. Quelqu'un toujours présent et là pour vous offrir un petit gâteau et un café quand ça ne va pas. Merci de m'avoir fait confiance.

Mes remerciements vont aussi envers le **Dr. Mireille VERDIER**. Merci Mireille de m'avoir encadré dès mon arrivée en licence à la FAC et d'avoir cru en moi. Merci pour tous ces moments agréables passés au laboratoire ou pendant les congrès. Merci pour tous nos échanges toujours constructifs.

Enfin, de profonds remerciements pour le **Dr. Aurélie PERRAUD**. Un très très très grand merci à toi. Tu as toujours été là durant ces trois années. Merci pour ton aide lors des manips et des heures consacrées aux rédactions diverses et variées. Merci pour ton encadrement dès mon arrivée en Master 2. Merci d'avoir été présente et de m'avoir écouté quel que soit le sujet durant ces trois années. Merci pour tous ces bons moments. PS : Le fonctionnement d'Excel restera toujours un mystère pour moi…

Une pensée particulière pour l'équipe CCR :

Je souhaite remercier chaleureusement le **Pr. Serge BATTU**. Merci à toi Serge, oh grand maître de la sdFFF. Je n'aurais pas eu l'occasion de m'initier à l'art de la FFFdurant cette thèse mais j'aurais eu l'occasion d'apprendre beaucoup avec toi.

Sabrina : Merci pour tout Blondinette. Merci pour les moments de boulot côte à côte et pour ces fous rires durant les longues journées. Montagne montagne…

Carole : Même si tu as émigré au pays des frites tu resteras toujours pour moi un membre à part entière des CCR. Merci pour tout Tiramisu !!!

Niki : Merci pour ton aide durant ces années. On a commencé ensemble et ce n'est pas rien !

Sophie.G : Merci à toi « petite stagiaire de 3ème». J'ai adoré bosser avec toi. Et sois en sûre, un jour tu seras ENFIN convaincu du rôle de la sortiline !

Tiffany : Merci Padawan d'avoir été là durant ma deuxième année de thèse et d'avoir alléger mes manips avec la CQ…

Miguelito : Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée dès ton arrivée au labo. Lo siento, gracias por toda la ayuda que me ha traído a su llegada en el laboratorio.

Je souhaite remercier tous les membres de **l'Equipe EA3842** et plus particulièrement:

Danielle, **Marie Hélène**, **Fabrice** et **François**. Merci de m'avoir si bien accueilli au sein du laboratoire et de m'avoir fait partager votre passion des sciences tant pendant mon cursus universitaire que lors les réunions de labo ou les échanges au grès des couloirs.

Aurélie L, merci pour tous ces échanges et surtout de m'avoir supporté quand j'étais étudiant. Le tableau sera toujours trop haut mais promis je ne t'embêterais plus avec les histoires de plâtre.

Sophie.H, **Hugo**, **Hafidah**, **Maz** et **Hussein**. Merci à vous cinq pour les nombreux fou rire durant les journées de boulot. Rosy c'est promis pour Noël je te dessinerais une licorne. Maz, garde ta 406 ;) !!! Hugo, je te nomme officiellement lecteur de l'horoscope !

Les anciens thésards de l'équipe : **Amandine**, **Sandra**, **Soha**, **Hussein** et **Sofiane**. Merci à tous pour tous les petits trucs et astuces (notamment pour ENFIN réussir un western blot) que vous m'avez prodigué durant ces trois années.

Un grand merci **Romain** pour toutes ces séries de « bêtises ». Dommage que tu sois parti si loin de Limoges. Merci pour tout mon petit chou !!!

Une mention toute particulière pour toi mon petit **Tom**. Un grand merci pour ton partage et ces très nombreux échanges concernant le boulot ou notre passion commune… Nos moments au bord de l'eau restent gravés et j'espère qu'il y en aura d'autres. Dédicace spéciale pour ta participation à mon EVG… Les 102 je m'en souviendrais…

Je tiens à remercier du plus profond de mon cœur, tous les membres de **ma famille et amis** qui m'ont soutenu durant ces années.

Je remercie particulièrement **mes parents** sans qui, je n'aurais pas eu la chance de réaliser mon cursus universitaire, ni même un bon nombre d'autres choses dans ma vie professionnelle mais aussi personnelle.

Je remercie **ma petite femme** pour son soutien même quand j'étais vraiment désagréable et stressé. Merci pour ton aide et ta présence durant cette thèse mais aussi pendant notre cursus universitaire où tu me faisais réciter nos cours… Je te dois beaucoup.

Merci à toi **Stéph**. Tu as toujours été présent pour me fournir de bons conseils et me soutenir dans cette épreuve qu'est la thèse.

Enfin, un remerciement tout particulier à ma fille. Ma petite **Suzanne**, toi que j'ai tant attendu, tu es arrivée lors de ma dernière année de thèse. Même si le premier mois les nuits ont été un peu compliquées, te voir, te prendre dans mes bras, voir tes petits sourires tous les jours m'ont permis de supporter un peu mieux les dernières périodes de rédaction de ce mémoire.

Merci à tous mes amis : Merci à tous pour vos soutiens dans les moments difficiles et pour toutes ces super soirées de détente entre **Bargeots**. Une mention toute particulière pour toi mon **Maxou** : merci pour tes visites si particulières dans mon bureau ;)…

Je remercie vivement le service d'Anatomo-Pathologies du CHRU de Limoges pour l'aide apportée lors de certaines expériences menées pour ces travaux de thèse.

Je tiens enfin à remercier la **Région Limousin**, la **ligue contre le cancer** et le **Comité d'Orientation et de Recherche sur le Cancer en Limousin** qui ont financé ces travaux.

LISTE DES ABREVIATIONS

-A-

ACVR2: Activine Receptor 2
ADAM17: A Disintegrin And Metalloproteinase 17
ADAM10: A Disintegrin And Metalloproteinase 10
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
AJCC: American Joint Committe for Cancer staging
AKT:
AMP: Adénosine Mono Phosphate
AMPK: AMP-activated protein kinase
APC: Adenomatous Polyposis Coli
Arg: Arginine
ARN: Acide RiboNucléique
ARNm: ARN messager
ATG: Autophagy related gene
ATP: Adenosine Tri-Phosphate

-B-

BAD: BCL-2 Associated agonist of cell Death
BAX: BCL-2 Associated X protein
BCL-2: B Cell Lymphoma-2
BCL-XL: B-cell lymphoma-extra large
BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor
BER: Base Excision Repair
BRAF: v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

-C-

CCR: Cancer ColoRectal
CHIP: chimio hyperthermie intra-péritonéale
CMF : Cytométrie en flux
CQ: Chloroquine
CREB: cAMP response element binding protein
CS: Cellules Souches
CSC: Cellules Souches Cancéreuses
CtBP : C-terminal binding protein

-D-

DAG: diacylglycérol
DCC: Deleted in Colorectal Cancer
DD: Death Domain
dUMP: désoxyuridine monophosphate
dTMP: désoxythymidine monophosphate

-E-

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
ERK1: Extracellular signal-Regulated Kinase 1
ERK2: Extracellular signal-Regulated Kinase 2
ESCRT: Endosomal sorting complexes required for transport

-F-

FADD: Fas-Associated Death Domain

-G-

Gln: Glycine
Glu: Glutamine

-H-

HNPCC: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
Hsp70: Heat shock protein 70

-I-

IGF: Insulin Growth Factor
Ig-like: Immunoglobuline-like
INCA: Institut National du Cancer
IP: Iodure de Propidium

-J-

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

-K-

kDa: kilo Dalton
KRAS: *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

-L-

LAMP2: Lysosomal-associated membrane protein
LC3: Microtubule-associated protein Light Chain 3
LNGFR: Low affinity Nerve Growth Factor
LOH: Loss Of Heterozygosity
Lys: Lysine

-M-

MAPK: Mitogen Associated Protein Kinases
MEK: MAP ERK Kinase
MEK1: MAP ERK Kinase 1
MEK2: MAP ERK Kinase 2
MMP: Matrix metalloproteinase
MMP7: Matrix metalloproteinase 7
MMP9: Matrix metalloproteinase 9
MMR: MisMatch Repair
MSI: Micro Satellite Instability
mTOR: Mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1: mTOR complex 1
mTROC2: mTOR complex 2

-N-

NADE: Neurotrophin receptor Associating Death Effectors
NF-κB: Nuclear Factor kappa B
NGF: Nerve Growth factor
NRAGE: Neurotrophin Receptor-interacting MAGE homolog
NRIF: neurotrophin receptor interacting factor
NT-3: Neurotrophine 3
NT 4/5: Neurotrophine 4/5
NT-6: Neurotrophine 6
NT-7: Neurotrophine 7
NTRK1: Neurotrophin Receptor Kinase 1
NTRK2: Neurotrophin Receptor Kinase 2
NTRK3: Neurotrophin Receptor Kinase 3
NTs: Neurotrophines

-O-

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

-P-

p38: p38 MAP kinase
p70S6K: p70 S6 Kinase
$p75^{NTR}$: p75 Neurotrophin Receptor
PAF: Polypose Adénomateuse Familiale
PARP: Poly-ADP Ribose Polymerase
Pb: Paire de bases
PDK1: Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1
PE : Phosphatydil Ethanolamine
PI3K: PhosphatidylInositol 3-Kinase
PI2P: PhosphatidylInositol 4, 5-biPhosphate
PI3P: PhosphatidylInositol (3, 4, 5)-trisPhosphate
PKC: Protein Kinase C
PLCγ: PhosphoLipase C gamma
Pro-NT: pro neurotrophine
PTEN: Phosphatase and TENsin homologue on chromosome 10
pTNM: pathology Tumor Node Metastasis

-R-

rapTOR : Regulatory-associated protein of mTOR
ricTOR : Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin
RTK: Récepteur à activité Tyrosine Kinase
RTK: Récepteur à activité Tyrosine Kinase
ROS: Espèces oxygénées réactives

-S-

Shc: Src homology 2 domain containing transforming protein
***si*RNA:** small interference RNA
SNARE: Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SNC: Système Nerveux Central

-T-

TCF4: Transcription Factor 4
TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGFβ: Transforming Growth Factor betta
TNF: Tumor Necrosis Factor
TNM: Tumor-Node-Metastasis
TRAF: TNF Receptor Associated Factor
Trk: Tropomyosin-Related Kinase
TrkA: Tropomyosin-Related Kinase A
TrkB: Tropomyosin-Related Kinase B
TrkB-FL: Tropomyosin-Related Kinase B Full Length
TrkB-T: Tropomyosin-Related Kinase B Truncated
TrkC: Tropomyosin-Related Kinase C
TSC1: Tuberous sclerosis 1
TSC2: Tuberous sclerosis 2

-U-

UICC: Union Internationale Contre le Cancer
ULK : UNC-51-like kinase

-V-

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
Vps10p: Vacuolar carboxy-peptidase sorting receptor-10

-W-

Wnt: Voie de signalisation Wnt

-1-

3-MA: 3- méthyladénine
4-EBP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
5-FU: 5-Fluorouracile

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : LES DIFFERENTS SEGMENTS DU COLON.. 21
FIGURE 2 : LES DIFFERENTES COUCHES DE LA PAROI DU COLON..... 22
FIGURE 3 : CRYPTE DE L'EPITHELIUM COLIQUE. 23
FIGURE 4 : CIBLES THERAPEUTIQUES ET ETAPES DE LA CANCEROGENESE.. 25
FIGURE 5 : EPIDEMIOLOGIEDU CCR..... 26
FIGURE 6 : MUTATIONS ET PROGRESSION TUMORALE..... 33
FIGURE 7 : TUMEURS ET CELLULES SOUCHES CANCEREUSES..... 34
FIGURE 8 : EVOLUTION DES STADES CANCEREUX DU CANCER COLORECTAL 37
FIGURE 9 : SYNTHESE DES NEUROTROPHINES 44
FIGURE 10 : RECEPTEURS AUX NEUROTROPHINES..... 45
FIGURE 11 : LES RECEPTEURS TRK 47
FIGURE 12 : LES DIFFERENTES ISOFORMES DU RECEPTEUR TRKA 48
FIGURE 13 : LES DIFFERENTES ISOFORMES DU RECEPTEUR TRKB..... 50
FIGURE 14 : LES DIFFERENTES ISOFORMES DU RECEPTEUR TRKC 51
FIGURE 15 : STRUCTURE DU RECEPTEUR P75^{NTR} 52
FIGURE 16 : LES DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES PAR LES RECEPTEURS TRK. 53
FIGURE 17 : REGULATION DE LA SIGNALISATION DE LA PROTEINE MTOR..... 55
FIGURE 18 : VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR P75^{NTR} 57
FIGURE 19 : STRUCTURE DE LA SORTILINE..... 58
FIGURE 20 : LES TROIS GRANDS TYPES D'AUTOPHAGIE. 64
FIGURE 21 : LES PRINCIPALES ETAPES DE L'AUTOPHAGIE..... 65
FIGURE 22 : LES PROCESSUS DE L'AUTOPHAGIE..... 70
FIGURE 23 : CASCADE DE SIGNALISATION DES MAPK..... 74
FIGURE 24 : LE DOUBLE ROLE DE L'AUTOPHAGIE EN CANCEROGENESE..... 78
FIGURE 25 : ROLES ET IMPLICATIONS DE L'AUTOPHAGIE 80
FIGURE 26 : FORMULES CHIMIQUES DES DIFFERENTS COMPOSES UTILISES : K252A, CHLOROQUINE ET RAPAMYCINE. 101
FIGURE 27 : EXPRESSION DU BDNF ET DES RECEPTEURS AUX NEUROTROPHINES DANS LES LIGNEES DE CCR SW 480 ET SW 620 CULTIVEES EN CONDITION BASALE (10% SVF). 101
FIGURE 28: EFFET DU TRAITEMENT AU K252A SUR LES TRANSCRITS CODANT LE TRKB, LE P75NTR, LA SORTILINE ET LE BDNF 103
FIGURE 29 : EFFET DU TRAITEMENT PAR LE K252A SUR L'EXPRESSION PROTEIQUE DE LA VOIE NEUROTROPHIQUE. 104
FIGURE 30 : DOSAGE DU BDNF EXTRACELLULAIRE DANS LES SURNAGEANTS DE CULTURE TRAITEES OU NON PAR LE K252A 105
FIGURE 31 : EFFET DU K252A SUR LA LOCALISATION DE BDNF ET DE TRKB DANS LES CELLULES SW480 ET SW620.....106
FIGURE 32 : EFFET DU K252A SUR LA LOCALISATION DU BDNF ET DE LA SORTILINE DANS LES SW480 ET LES SW620. 107
FIGURE 33 : EFFET DU K252A SUR LA LOCALISATION DE LA SORTILINE ET DE TRKB DANS LES SW480 ET LES SW620.....108
FIGURE 34 : EFFET DU K252A SUR L'EXPRESSION ET LA PHOSPHORYLATION DES PROTEINES DE LA VOIE PI3K/AKT/MTOR. 109
FIGURE 35 : EFFET DU K252A SUR LA VIABILITE ET L'ACTIVITE METABOLIQUE DES LIGNEES DE CCR.....110
FIGURE 36 : EFFET DU K252A SUR L'EXPRESSION PROTEIQUE D'ACTEURS AUTOPHAGIQUES 111
FIGURE 37 : EFFET DU K252A SUR L'EXPRESSION DE LA LC3 ENDOGENE.....112
FIGURE 38 : EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LE FLUX AUTOPHAGIQUE DES CELLULES DE CCR 113
FIGURE 39 : EFFET DE L'INHIBITION DE L'AUTOPHAGIE PAR SIRNA ATG5 SUR L'EXPRESSION PROTEIQUE D'ATG5 ET DE LC3.....114
FIGURE 40 : DETECTION DE LA LC3 ENDOGENE DANS LES CELLULES APRES TRANSFECTION PAR SIRNA ATG5 115
FIGURE 41 : EFFET DE LA CHLOROQUINE ET DES SIRNA ATG5 SUR LA VIABILITE ET LE METABOLISME DES LIGNEES DE CCR 116
FIGURE 42 : EFFET DE LA CQ SUR L'EXPRESSION DES TRANSCRITS CODANT BDNF, TRKB, P75^{NTR}ET DE LA SORTILINE 118
FIGURE 43 : EFFET DE L'INHIBITION DE L'AUTOPHAGIE SUR L'EXPRESSION PROTEIQUE DES NTS. 120
FIGURE 44 : SECRETION DU BDNF DANS LES SURNAGEANTS DES CELLULES TRAITEES A LA CQ.....121

FIGURE 45 : EFFET DE LA CQ SUR LA LOCALISATION DE BDNF ET DE TRKB DANS LES SW480 ET LES SW620.. 122
FIGURE 46 :. EFFET DE LA CQ SUR LA LOCALISATION DU PHOSPHO TRKB APRES TRAITEMENT DES CELLULES DE CCR A LA CQ 123
FIGURE 47 : EFFET DE L'INHIBITION DE L'AUTOPHAGIE SUR L'EXPRESSION PROTEIQUE DE LA VOIE AKT/MTOR 124
FIGURE 48 : EFFET DE LA DOUBLE INHIBITION SUR LA SECRETION DU BDNF EXTRACELLULAIRE DANS LES SURNAGEANTS DE CULTURE. .125
FIGURE 49 : EFFET DE LA DOUBLE INHIBITION (K252A + CQ) SUR LA LOCALISATION DU BDNF ET DU TRKB DANS LES CELLULES DE CCR 126
FIGURE 50 : EFFET DE L'INHIBITION PHARMACOLOGIQUE SIMULTANEE DES NEUROTROPHINES ET DE L'AUTOPHAGIE SUR LES LIGNEES DE CCR APRES 3H OU 72H DE TRAITEMENT 127
FIGURE 51 : EFFET DES TRAITEMENTS A 72H DU K252A ET/OU DE LA CQ APRES RENOUVELLEMENT DES MOLECULES TOUTES LES 24H SUR L'ACTIVITE METABOLIQUE DES CELLULES DE CCR 129
FIGURE 52 : EFFET DE L'INHIBITION SIMULTANEE DES NEUROTROPHINES ET DE L'AUTOPHAGIE SUR LE CLIVAGE DE LA PARP, DANS LES LIGNEES DE CCR APRES 72H DE TRAITEMENT. 130
FIGURE 53 : EFFETS DE L'INHIBITION DE L'AUTOPHAGIE ET DE LA SIGNALISATION NEUROTROPHIQUE SUR L'APOPTOSE ET LA NECROSE .131
FIGURE 54 : ANALYSE DE LA CROISSANCE TUMORALE SUR LE MODELE MURIN NUDE APRES REALISATION DE GREFFES SOUS CUTANEES DE CELLULES DE CCR 132
FIGURE 55 : ETUDE DE LA PROLIFERATION (KI67) ET DE LA VASCULARISATION (CD31) DANS DES TUMEURS DE CCR OBTENUES APRES GREFFE SOUS-CUTANEE DE CELLULES DE CCR SUR SOURIS NUDE.. 133
FIGURE 56 : EFFET DES DIFFERENTS TRAITEMENTS (K252A, CQ ET K252A + CQ) SUR LA CROISSANCE TUMORALE. 135
FIGURE 57 : DETECTION DES ACTEURS NEUROTROPHIQUES ET AUTOPHAGIQUE DANS LES TUMEURS ISSUES DE PATIENTS PRESENTANT DIFFERENTS STADES DE CCR 136
FIGURE 58 : ANALYSE DE DIFFERENTS PARAMETRES MACROSCOPIQUES CONCERNANT LES COLONS PROVENANT DE MODELES DE CCR MURIN CHIMIQUEMENT INDUIT. 139
FIGURE 59 : ANALYSE HISTOLOGIQUE (COLORATION HES) ET IMMUNOHISTOCHIMIQUE (MARQUAGE DU CD45R) DES COLONS ISSUS DU MODELE DE CCR CHIMIQUEMENT INDUIT 140
FIGURE 60 : ANALYSE HISTOLOGIQUE (COLORATION HES) ET ORGANISATION CELLULAIRE DES COLONS ISSUS DU MODELE DE CCR CHIMIQUEMENT INDUIT 141

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION INTERNATIONALE PTNM DES CCR 36
TABLEAU 2 : SURVIE RELATIVE A 5 ANS CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE CCR 38
TABLEAU 3 : ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES EN WESTERN BLOT ET CONDITIONS D'UTILISATION..... 84
TABLEAU 4 : ANTICORPS SECONDAIRES UTILISESEN WESTERN BLOT ET CONDITIONS D'UTILISATION 85
TABLEAU 5 : ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES EN IMMUNOFLUORESCENCE ET CONDITIONS D'UTILISATION. 85
TABLEAU 6 : SEQUENCES DES DIFFERENTES SONDES ET AMORCES UTILISEES LORS DES REACTIONS DE PCR QUANTITATIVES. 91

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est le premier cancer digestif dans les pays occidentaux. Malgré les progrès thérapeutiques réalisés au cours des deux dernières décennies, la survie relative à 5 ans ne dépasse pas 56%, et s'abaisse à 11,3% pour les patients métastatiques. Le pronostic est lié au stade de développement de la maladie au moment du diagnostic. Les décès sont en rapport avec une résistance primaire de la masse tumorale aux thérapies, ou la survenue de récidive, en rapport avec une maladie microscopique résiduelle, non contrôlée par les thérapies systémiques adjuvantes. Le travail réalisé au sein de notre laboratoire portant sur deux voies de signalisation met en leurs rôles dans le CCR : les neurotrophines (NTs, facteurs de croissance impliqués dans la survie des cellules cancéreuses) et l'autophagie (processus de recyclage cellulaire impliqué dans la résistance au stress). Le but de cette étude a été d'analyser la part de ces deux voies dans la survie des cellules du cancer colo-rectal et l'impact de leur inhibition sur le devenir cellulaire et l'évolution tumorale.

L'étude a été menée sur deux lignées cellulaires provenant du même patient : SW480 (tumeur primaire) et SW620 (invasion ganglionnaire), aussi utilisées pour la réalisation de greffes sous cutanées sur le modèle murin Nude. De plus, la présence de principales protéines des NTs (TrkB) et de l'autophagie (LC3) a été analysée dans les tissus de patients.

Des travaux précédents menés sur des cultures de CCR ont montré que la surexpression de TrkB était associée à la survie cellulaire. Nous avons donc choisi d'inhiber la voie des NTs avec le K252a (100nM). Sur culture cellulaire de CCR, *in vitro,* l'inactivation de la voie PI3K / AKT, induit une activation de l'autophagie. A l'opposé, le blocage du flux autophagique par une approche pharmacologique (avec la chloroquine, CQ ; 25µM) ou par une approche transcriptomique (siRNA anti-ATG5) induit une suractivation de la signalisation des NTs, via le couple TrkB/BDNF. Ainsi, les deux voies de survie se compensent mutuellement et la double inhibition permet l'amélioration de l'effet des simples traitements. L'utilisation des deux inhibiteurs *in vivo* induit une réduction spectaculaire du volume tumoral (voire même la disparition dans certains cas). Finalement, la présence de la forme active du TrkB (phospho TrkB) et de la forme active de la LC3 (LC3II), démontrant l'activation de ces deux voies dans les tissus de patients, a été observée. L'ensemble de ces résultats montre que l'activation des voies des NTs et de l'autophagie contribue à la survie des cellules de CCR. L'approche qui consiste à la double inhibition des NTs et de l'autophagie pourrait être un point majeur pour le développement de nouvelles thérapies dans le CCR.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the first digestive cancer in occidental countries. Despite effective therapies, cases of resistance and/or recurrence exist. Our laboratory works on two signaling pathways regulating balance between survival and cell death: neurotrophins (NTs, growth factors involved in cancer cells survival) and autophagy (cellular recycling involved in stress resistance). The aim of this study was to investigate relationship between these two pathways and the impact of their inhibition on cell fate and tumor evolution.

Studies were performed on two CRC cell lines derived from the same patient: SW480 (primary tumor) and SW620 (node invasion), also used for subcutaneous xenografts on Nude mouse model. In addition, presence of major proteins of NTs (TrkB) and autophagy (LC3) were assessed in patient's tissues.

Previous work showed that TrkB overexpression is associated with pro-survival signaling in CRC cell. So, we choose to inhibit NTs pathway with K252a (100 nM). As expected, inactivation of the PI3K / AKT pathway was observed and CRC cells were able to activate autophagy. At the opposite, blocking autophagic flux by pharmacologic approach (chloroquine; CQ; 25µM) or by transcriptomic approach (siRNA against ATG5) induced over-activation of the NTs pathway, via TrkB/BDNF. Thus, both survival pathways compensate each other. Moreover, dual inhibition allowed improving the effect of single treatment through a significant reduction of metabolic activity. The using of both inhibitors *in vivo* induces a spectacular reduction of tumor volume (or even disappearance in some cases). Presence of active form of TrkB (phospho TrkB) and active form of LC3 (LC3-II) demonstrating activation of these two pathways, in patient's tissues have been observed. Taken together, our results showed that activation of NTs and autophagy contribute to CRC cell survival. The approach consisting of dual inhibition of NTs and autophagy could be a major point for new CRC therapies development.

Avant propos

Le Cancer colorectal (CCR) est le premier des cancers digestifs et la seconde cause de mortalité dans les pays occidentaux. Il s'agit d'une pathologie du sujet âgé avec une moyenne d'âge de 70 ans au moment du diagnostic. La majorité des décès survient après 75 ans. Tous stades confondus, la survie globale à 5 ans est estimée à 56% (INCA 2012, Bouvier et al., 2008). Les rechutes arrivent dans la grande majorité des cas dans les 2 ans suivant le diagnostic initial. Actuellement, le seul traitement curatif reste la chirurgie, bien que les thérapies ciblées aient amélioré la survie des patients présentant des stades avancés de CCR. Les décès liés à la maladie sont directement en rapport avec une récidive ou une masse tumorale non contrôlable par les traitements disponibles, chirurgie, chimiothérapies systémiques, radiothérapie, ou thérapies ciblées.

Les échecs thérapeutiques sont probablement liés à la capacité des cellules tumorales, de mettre en place des mécanismes de résistance, notamment en activant des voies de survie, ou en inhibant les voies de la signalisation apoptotique. Parmi les voies qui contribuent à la survie des cellules du CCR, les voies des NTs (notamment via la signalisation PI3K/Akt) et de l'autophagie semblent jouer un rôle majeur.

Découvertes dans le système nerveux, les neurotrophines (NTs correspondent à une famille de facteurs de croissance impliqués notamment dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Skaper, 2012). Cette famille est composée de quatre membres : le Nerve Growth Factor (NGF), le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), la neurotrophine 3 (NT/3) et la neurotrophine 4/5 (NT4/5). Pour déclencher les signalisations, les NTs se fixent à deux types de récepteurs : les récepteurs de haute affinité de la famille Tropomyosin-Related Kinase (Trk) et le récepteur de faible affinité $p75^{NTR}$ (Chen et al., 2009; Schecterson and Bothwell, 2010). Les NTs sont retrouvées sous deux formes biologiquement actives (Lessmann et al., 2003), mature et immature, transportées par la sortiline. Les NTs matures permettent d'induire la survie cellulaire après fixation sur les récepteurs Trks. En revanche, les formes immatures (pro-NTs) entraînent la mort cellulaire après interaction avec le récepteur $p75^{NTR}$.

La présence des NTs et de leurs récepteurs a été mise en évidence au sein de différents tissus, y compris non-neuronaux. Par ailleurs, ces facteurs de croissance sont considérés comme capables d'induire la prolifération et la survie dans de nombreux cancers, et constituent des cibles potentielles de traitement. Cependant, les NTs ne sont pas les seules pouvant être incriminées dans le déclenchement de signalisations de survie. Depuis

quelques années, le processus autophagique, par les capacités de résistance aux stress qu'il induit, se retrouve au centre de la survie, voire de l'agressivité des cellules tumorales.

L'autophagie est un mécanisme de survie cellulaire assurant, à un niveau basal et de facon complémentaire au protéasome, le recyclage d'organites et de différentes macromolécules pour assurer l'homéostasie. Il peut également être déclenché lors d'un stress comme la privation sérique (carence nutritive), l'hypoxie ou un défaut de vascularisation (Todde et al., 2009), où il confère la résistance des cellules (Levine, 2005). Même si des controverses existent sur son rôle réel lors de la tumorigénèse, ce mécanisme favorise généralement la survie cellulaire dans le processus cancéreux (Aredia et al, 2012).

La pertinence de la signalisation des NTs et de l'autophagie a déjà été décrite dans des lignées de CCR, (Akil et al, 2011 ; Sato et al, 2007). L'objectif de cette thèse a été d'étudier la part relative de ces deux voies et de leur relation potentielle. *In vitro*, l'impact de l'inhibition de l'une des deux voies sur l'autre, et l'effet conjugué de l'inhibition des deux voies a été étudié à l'aide des lignées cellulaires SW480 et SW620 représentant respectivement la tumeur primitive et les métastases ganglionnaire d'un CCR stade III. Ce travail a été poursuivi *in vivo* par la réalisation de greffes sous cutanées de cellules tumorales sur souris Nude, qui ont permis d'obtenir des tumeurs sur lesquelles des traitements inhibant les NTs et/ou l'autophagie ont été administrés. Enfin, une approche clinique a été initiée dans le but de démontrer la présence et l'activation de ces deux voies dans les cellules issues de tumeurs de patients opérés d'un CCR.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : LE CANCER COLORECTAL

I- Le côlon : anatomie et homéostasie normale

Le cancer colorectal (CCR) se développe à partir de la muqueuse du côlon ou du rectum. Il s'agit d'adénocarcinome dans 99,7% des cas. Le plus souvent, le CCR correspond à la transformation maligne d'un polype (lésion bénigne pouvant se développer à partir de la muqueuse colique ou rectale). Il peut également se développer sur muqueuse saine, et peut entrer dans ce cas, dans le cadre d'une maladie génétique.

1) Anatomie du côlon

Le côlon correspond à la partie terminale du tube digestif. Il débute au niveau de la valvule de Bauhin (jonction entre l'iléon terminal et le côlon droit) et se termine au niveau de la jonction recto-sigmoïdienne située au niveau de la troisième vertèbre sacrée où lui fait suite le rectum. Le côlon peut être divisé en trois segments : le côlon ascendant ou côlon droit, le côlon transverse et le côlon descendant ou côlon gauche (Figure 1).

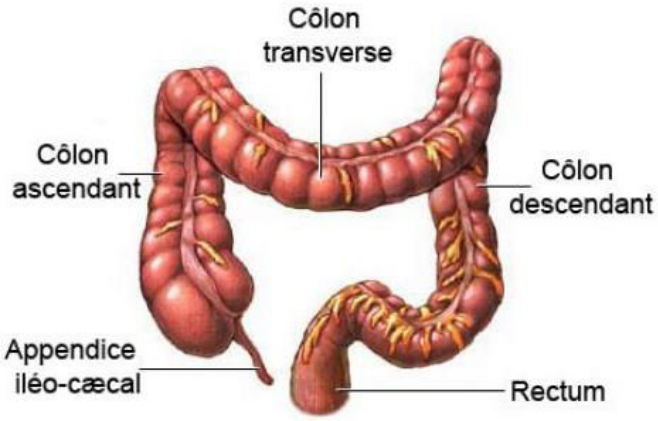


Figure 1: Les différents segments du côlon. Il est divisé en 3 segments : ascendant, transverse et descendant. Schéma adapté de l'encyclopédie médicale A.D.A.M.

La paroi colique, comme le reste du tube digestif, est composée de 4 couches qui sont, de la plus interne à la plus externe (Figure 2):

- La muqueuse, constituée d'un épithélium intestinal muco-sécrétrant impliqué dans l'absorption (composé par les cellules caliciformes ou sécrétrices de mucus,

d'entérocytes ou colonocytes et de cellules entéro-endocrines), d'un tissu conjonctif sous-jacent, d'épaisseur variable nommé *lamina propria* ou chorion, riche en tissu lymphoïde et qui a un rôle de soutien. La muqueuse contient aussi des fibres musculaires circulaires et longitudinales formant la musculaire muqueuse (*muscularis mucosae*). A l'interface entre l'épithélium et le chorion, se situe la membrane basale.

- La sous muqueuse, formée par un tissu conjonctif fortement irrigué, contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elle contient également le plexus nerveux de Meissner, intégré au système nerveux autonome et contrôlant les sécrétions digestives.

- La musculeuse, composée de deux couches de cellules musculaires lisses : circulaire (interne) et longitudinale (externe). Elle est responsable du péristaltisme du tube digestif. Entre les deux couches de la musculeuse se trouve le plexus nerveux myentérique d'Auerbach et des cellules de Cajal, qui ont un rôle de pace maker et contrôlent le rythme du péristaltisme.

- La séreuse, dernière et quatrième couche de la paroi colique également appelée adventice. C'est le feuillet viscéral du péritoine constitué de tissu adipeux, qui n'existe qu'au niveau du côlon situé en intra-péritonéal, le rectum en étant dépourvu.

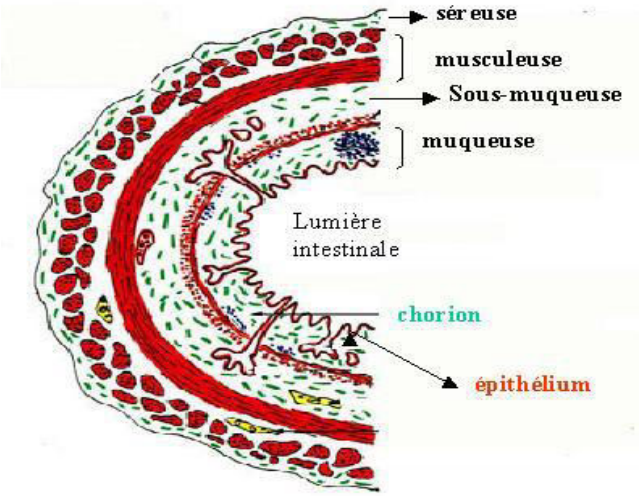


Figure 2: Les différentes couches de la paroi du côlon. La paroi du côlon est composée par la superposition de 4 couches: la muqueuse (couche la plus interne), la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse (couche externe), qui constitue une partie du péritoine viscéral. Schéma adapté d'après l'institut national du cancer.

2) Homéostasie cellulaire

Le côlon est caractérisé par un renouvellement très actif des cellules épithéliales. La durée de vie moyenne de ces cellules est d'environ 5 jours. L'épithélium colique, composé d'une couche unique de cellules de forme cylindrique, se replie au sein de la *lamina propria* et forme les cryptes de Lieberkühn. Environ 14000 cryptes par cm^2 avec 2500 à 3200 cellules par crypte ont été dénombrées. Le renouvellement des cellules des cryptes est assuré par les cellules souches (CS) présentes au fond de ces dernières. Elles sont généralement au nombre de 7 à 8 par crypte. Dans la partie basale des cryptes, se présente une zone proliférative avec les cellules en division provenant des CS. Les cellules vont ensuite « migrer » le long de la crypte vers la partie supérieure, se différencier et acquérir leur fonctionnalité définitive. Leur migration est notamment permise par l'activation de la voie Wnt, régulièrement dérégulée dans le CCR (Clevers and Batlle, 2006; de Lau et al., 2007; Clevers et al, 2014). Une fois dans la partie supérieure de la crypte, les divisions cellulaires cessent et les cellules sont ensuite progressivement détruites par apoptose et éliminées dans la lumière colique (Figure 3).

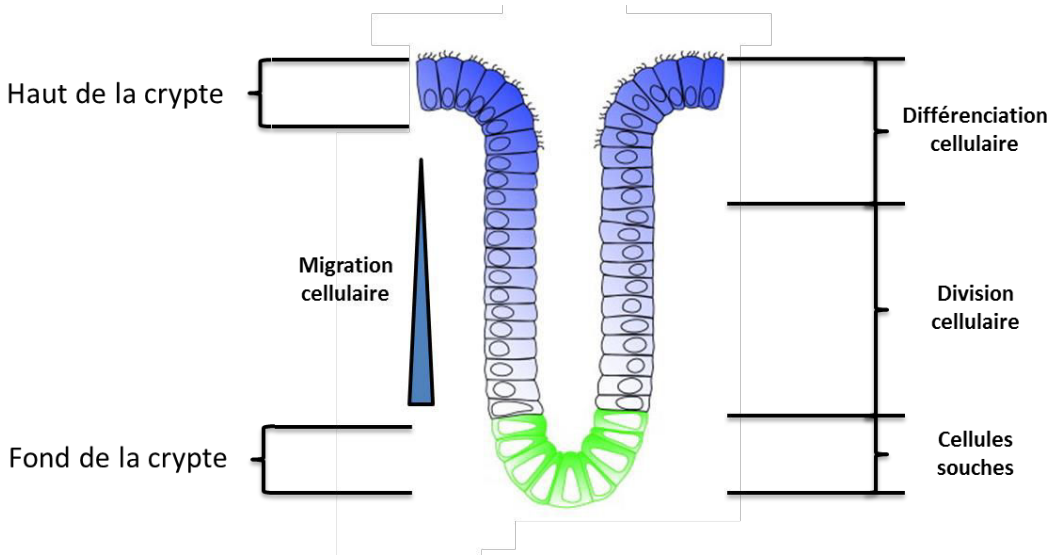


Figure 3: Crypte de l'épithélium colique. Les 7 à 8 cellules souches (vert) sont localisées au fond de la crypte colique. Elles se divisent pour donner des cellules progénitrices (bleu clair) qui vont entamer leur migration vers la partie supérieure de la crypte. Ces dernières arrêtent leur division et se différencient en cellules spécifiques (bleu foncé) localisées au niveau du haut de la crypte colique. Schéma adapté d'après (Degirolamo et al., 2011).

L'épithélium colique est composé de différents types cellulaires :

- Les entérocytes ou colonocytes: ils permettent l'absorption des nutriments principalement dans le côlon droit, le transport des électrolytes, et représentent à eux seuls 80% de la population.
- Les cellules à mucus : elles sont aussi nommées cellules en gobelet ou caliciformes et représentent quasiment 20% de la population. Elles sécrètent du mucus qui recouvre l'épithélium afin de le protéger des agents toxiques contenus dans le tube digestif (toxines, bactéries).
- Les cellules entéro-endocrines : elles sont capables de sécréter les peptides gastro-intestinaux tels que le glucagon, le VIP. Elles sont originaires de la crête neurale et représentent moins de 1% de la population.

La paroi colique est un tissu complexe, en perpétuel renouvellement dans lequel la balance apoptose/prolifération est fortement régulée. Le dysfonctionnement ou la perte des systèmes de régulation sont à l'origine de la formation de lésions bénignes (polypes) ou malignes.

II- Le cancer colorectal

1) Généralités du CCR

La première définition du cancer, donnée par Hippocrate, décrit cette maladie comme une tumeur envahissante non inflammatoire, ayant tendance à récidiver et conduisant à la mort. On parle alors de « carcinome ». Avec l'évolution des connaissances, de nouvelles informations sont apparues sur la génétique, la physiologie et la biologie moléculaire des cellules cancéreuses. Ces avancées ont permis de préciser les caractéristiques du processus cancéreux. Cette pathologie résulte d'un ensemble de modifications cellulaires et notamment d'un grand nombre d'altérations ou mutations génétiques, épigénétiques ou moléculaires qui provoquent un dysfonctionnement d'acteurs clés. Ces dysfonctionnements entrainent l'apparition de cellules proliférant de façon anarchique, favorisant ainsi la naissance de groupes de cellules ou tumeurs.

En 2000, Hanahan et Weinberg ont décrit les 6 capacités distinctives des cancers permettant d'établir la transformation d'une cellule saine en cellule tumorale (Hanahan and Weinberg, 2000): l'indépendance face aux signaux prolifératifs, l'échappement à l'arrêt de la croissance, la résistance à la mort cellulaire, le potentiel de réplication cellulaire, l'induction de l'angiogénèse et l'activation de la capacité invasive et métastatique. En 2011, Hanahan et

Weiberg ont rajouté 4 nouvelles caractéristiques : l'instabilité génétique, la dérégulation du métabolisme cellulaire, l'insensibilité à la destruction par le système immunitaire ainsi que l'augmentation de la réaction inflammatoire (Hanahan and Weinberg, 2011). Chacune de ces étapes clés devient une cible potentielle thérapeutique (figure 4).

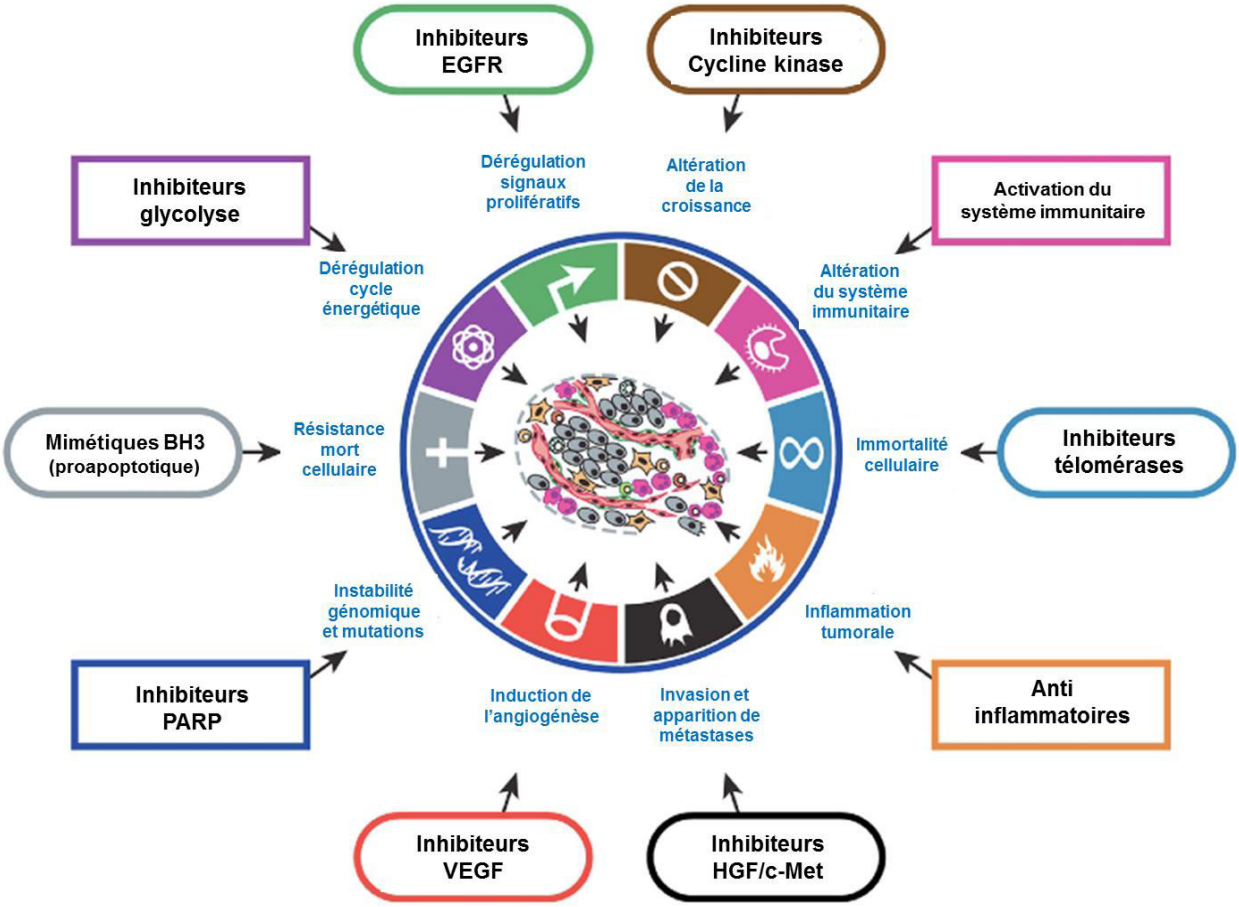


Figure 4: Cibles thérapeutiques et étapes de la cancérogénèse. Différentes molécules permettent d'agir sur des modifications cellulaires (altérations, mutations) développées par les cellules cancéreuses. PARP: Poly ADP Ribose Polymerase, VEGR : Vascular Endothelial Growth Factor, HGF : Hepatocyte Growth Factor. Schéma adapté d'après (Hanahan and Weinberg, 2011).

2) Epidémiologie du CCR

Le cancer colorectal (CCR) est, de par sa fréquence, le deuxième cancer chez les femmes, après le cancer du sein, et le troisième chez les hommes, après le cancer des

poumons et de la prostate (Jemal et al., 2011). Il représente la seconde cause de mortalité par cancer dans les deux sexes.

Malgré les campagnes d'information, tel mars bleu, mois consacré au CCR, et la recommandation d'effectuer un test de dépistage au-delà de 50 ans, test HemocultII et plus récemment test immunologique, le CCR reste diagnostiqué à un stade tardif (INCA 2012). La survie relative à 5 ans tous stades confondus est de 56%, passant de 91% pour les stades locaux (stade I ou II), à 70% en cas d'envahissement ganglionnaire (stade III) et 11,3% au stade métastatique (stade IV) (INCA 2012; Bouvier et al., 2008). Au niveau mondial, chaque année, 1,23 millions de personnes développent un CCR et 609 000 décès lui sont imputables. En Europe, l'incidence et la mortalité annuelle s'élèvent respectivement à 450 000 nouveaux cas, et 232 000 décès. Environ 65 % des nouveaux cas ont été observés dans des pays à revenu élevé (chiffres de l'OMS, 2011) (Jemal et al., 2011). En France, en 2012, 42 152 nouveaux cas ont été recensés et 17 722 décès ont été relevés (INCA, 2012). Le Limousin fait partie des régions à forte incidence avec 41.6/100 000 hommes et 25.9/100 000 femmes.

3) Génétique des cancers colorectaux

Différents facteurs peuvent être à l'origine de l'apparition de la maladie, notamment les modifications génétiques et environnementales.

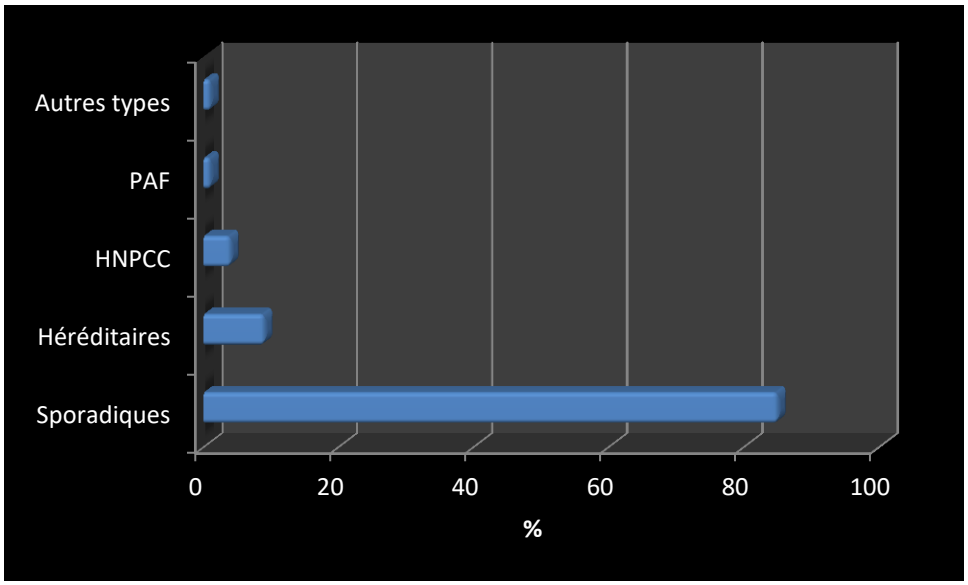


Figure 5: Origines du CCR. Graphique réalisé selon les données de Weitz et al, 2005. PAF: polypose adénomateuse familiale, HNPCC: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer.

La très grande majorité des CCR (90%) sont sporadiques (Weitz et al., 2005). Seulement 5 à 10% des CCR entrent dans le cadre d'une forme héréditaires ou familiale : la polypose adénomateuse familiale (PAF), et le syndrome de Lynch ou HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) (figure 5):

- La polypose adénomateuse familiale (PAF) peut avoir 2 formes : la première est liée au gène *APC (Adenomatous Polyposis Coli)* et a une transmission autosomique dominante (Fearon 2011), la deuxième est liée au gène *MYH*, du système BER (*Base Excision Repair*) (Lefevre et al., 2006) et a une transmission autosomique récessive (Fearon, 2011). Dans la première forme, les sujets atteints ont plus de 500 polypes sur la paroi colique, et le risque de dégénérescence est présent dès la troisième décennie. A la pathologie colique vont s'associer à des degrés divers, des atteintes extra-digestives qui peuvent également mettre en jeu le pronostic vital, (polypose gastrique ou duodénale, cancer du foie, des voies biliares ou de la thyroïde, tumeurs desmoïdes …) (Fearon, 2011; Weitz et al., 2005). La deuxième forme est une forme atténuée, caractérisée par un risque élevé de CCR mais d'apparition plus tardive.

- Le syndrome de Lynch ou HNPCC correspond à des CCR héréditaires survenant sur muqueuse saine, en dehors de tout polype. Il est dû à une anomalie touchant les gènes contrôlant la réparation des mauvais appariements de bases d'ADN lors de sa duplication, au moment de la mitose, les gènes *MMR* (MisMatch Repair) (Fearon, 2011). Généralement diagnostiqué chez des patients d'environ 40 ans, ce syndrome est relativement rare et ne représente qu'environ 4% des CCR. Il s'associe à d'autres cancers, tels les cancers utérins chez la femme.

La PAF et le syndrome HNPCC ne sont pas les seules formes héréditaires de CCR. En effet, il existe d'autres formes beaucoup plus anecdotiques comme les syndromes de Peutz-Jeghers, de la polypose juvénile de Cowden, de Gardner, de Turcot's, ou de la PAF atténuée.

a) Le processus multi étapes

Le cancer est provoqué par l'accumulation de mutations. C'est un processus multi-étapes, correspondant à une atteinte des génétique à l'origine d'une instabilité moléculaire donnant naissance à l'apparition de cellules cancéreuses. Deux types d'instabilité moléculaire peuvent être incriminés dans la cancérogénèse colique:

- ✓ L'instabilité chromosomique.
- ✓ L'instabilité génétique.

- **L'instabilité chromosomique (CIN ou Chromosome INstability):**

Retrouvée dans 80% des cas de CCR, elle est caractérisée par la perte d'allèles sur les bras courts des chromosomes 17 et 18, ou par la perte d'allèles sur les bras long des chromosomes 5, 18 et 22. Dans la très grande majorité des cas, ces altérations entraînent la modification de gènes dit suppresseurs de tumeur : *MYH*, *APC* et *p53*. Les CCR liés à cette instabilité chromosomique sont caractérisés par un phénotype Loss Of Heterozygosity ou LOH+ (Laurent-Puig et al., 2010). L'instabilité chromosomique est impliquée notamment dans la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF).

- **L'instabilité génétique : mutations des régions microsatellitaires**

Retrouvée dans environ 20% des CCR, les CCR provenant d'une instabilité génétique (ou instabilité des loci microsatellites) sont provoqués par un défaut de réparation des mésappariements des bases de l'ADN et aboutissent au phénotype MSI+ (ou Micro Satellite Instability). C'est la déficience du mécanisme de réparation de l'ADN suite à une modification de bras, une délétion, une addition ou une méthylation du promoteur qui est responsable de nouvelles mutations au niveau des loci microsatellites. Ces derniers sont de plus extrêmement sensibles aux erreurs d'appariement lors de la réplication de l'ADN (Laurent-Puig et al., 2010).

Parmi les gènes régulièrement mutés, sont décrits :

- ✓ Le gène du récepteur à l'IGF (Insulin-like Growth Factor), inactivé par des mutations au niveau d'une séquence poly-guanine située dans la région codante et entraînant la production d'un récepteur non fonctionnel.

- ✓ Les gènes codant des protéines intervenant dans l'apoptose telles que Bax et caspase 5. (Laurent-Puig et al., 2010).

- ✓ Le gène *TCF7L2*, codant la protéine TCF4, muté sur une séquence répétée. Ce gène provoque la perte d'expression d'une partie de la molécule interagissant normalement avec le corécepteur transcriptionnel, le CtBP (Fearon, 2011). TCF4 a un rôle répressif sur l'expression de certains gènes impliqués dans la voie Wnt, la dérégulation de cette voie dans le CCR ayant déjà été démontrée (White et al., 2012).

- ✓ Le gène *ACVR2* codant pour le récepteur activine de type II, dont la mutation entraîne une diminution d'expression et est associée à un stade avancé de la maladie (Jung et al., 2006, 2009).

- ✓ Le gène du récepteur de type II du TGFβ, souvent inactivé par des mutations touchant la région codante et notamment une répétition poly-adénine. Ces inactivations entraînent la production d'un récepteur non fonctionnel.

- **Mutations de proto oncogènes**

Les proto oncogènes participent à l'équilibre de la prolifération cellulaire. Leurs mutations sont fortement impliquées dans le CCR. Généralement, les proto-oncogènes induisent un gain de fonctions entraînant une augmentation majeure de la prolifération cellulaire. La mutation d'un seul des deux allèles suffit à l'activation du proto oncogène. Dans le cas du CCR, deux gènes sont fortement incriminés :

- ✓ Le gène *KRAS* codant une isoforme de la petite protéine G ras, impliquée dans la signalisation des facteurs de croissance. Il existe en fait plusieurs

isoformes de KRAS et l'isoforme KRAS2 est le plus souvent atteint. Jusqu'à 40% des CCR sont mutés *KRAS* (De Roock et al., 2011). 90% des mutations sont présentes sur les codons 12 et 13. Dans 10% les mutations sont portées par les codons 61 et 146. La mutation de *KRAS* est un facteur pronostic, car il est directement responsable de la résistance aux traitements par anti Epidermal Growth Factor Receptor (anti EGFR) comme le cetuximab ou le panitumumab (Douillard et al., 2013). Le facteur le plus important intervenant dans la résistance à l'anti EGFR, correspond à la mutation KRAS apportant un gain de fonctions. Elle permet ainsi une activation constitutive de la voie de signalisation. En conséquence, seuls les patients non mutés KRAS peuvent recevoir un traitement par le cetuximab ou le panitumumab. Une étude a toutefois mis en évidence le fait qu'une population importante des patients présentant le gène *KRAS* non muté sont eux aussi résistants à l'anticorps anti EGFR (De Roock et al., 2010). Cette observation laisse supposer qu'il existerait d'autres acteurs impliqués dans l'activité de l'EGFR et intervenant dans ce mécanisme de résistance.

- ✓ Le gène *BRAF* codant pour une isoforme de Raf, protéine sérine thréonine kinase de la famille des MAP kinases, activée en aval de la protéine K-ras. La mutation de *BRAF*, la plus courante étant la mutation V600E qui touche le domaine activateur de la protéine codée par *BRAF*. Cette murtation est retrouvée dans 10 à 20% des CCR. Différents travaux ont montré que la mutation de *BRAF* était associée à un mauvais pronostic (Van Cutsem et al., 2011). Les patients présentant une mutation *BRAF* sont résistants aux traitements utilisant cetuximab et FOLFIRI (association du 5-fluorouracile et de l'irinotécan) (Van Cutsem et al., 2011).

- **Mutations des gènes suppresseurs de tumeur**

A l'inverse des proto oncogènes qui favorisent la prolifération, les gènes suppresseurs de tumeur permettent de la limiter. Les cellules cancéreuses présentent souvent une inactivation de ces gènes entraînant une prolifération incontrôlée (figure 6). Au sein de ce groupe, les gènes les plus souvent inactivés sont :

- ✓ Le gène *APC* régulant la voie de signalisation Wnt en favorisant la dégradation de la β-caténine par protéolyse. Les modifications induites par cette mutation entrainent une suractivation de Wnt provoquant l'apparition d'adénocarcinomes par augmentation de la prolifération cellulaire au niveau des cryptes (Andreu et al., 2005; Schneikert and Behrens, 2007; Voloshanenko et al., 2013). En effet, après mutation du gène *APC*, la β-catenine s'accumule dans le cytoplasme, forme un complexe avec Tcf4, puis est transloquée au noyau activant ainsi les gènes cibles de la voie Wnt/β-catenine (Clevers, 2004a, 2006). Notons de plus, qu'environ 90% des CCR sont sporadiques (Weitz et al., 2005) et induits par une mutation du gène *APC*.

- ✓ Le gène *PTEN (Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10)*, inhibiteur de la voie PI3K/Akt (phosphatidylinositol triphosphate kinase), activée en aval de la signalisation par les facteurs de croissance (Zhang and Yu, 2010). L'inactivation de PTEN est souvent retrouvée dans les cas de mutations avec instabilité microsattellitaire importante (comme dans le cas des mutations *BRAF*) (Day et al., 2013). La perte de *PTEN* est associée à une diminution de l'effet du Cetuximab et à une augmentation de la croissance cellulaire et de la transition épithélio mésenchymateuse (TEM) (Frattini et al., 2007). Au contraire, l'augmentation de l'expression de *PTEN* permettrait d'inhiber la croissance cellulaire par augmentation de la mort apoptotique (Dupont et al., 2002; Sun et al., 2015).

- ✓ Le gène *TP53* codant la protéine p53. Il est régulièrement muté dans les CCR. Dans 80 à 90% des CCR, il s'agit de mutations faux sens, apparaissant au niveau des codons 175, 245, 248, 273 et 282. La p53, aussi appelée « gardien du génome », est un facteur de transcription agissant lors de stress cellulaire, comme dans les cas de modification d'expression d'oncogènes, de dommages de l'ADN... Quand p53 est activée la transcription de gènes cibles l'est aussi, entraînant des évènements temporaires (arrêt du cycle cellulaire) ou permanent (entrée en quiescence) voire l'induction de l'apoptose notamment mitochondriale (Vaseva and Moll, 2009; Watson,

2004). Cette voie est également impliquée dans le contrôle de l'autophagie et la duplication des centrosomes (Morselli et al., 2011; Nakamura et al., 2013). La p53 mutée semble être capable d'augmenter la croissance des cellules cancéreuses ainsi que leur capacité d'invasion (Muller et al., 2011; Rivlin et al., 2011).

- ✓ Le gène *DCC (Deleted in Colorectal Cancer)* codant pour une glycoprotéine transmembranaire. C'est un récepteur capable d'induire l'apoptose en absence de son ligand, la nétrine-1 (appartenant aux protéines de la matrice extracellulaire). La nétrine-1 initialement impliquée dans le guidage axonal des cellules du système nerveux central, est produite à la base des cryptes intestinales, alors que la protéine DCC est exprimée le long des villosités. Une importante réduction de l'expression de DCC a été observée dans 90% des CCR (Coissieux et al., 2011). Lorsque le gène DCC est muté on observe une perte d'adhésion des cellules cancéreuses augmentant leurs propriétés prolifératives et invasives (Armaghany et al., 2012; Fearon and Pierceall, 1995).

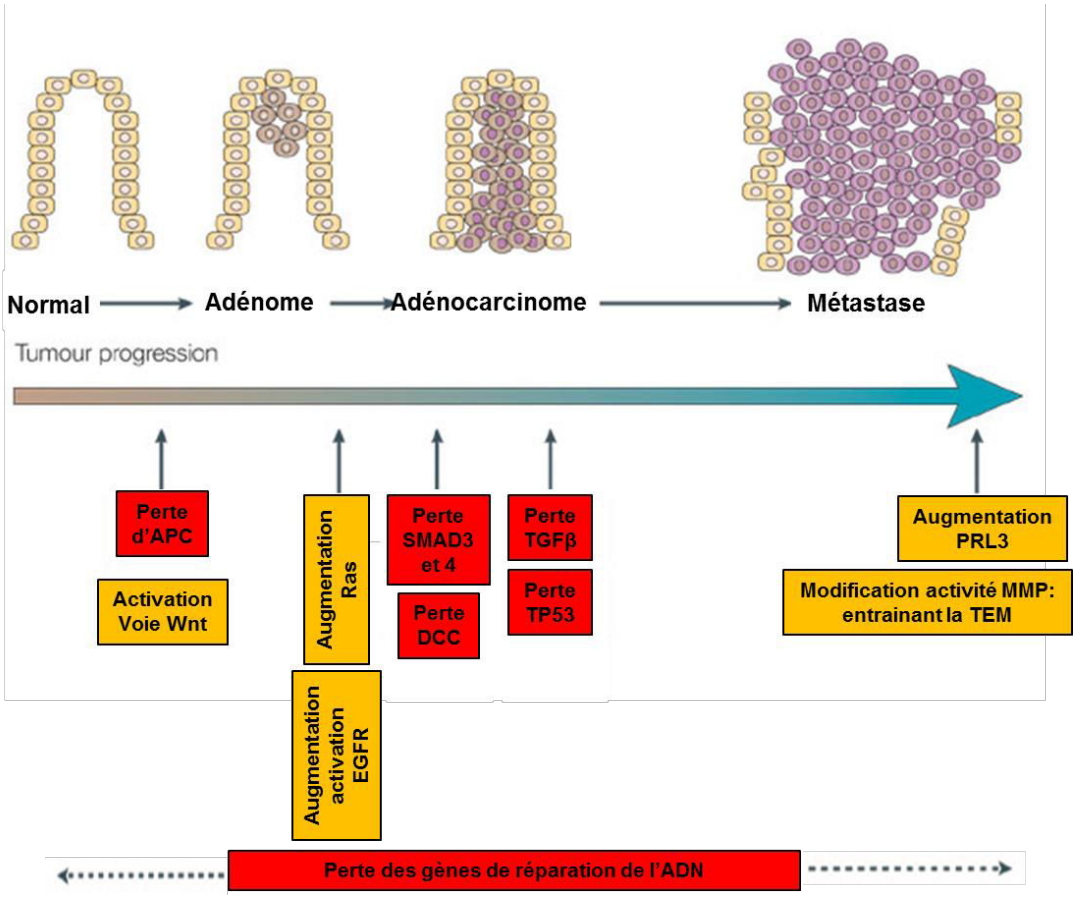


Figure 6: Mutations et progression tumorale.

Dans le CCR, la formation de lésions progressives avec une modification des propriétés cellulaires est observée. La mutation de certains gènes a été identifiée dans différents stades de CCR. APC : Adenomatous polyposis ; EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor ; Ras : protéine de signalisation ; SMAD 3 et 4 : protéines de signalisation en aval de TGFβ ; DCC : Deleted in Colorectal Cancer ; TGFβ : Transforming Growth Factor ; TP53 : suppresseur de tumeur ; PRL3 : gène impliqué dans l'apparition de métastases. Schéma adapté d'après (Green and Hudson, 2005).

En parallèle de l'observation des diverses mutations génétiques impliquées dans la cancérogénèse colique, l'émergence d'une nouvelle théorie, celle des cellules souches cancéreuses ou CSC (Hayat, 2011) connaît un intérêt grandissant.

b) Les cellules souches cancéreuses

Les CCR présentent une forte hétérogénéité cellulaire. Ils sont constitués d'un amas de cellules, cellules endothéliales, musculaires, fibroblastes, immunitaires …. Au fond des

cryptes intestinales, existe une petite population cellulaire correspondant aux cellules souches (CS). Leur division est asymétrique, donnant une nouvelle cellule souche et les autres types cellulaires composant la crypte intestinale (Boman and Huang, 2008). Les cellules souches saines sont capables de dégénérer et de se transformer en cellules souches cancéreuses (CSC) après mutations (Reya et al., 2001). Les CS sont des cellules indifférenciées capables de redonner les différents types cellulaires (suite à des divisions asymétriques). De plus, elles sont aussi capables d'auto-renouvèlement (par divisions symétriques) et d'une prolifération illimitée. L'ensemble de ces caractères sont partagés avec les CSC.

La présence de CSC pourrait expliquer la résistance thérapeutique et la récidive (Figure 7). Les CSC ont un cycle cellulaire plus long que les cellules normales (Moore and Lyle, 2010), ce qui les rapproche de la quiescence. Elles sont moins sensibles que les autres cellules aux traitements existants puisqu'ils visent les cellules différenciées, le plus souvent en division. C'est par exemple le cas du 5-fluorouracil (5-FU) bloquant la phase S du cycle cellulaire. Cependant, des études ont suggéré que 2 pools distincts de CS co-existent (Buczacki et al., 2011; Mélin et al., 2012; Scoville et al., 2008). Le premier correspond aux CS quiescentes (réserve cellulaire) et le second aux CS dites « actives » ou cyclantes (réceptrices et répondantes aux signaux cellulaires environnants). Les premières, de par leur propriété quiescente, seraient insensibles aux différents traitements. Les CS « actives » par contre présenteraient une sensibilité.

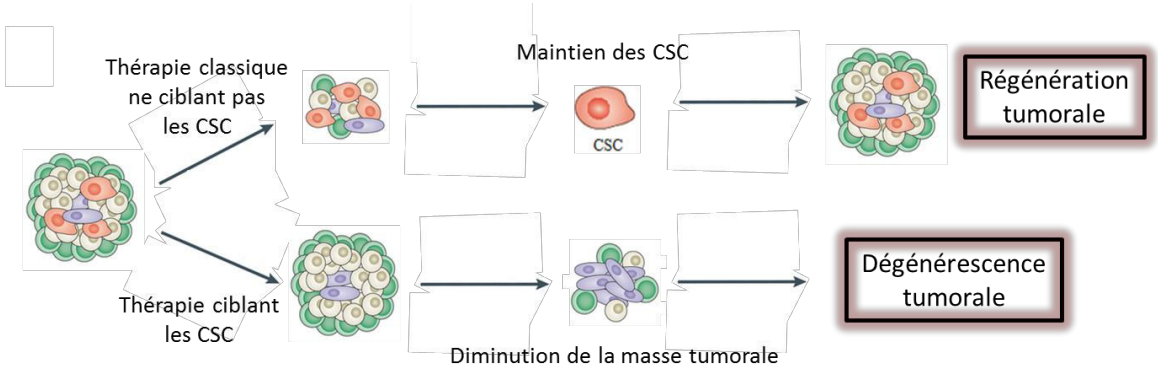


Figure 7: Tumeurs et cellules souches cancéreuses.

Les tumeurs sont composées d'une population cellulaire hétérogène. Les thérapies classiques ne ciblent « que » les cellules différenciées en division. Cela conduit au maintien des CSC et à la régénération tumorale. Au contraire l'utilisation de traitements ciblants les CSC permettrait une diminution de la masse tumorale pour aboutir à une dégénérescence tumorale complète. Schéma adapté d'après (Beck and Blanpain, 2013).

Les CSC expriment un marqueur particulier, une glycoprotéine : CD133 (Yang et al., 2011a). Les cellules exprimant ce marqueur sont capables de régénérer en intégralité la tumeur laissant ainsi supposer leur potentiel de CS (Ricci-Vitiani et al., 2009). Cependant, ce marqueur a été retrouvé sur des cellules différenciées de tissu sain colique. L'implication du CD133 étant controversée, de nouveaux marqueurs ont été identifiés (Mathonnet et al., 2014) comme CD44 ou CD166 ou encore l'Epithelial Cell Adhesion Molecule ou EpCAM, qui reste à l'heure actuelle le plus reconnu. La mise en évidence des CSC dans les CCR permet d'expliquer en partie l'échec des thérapies locorégionales ou systémiques. Améliorer la caractérisation des CSC devrait permettre le développement de thérapies plus adaptées.

III- Classification des CCR

Historiquement la première classification du CCR a été établie par Dukes en 1932. Cette classification, comme les suivantes, a pour but d'améliorer la prise en charge des patients. En 1954, Alster et Coller l'ont modifiée. Puis en 1987, l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) a proposé la classification internationale pTNM (pathology Tumor Node Metastasis). Cette classification a été réalisée en accord avec l'American Joint Comitte for Cancer Staging. Elle est régulièrement révisée. La classification actuellement utilisée correspond à la 7ème édition (Tableau 1).

Tumeur primitive (T)
Tis : Carcinome *in situ* : tumeur intra-épithéliale ou envahissant la *lamina propria* sans extension à la sous-muqueuse
T1 : La tumeur envahit la sous-muqueuse sans la dépasser
T2 : La tumeur envahit la musculeuse sans la dépasser
T3 : La tumeur envahit la sous-séreuse sans atteinte du revêtement mésothélial et le tissu péricolique non péritonéalisé
T4 : La tumeur perfore le péritoine viscéral et/ou envahit les organes avoisinant
NX : Ganglions non évalués ou moins de 8 ganglions examinés
N0 : Absence de métastase ganglionnaire régionale
N1 : Métastase dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N2 : Métastase dans 4 ou plus ganglions lymphatiques régionaux
MX : Statut métastasique inconnu
M0 : Pas de métastases
M1 : Présence de métastases à distance (dont ganglions iliaques externes ou iliaques communs)

Tableau 1 : Classification internationale pTNM des CCR.

La classification pTNM permet d'établir 5 stades de CCR (figure 8). Le stade 0 correspond à une atteinte de la muqueuse sans dépassement de la lamina propria, le stade I à une atteinte de la muqueuse, sans dépassement de la sous muqueuse. Le stade I va évoluer en stade II par atteinte de la musculeuse. Le stade III correspond à un CCR avec un envahissement des ganglions locaux. Enfin le stade IV répond au stade de métastases à distance, les organes les plus souvent touchés étant le foie et le poumon.

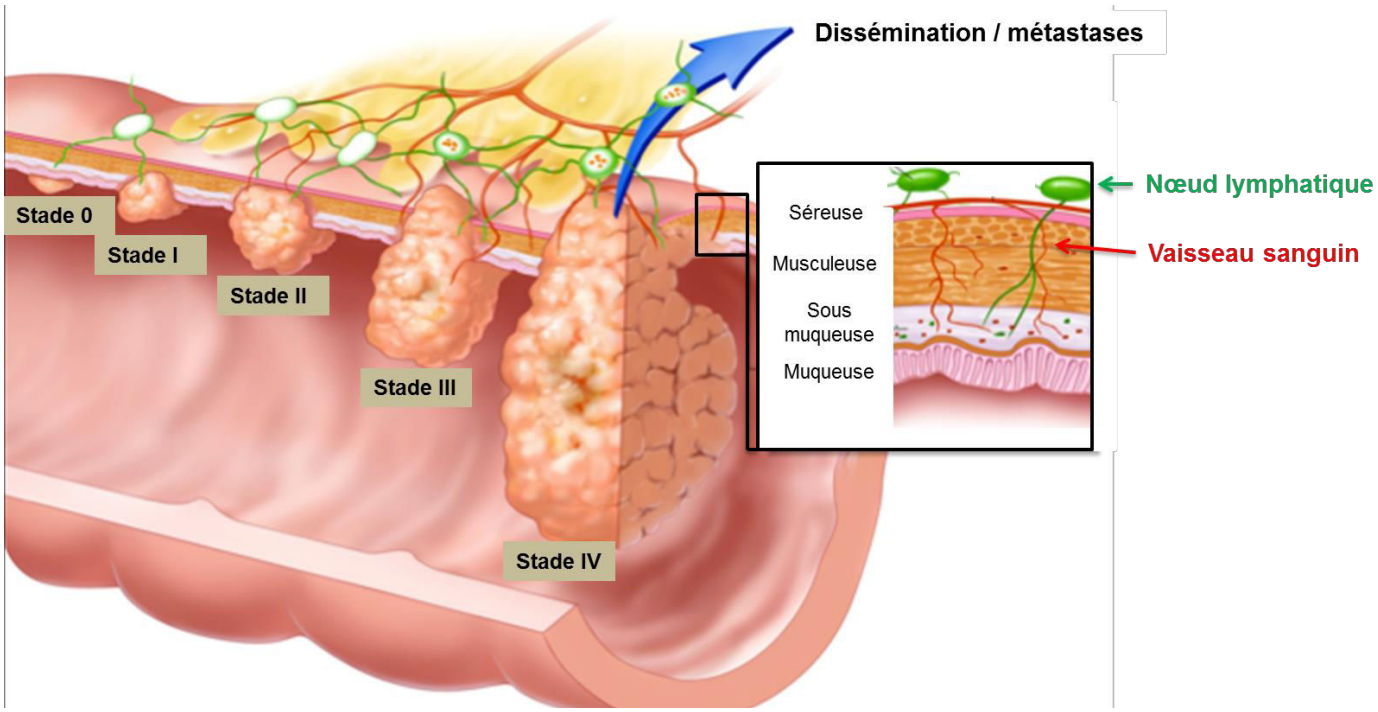


Figure 8: Evolution des stades cancéreux du cancer colorectal.
La classification internationale « Tumor Nodes Metastasis » met en évidence l'existence de 5 stades de CCR : 0, I, II, III et IV. Schéma adapté d'après le National Cancer Institute.

La survie relative des patients atteints de CCR dépend directement du stade de la maladie (tableau 2). La survie relative varie de 93,2% pour les stades I à environ 11,6% pour les stades IV (INCA, 2012). Les nouvelles thérapies actuellement proposées (polychimiothérapies, thérapies ciblées, chimio hyperthermie péritonéale (CHIP) pour les carcinoses) ont permis d'améliorer de manière importante la survie des patients.

Classification CCR internationale (AJCC) /Duke	Type d'atteinte	Survie relative à 5 ans
I/A	T1 / T2, absence de métastases	93,2%
II/B	T3 / T4, absence de métastases	82,5%
III/C	T1 / T2 / T3 / T4, invasion périphérique	59,5%
IV/D	T1 / T2 / T3 / T4, invasion périphérique + métastases à distance	8,1%

Tableau 2 : Survie relative à 5 ans chez les patients atteints de CCR. D'après (Church et al., 2013).

IV- Bases thérapeutiques et nouvelles cibles thérapeutiques

A l'heure actuelle, le seul traitement curatif reste la chirurgie. Une résection endoscopique peut être proposée pour les polypes, siège d'adénocarcinome *in situ*. La résection chirurgicale correspond à l'ablation en bloc du segment colique tumoral et des ganglions lymphatiques de drainage régionaux. Cependant, seuls les stades précoces, stades I ou II de la maladie peuvent être traités par chirurgie seule. Dès le stade III, ou s'il existe des facteurs de mauvais pronostic pour les stades II (moins de 12 ganglions réséqués, instabilité microsatellitaire, contingent mucineux supérieur à 40% …) une chimiothérapie adjuvante est proposée. Dès lors, il peut être intéressant d'analyser le taux de cellules immunitaires présentes au sein de la tumeur (via la réalisation de biopsies) (Anitei et al., 2014). En effet, l'immunoscore obtenu peut alors être utilisé comme marqueur pronostic et permettre de prédire la présence ou l'absence de réponse aux traitements chimiothérapeutiques (Anitei et al., 2014).

Au stade métastatique, le traitement repose la polychimiothérapie associée à une thrérapie ciblée, si l'état général du patient et le statut mutationnel le permettent, le but étant d'amener à un stade résécable la masse tumorale. Un des problèmes majeurs du CCR reste

son diagnostic tardif : dans plus de 40% des cas, il est diagnostiqué au stade III ou au stade IV (Weitz et al., 2005). Aucune chimiothérapie ne peut à elle seule éradiquer la pathologie. Si le patient est répondeur, les chimiothérapies ou les thérapies ciblées peuvent diminuer la masse tumiorale. De plus, l'utilisation en laboratoires de modèles murins peut apporter de nouvelles connaissances sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Notons enfin que des travaux récents démontrent que l'utilisation d'organoïdes constitue aussi un modèle de recherche de nouveaux traitements fortement interessant (Clevers, 2016).

1) La chimiothérapie

Actuellement, il existe différentes molécules de chimiothérapie capables d'altérer la réplication de l'ADN. Les plus utilisées sont les suivantes :

- Le 5-fluoro-uracile (5-FU). Il s'agit d'un analogue de la pyrimidine ayant un rôle antimétabolique. C'est le médicament de référence en cancérologie intestinale. Il permet d'inhiber la fonction de la thymidilate synthase qui elle-même a pour fonction de méthyler une désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP). Or, la dTMP correspond à l'une des quatre bases de l'ADN. La réplication de l'ADN est ainsi bloquée.

- L'Oxaliplatine. Il s'agit d'un sel de platine à action cytotoxique. Il entraîne l'inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN suite à la création de ponts entre 2 guanines adjacentes.

- L'irinotécan ou CPT-11. C'est un dérivé de la camptothécine. Cette molécule inhibe l'activité de la topoisomérase I indispensable à la relaxation de l'hélice d'ADN lors de la transcription et de la réplication. L'irinotécan forme un complexe avec la topoisomérase I et l'ADN provocant ainsi l'apparition de cassures de l'ADN cellulaire.

Plusieurs combinaisons peuvent être proposée. Le plus souvent, l'oxaliplatine et de l'irinotécan sont associés au 5-FU lors du traitement de métastases. Ces protocoles sont connus sous le nom de FOLFOX et FOLFIRI (Sharif et al., 2008). La combinaison des 4 molécules, connue sous le nom de FOLFIRINOX (association des deux protocoles précédents) permet d'améliorer significativement la survie des patients, mais majore le

risque de toxicité. L'utilisation des protocoles dépend donc du stade tumoral, mais également de l'état général des patients, et des toxicités induites.

Les récidives surviennent dans 80% dans les 2 ans qui suivent le traitement initial. Récidives et résistances thérapeutiques sont liées aux mutations mises en évidence dans le CCR. De nouvelles stratégies thérapeutiques ont été élaborées, reposant sur la mise en place de modèles d'études ainsi que sur les voies d'activation de la cancérogenèse.

2) Les modèles murins de CCR

Malgrè l'existence de chimiothérapies efficaces, il est à l'heure actuelle nécessaire de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer les traitements. Dans cette optique, l'utilisation de modèles murins prend une place de choix. En effet, des modèles murins mutés pour certains gènes ont été developpés. Comme il a déjà été mentionné, les mutations du gène APC sont retrouvées dans 90% des CCR sporadiques. Par conséquent le modèle murin muté pour le gène *APC* représente un choix par excellence (Karim and Huso, 2013; Lévy et al., 2015). D'autres modèles de souris génétiquement modifiées sont développés. Par exemple, il est possible d'utiliser un modèle mimant le syndrôme de Lynch (HNPCC) représentant 3 à 5% des CCR (Leach et al., 1993).

Des modèles murins chimiquement induits ont aussi été réalisés pour étudier le CCR. De nombreuses molécules peuvent être administrées à l'animal comme le dimethyhydrazyne, l'azoxyméthane, le sel de dextran ou le N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Le développement du cancer dépend alors de la dose des molécules administrées (Karim and Huso, 2013).

D'autres types de modèles murins peuvent être obtenus par la réalisation de greffes. En effet, il est tout à fait possible de mettre en place des greffes orthotopiques. Ces dernières permettent d'obtenir un environnement tumoral plus proche de celui retrouvé chez l'Homme puisque les cellules sont directement déposées au niveau de l'intestin (Nanda et al., 2006). L'avantage de ce type de greffe repose également sur la possibilité d'obtenir des métastases visibles par imagerie. Néanmoins, un inconvénient majeur existe car la réalisation de ce type de greffes reste très complexe (acte chirurgical et conséquences de l'opération sur l'animal).

Enfin, depuis quelques années de nouvelles recherches ont démontré que de nouveaux modèles murins pour le CCR peuvent être répertoriés. En effet, la mutation du

gène p53 augmente la prolifération abérante des cryptes intestinales (Ramanathan et al., 2012). Une seconde étude montre que la mutation du site catalytique de la PI3K engendre une activation constitutive de la protéine entrainant l'apparition d'adénocarcinomes mucineux (Leystra et al., 2012). Ces données corroborent celles de Sasaki et al qui ont montré que l'absence de la p110 (sous unité catalytique de la PI3K) entraine le développement spontané de cellules de CCR (Sasaki et al., 2000). Ces données mettent en avant le role déterminant de dérégulation des voies de signalisation dans l'émergence des CCR et dans la nécessité d'adapter de nouvelles thérapies.

3) Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées ont un mode d'action qui vise à cibler des voies très précises de signalisation cellulaire qui entrainent un phénotype cancéreux lorsqu'elles sont dérégulées. A la différence de la chimiothérapie, les thérapies ciblées se basent sur une connaissance plus poussée des mécanismes moléculaires en cancérogénèse. D'une manière générale, trois mécanismes sont utilisés : le premier consiste à bloquer l'interaction du ligand avec son récepteur, le second vise à bloquer le récepteur membranaire directement et le dernier cible l'activation des voies de signalisations induites par les récepteurs à activité tyrosine kinase.

Parmi les thérapies ciblées, les anticorps monoclonaux ont été développés, comme par exemple l'anti VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), retrouvé sous le nom de bevacizumab et sous le nom commercial d'Avastin® (Ferrara et al., 2005). Les anti VEGF permettent de bloquer la vascularisation et notamment la néoangiogénèse au niveau tumoral. Ceci entraine une privation nutritive de la tumeur. Les anti EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) comme le cetuximab (retrouvé sous le nom générique d'Erbitux®) ou le panitumumab diminuent la prolifération tumorale. En effet, ils empêchent l'activation du récepteur (EGFR), celui-ci étant fortement surexprimé dans les CCR (Spano et al ; 2005). Néanmoins, les anti EGFR restent restreints aux patients présentant une absence de mutations *KRas* et *BRaf* (Konda et al., 2015). Enfin, des anti tyrosine kinases ont aussi vu le jour, (Arora and Scholar, 2005; Gotink and Verheul, 2010) permettant ainsi d'inactiver les voies de prolifération cellulaire normalement induite par ce type de récepteur. Dans cette catégorie, on retrouve par exemple l'entrectinib (inhibiteur des tyrosines kinases) dans certains essais cliniques (ALKA-372-001) (Sartore-Bianchi et al., 2016). Néanmoins son rôle devient controversé puisque des résultats montrent que son activité peut être inefficace sur certains récepteurs comme TrkA (Russo et al., 2016). Une autre étude clinique ciblant les

Trk dans les cas de tumeurs solides, grâce à l'inhibiteur LOXO-101 est aussi en cours d'étude (NCT02122913). On retrouve aussi dans cette catégorie des thérapies ciblées des inhibiteurs de mTOR agissant sur la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR comme le temsirolimus, l'évérolimus ou le deforolimus et utilisés dans plusieurs types de cancer (notamment du rein et du sein) (Patel et al., 2016; Royce and Osman, 2015).

Ces thérapies ciblées peuvent être associées à la chimiothérapie. Elles permettent alors d'augmenter et d'améliorer la survie relative du patient.

Même si ces traitements développés récemment ont permis une nette amélioration de la prise en charge des patients, les récidives et résistances rencontrées sont encore présentes. En effet, dans les cas de stades avancés, c'est-à-dire de cancer métastatique, des résistances aux traitements ont été répertoriées (Hammond et al., 2016; Temraz et al., 2014). Cette résistance n'étant pas immédiate (patients répondeurs au traitement dans les premiers temps), elle peut être expliquée par deux phénomènes : l'existence de cellules cancéreuses résistantes dès le départ, qui pourraient être apparentées aux cellules souches cancéreuses et le développement de nouvelles voies de signalisation. Dans le premier cas, il s'agit de résistance innée (De Roock et al., 2011). Dans le deuxième cas, le mécanisme de résistance pourrait aussi être induit par les traitements eux-mêmes, favorisant le développement et l'activation de nouvelles voies de signalisation pour restaurer les voies inactivées, activer des voies desurvie, ou inactiver des messages induisant la mort cellulaire. On parle alors de résistance acquise (De Roock et al., 2011).

Parmi les voies intracellulaires impliquées dans la prolifération, les études récentes montrent un rapport étroit avec l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs (Akil et al., 2011; Bellanger et al., 2011; De la Cruz-Morcillo et al., 2016; Dubanet et al., 2015; Harel et al., 2010). L'inhibition des récepteurs aux neurotrophines Trk devient par conséquent un sujet majeur de recherche (Maurel and Postigo, 2015). Pour réaliser l'inhibition des neurotrophines, nous avions aussi envisagé de réaliser des shRNA dirigés contre le récepteur TrkB. Cependant, après réalisation de la transfection, le shRNA devenait létal pour les cellules empêchant ainsi l'utilisation de cette méthode. Dans cette étude nous avons donc choisi d'utiliser le K252a comme inhibiteur des récepteurs Trk. Néanmoins, le K252a n'est pas la seule molécule inhibitrice des récepteurs à activité tyrosine kinase et notamment des récepteurs Trk. Il est possible de citer d'autres agents pharmacologiques comme l'entrectinib, l'AZ623, le GNF 5837 (Albaugh et al., 2012; Ardini et al., 2016; Zage et al., 2011) ou bien des antagonistes comme l'ANA12 (Cazorla et al., 2011) ou l'HIOC sélectif du récepteur TrkB.

CHAPITRE 2 : LES NEUROTROPHINES

I- Généralités

Les neurotrophines (NTs) constituent une famille de facteurs de croissance (Skaper, 2012), composée du *Nerve Growth factor* (NGF) caractérisé en 1956 (Levi-Montalcini and Cohen, 1956), du *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) caractérisé en 1982 (Barde et al., 1982), de la neurotrophine 3 (NT-3) mise en évidence en 1990 (Hohn et al., 1990) et la neurotrophine 4/5 (NT-4/5) identifiée en 1992 (Ip et al., 1992). Les neurotrophines 6 et 7 ont aussi été découvertes (Nilsson et al., 1998) mais restent beaucoup moins étudiées.

Les NTs sont des facteurs de croissance impliqués dans la prolifération, la différentiation, la survie cellulaire et l'apoptose (Skaper, 2012). Elles ont été découvertes à l'origine dans le système nerveux central et exercent un rôle physiologique dans la croissance et la plasticité neuronale. Depuis quelques années, leur expression a été également retrouvée dans les cellules cancéreuses, où elles remplissent de nouvelles fonctions, en relation avec le processus de cancérisation. La surexpression de leurs récepteurs (Trk, $p75^{NTR}$) est également impliquée dans la cancérogénèse. Par ailleurs,la sortiline, transporteur des NTs, est elle aussi un sujet actuel de recherche.

II- Les Neurotrophines

Les gènes des NTs dérivent d'un même gène ancestral particulièrement bien conservé au cours de l'évolution (Hallböök et al., 1991). Ils sont retrouvés sur le chromosome 1 pour NGF, le 11 pour BDNF, le 12 pour NT-3 et le 19 pour NT4/5. Il existe plusieurs variants transcriptionnels de chaque NT, provenant d'un mécanisme d'épissage alternatif.

Même si les NTs sont différentes, leur synthèse demeure fortement semblable. Elles sont originaires d'un précurseur d'environ 260 acides aminés, la pré-pro-neurotrophine (figure 9). Elle subit un clivage au niveau du réticulum endoplasmique (ablation du pré-domaine) pour donner une pro-NT (Seidah et al., 1996; Suter et al., 1991). De la même manière, cette dernière va être clivée (suppression du pro-domaine au niveau d'un domaine Lys Arg et Arg Arg) pour obtenir une NT mature d'environ 120 acides aminés (Seidah et al., 1996; Teng et al., 2010). Ces clivages sont réalisés par des protéases particulières comme

la furine appartenant à la famille des proconvertases. La NT mature peut alors être libérée par la cellule. D'autre part, les pro-NTs peuvent être clivées dans le milieu extra-cellulaire par des protéases comme certaines métalloprotéases (MMP-3, MMP-7 ou MMP-9) (Pang, Teng et al., 2004)

De manière étonnante la synthèse de la forme finale peut varier selon la NT considérée. En effet, le NGF est principalement sécrété sous forme mature pour favoriser la survie cellulaire. Au contraire, le BNDF est majoritairement produit sous forme de pro-NT (Mowla et al., 1999) afin de créer un stock rapidement utilisable.

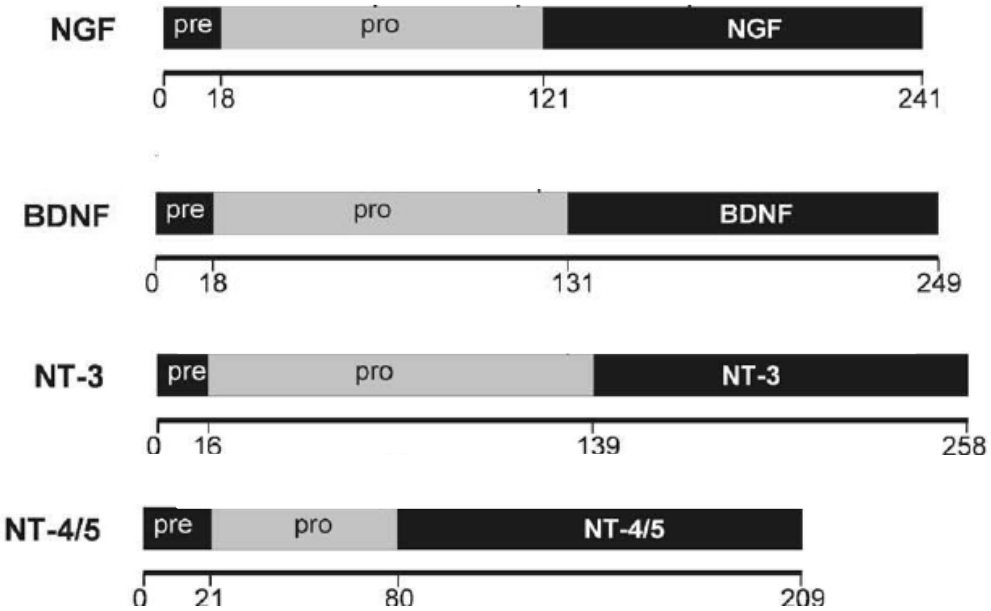


Figure 9: Synthèse des neurotrophines. Le peptide signal ou pré domaine (de 16 à 21 aa), le pro domaine et le domaine de la NT mature sont représentés. Le pré domaine va être clivé au niveau du réticulum endoplasmique. Le transport des pro NTs est ensuite assuré jusqu'à l'appareil de Golgi. Dès ce stade, la sécrétion de pro NTs ou de NTs matures est possible. C'est par l'action de furines et de proconvertases qu'a lieu le clivage intracellulaire en NTs matures. Dans certaines conditions, ce clivage est extra cellulaire, et est alors réalisé par des métalloprotéases. Schéma adapté d'après (Lessmann et al., 2003).

III- Les récepteurs des NTs

Pour déclencher une signalisation cellulaire, les NTs doivent se fixer sous forme de dimère à un récepteur spécifique. Ils sont classés en 2 grandes familles (Chen et al., 2009; Schecterson and Bothwell, 2010) (figure 10) :

- ✓ Les récepteurs de la famille Trk, dits de « haute affinité » pour les NTs matures, présentent un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. Ils sont retrouvés sous trois variants : TrkA, TrkB et TrkC, fixant respectivement le NGF, le BDNF et la NT3.Lors de son activation par le ligand (NT), le récepteur va s'homodimériser, ce qui entraîne une trans-phosphorylation des régions intracytoplasmiques (Friedman and Greene, 1999a).

- ✓ Le récepteur $p75^{NTR}$ appartenant à la famille des récepteurs TNF (Tumor Necrosis Factor), est dit de « faible affinité » pour les NTs matures, alors qu'il possède une forte affinité pour les pro-NTs. Du fait qu'il présente un domaine de mort intracellulaire (death domain), il est capable d'induire une signalisation apoptotique (Arévalo and Wu, 2006).

Il est important de noter que d'une manière générale il existe une dualité fonctionnelle des NTs. En effet, les pro-NT ont une activité pro-apoptotique notamment via leur interaction avec le récepteur $p75^{NTR}$. Au contraire les NTs matures présentent une activité pro-survie du fait de leur liaison aux récepteurs Trk.

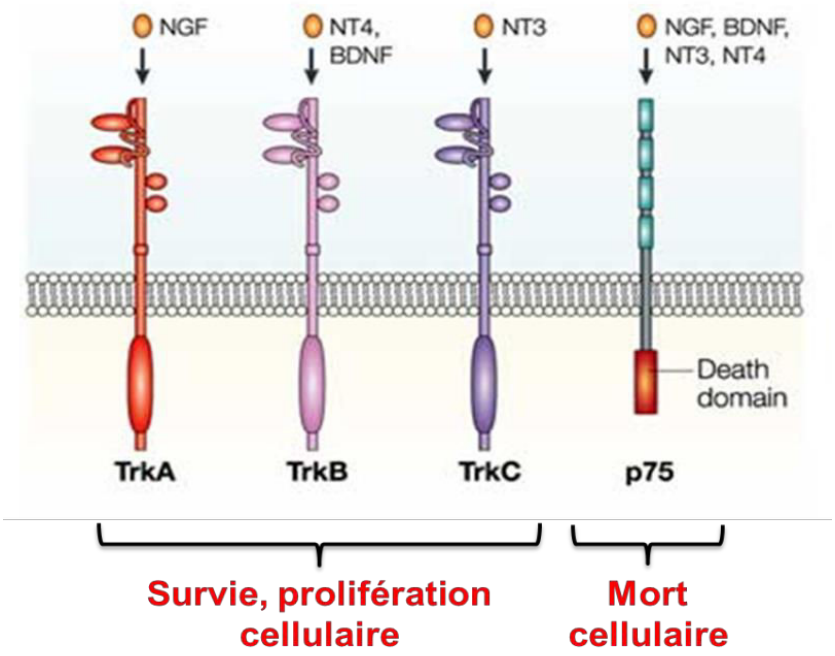


Figure 10 : Récepteurs aux NTs. Deux familles de récepteurs aux NTs existent : les récepteurs TrK de haute affinité et le récepteur $p75^{NTR}$ de faible affinité. D'après (Chao, 2003).

1°) Les récepteurs Trk à activité tyrosine kinase

En 1986, a eu lieu la première description du gène codant le récepteur TrkA : *NTRK1* (Neurotrophin Receptor Kinase) (Martin-Zanca et al., 1986). Il a été décrit comme proto-oncogène localisé sur le chromosome 1. En 1991, ce récepteur a été caractérisé comme récepteur spécifique au NGF (Kaplan et al., 1991a). Quelques années plus tard, les récepteurs TrkB et TrkC ont été identifiés.

Les récepteurs aux NTs, qui font partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), présentent une très forte homologie de structure (figure 11). Ils présentent un domaine transmembranaire unique, constitué d'une vingtaine d'acides aminés hydrophobes. Il fait suite au domaine N-terminal extracellulaire permettant la fixation du ligand et spécifique de celui-ci. Cette région est riche en leucine, en cystéine et possède 2 domaines « Immunoglobuline-like » (Ig like). La partie intra cellulaire du récepteur contient le domaine à activité tyrosine kinase (Patapoutian and Reichardt, 2001). Elle présente des résidus tyrosines, cibles de l'autophosphorylation, qui enclenchent la suite de la signalisation.

Parmi les récepteurs de type Trk, trois variants sont retrouvées : TrkA, TrkB et TrkC fixant un ligand spécifique. Pour le TrkA il s'agit du NGF, pour TrkB la liaison est effectuée principalement avec le BDNF mais aussi avec la NT4/5 et avec NT3 pour le TrkC. En absence de ligand spécifique, le récepteur, aura la possibilité de lier d'autres NTs. Par exemple, la NT-3 peut interagir avec TrkA et TrkB et activer une signalisation intracellulaire (Rydén and Ibáñez, 1996).

Lors de son activation, le récepteur va lier son ligand au niveau du domaine extra cellulaire immunoglobuline like. De plus, certains travaux ont mis en évidence l'existence de liaisons entre la NT et les régions riches en leucines (Urfer et al., 1995).

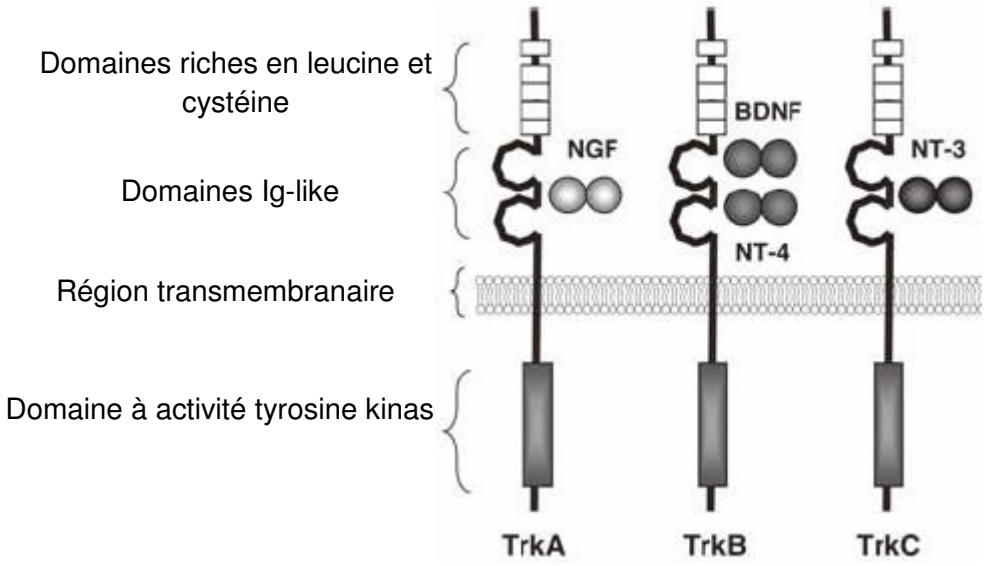


Figure 11: Les récepteurs Trk. Tous les récepteurs Trk (A, B et C) possèdent une structure commune : le domaine extracellulaire contenant des domaines cystéines, leucine et Ig-like, le domaine transmembranaire formé par une courte hélice α et le domaine intracellulaire possédant l'activité tyrosine kinase. La fixation du ligand entraine la dimérisation de celui-ci grâce aux deux domaines Ig-Like. Schéma adapté d'après (Arévalo and Wu, 2006).

a) Le récepteur TrkA

Il existe différents isoformes de TrkA, résultants d'un épissage alternatif du gène *NTRK1* (Kaplan et al., 1991b) (figure 12).

- La première forme est le récepteur TrkA-I qui est issu de l'épissage de l'exon 9. Ce récepteur est majoritairement retrouvé dans des tissus non neuronaux. Il présente la particularité d'être incapable de lier la NT3.

- Une seconde forme, TrkA-II, résulte de l'expression de l'intégralité du gène. C'est par conséquent la forme la plus longue de la famille. Elle est majoritairement retrouvée au sein des tissus neuronaux.

- La dernière forme de la famille est la forme TrkA-III. C'est l'isoforme la plus courte car elle provient de l'épissage des exons 6, 7 et 9. Son expression constitue un facteur de très mauvais pronostic. En effet, ce récepteur possède la capacité de pouvoir s'autophosphoryler seul, c'est-à-dire de s'autoactiver, sans la présence de son ligand. De plus, il semble qu'il soit capable de favoriser la résistance aux stress dans les lignées cellulaires (Tacconelli et al., 2005).

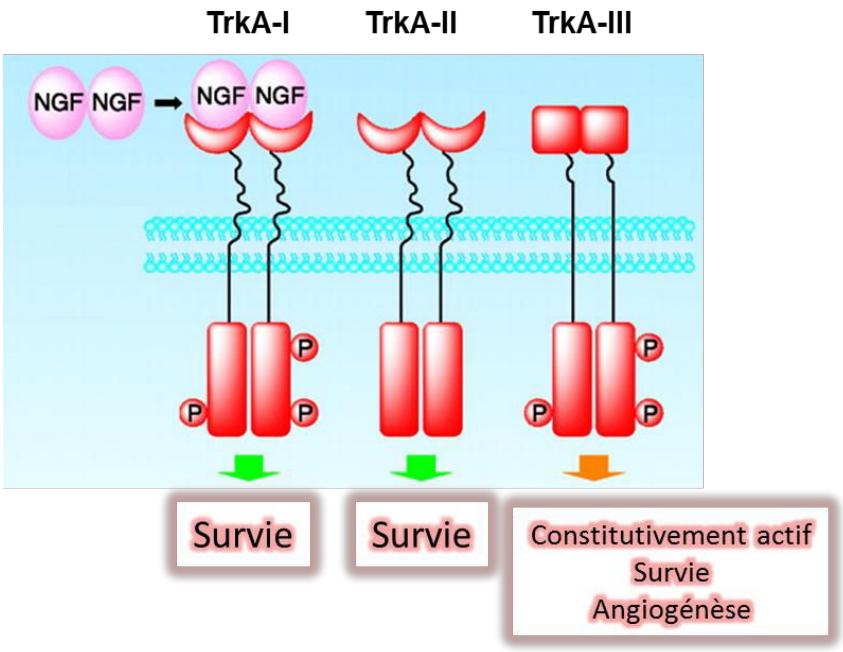


Figure 12: Les différentes isoformes du récepteur TrkA. Le récepteur TrkA est retrouvé sous trois formes majoritaires. Les isoformes TrkA-I et TrkA-II sont actives après dimérisation et transphosphorylation. Ils sont retrouvés respectivement dans les tissus non neuronaux et neuronaux. L'isoforme TrkA-III est quant à elle capable de s'autoactiver en absence de son ligand. Elle est par conséquent fortement impliquée dans la résistance cellulaire. Schéma adapté d'après (Brodeur et al., 2009).

b) Le récepteur TrkB

Le récepteur TrkB est le second membre de la famille des Trk découvert en 1986 (Martin-Zanca et al., 1986). Comme les transcrits du gène *NTRK2* sont fortement soumis au phénomène d'épissage alternatif, de nombreux ARNm peut être retrouvée (Stoilov et al., 2002). Parmi les 10 isoformes retrouvées, 3 d'entre elles sont produites majoritairement (Stoilov et al., 2002; Thiele et al., 2009) (figure 13).

- La forme entière du récepteur aussi appelée Full Lenght ou TrkB-FL. Cette isoforme est produite par un transcrit épissé de l'exon 16 et de l'exon 19. Il possède l'intégralité des domaines extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire (activité tyrosine kinase) (Barbacid, 1995; Patapoutian and Reichardt, 2001). Il s'agit de la forme « classique » et fonctionnelle du récepteur qui a un poids moléculaire de 145kDa.

- La forme tronquée est l'isoforme la plus courte des TrkB aussi appelée TrkB-T1. Ce récepteur n'est pas issu d'un épissage du gène, mais le transcrit contient un codon stop dans l'exon 16 ; la protéine qui en résulte ne possède pas de partie intracellulaire (domaine à activité tyrosine kinase) et a un poids moléculaire de 95kDa. Cependant, tout comme le TrkB-FL, il présente l'intégralité des domaines extracellulaire et transmembranaire et peut donc se lier aux ligands BDNF et/ou NT4/5. Des travaux montrent que cette forme est potentiellement capable d'induire ou non une signalisation, son rôle reste un sujet controversé et mal connu (Luberg et al., 2010).

- La troisième forme couramment retrouvée correspond au récepteur TrkB-T-Shc. Cette forme est issue d'un transcrit épissé de l'exon 16 et contenant un codon stop dans l'exon 19. Ce récepteur présente un domaine intracellulaire avec la particularité de posséder un domaine de liaison Shc (protéines d'adaptation). Cette forme du récepteur est principalement retrouvée dans le système nerveux (Brodeur et al., 2009).

En dehors du système nerveux, les récepteurs TrkB sont exprimés majoritairement sous la forme tronquée TrkB-T1 (Luberg et al., 2010). Or, le rôle de ce récepteur demeure mal compris. Il pourrait jouer un rôle de dominant négatif en provoquant l'internalisation du récepteur TrkB entier (TrkB-FL) par endocytose (Biffo et al., 1995). En effet, après dimérisation des formes TrkB-FL et TrkB-T1 et fixation du BDNF, l'ensemble du complexe est endocyté empêchant la fonction signalisatrice du récepteur TrkB-FL. Une autre étude laisse penser que TrkB-T1 serait capable de former un hétérodimère avec le récepteur TrkB-FL entraînant ainsi son inactivation puisque le complexe formé devient inactif (transphosphorylation du récepteur impossible) (Eide et al., 1996). Enfin, TrkB-T1 serait capable de séquestrer et de transloquer le BDNF (Alderson et al., 2000), suggérant un rôle de leurre pour ce récepteur. Ces rôles hypothétiques pourraient conduire à l'inhibition de l'effet du TrkB-FL et ainsi à son rôle dans la prolifération et la survie cellulaire.

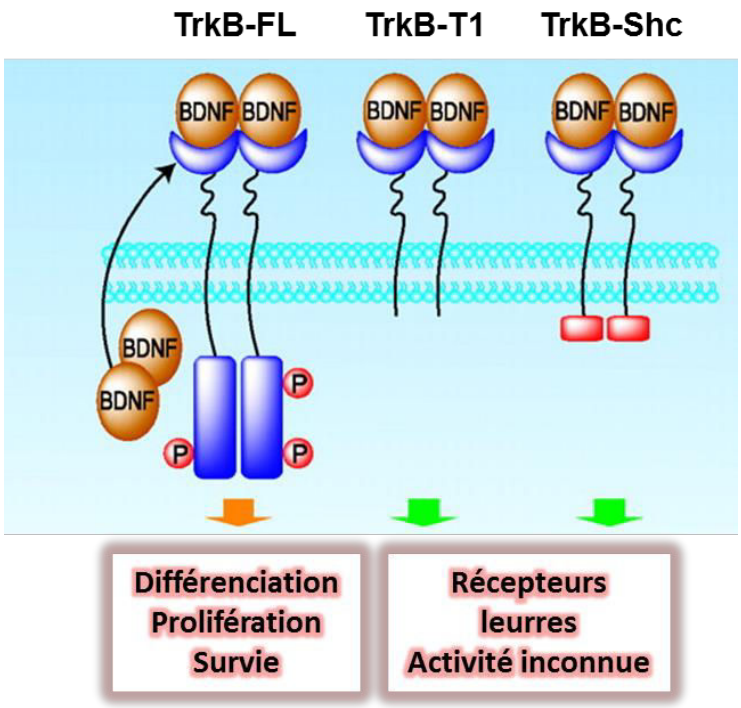


Figure 13: Les différentes isoformes du récepteur TrkB. Le récepteur TrkB est retrouvé sous trois formes majoritaires. La forme TrkB-FL ou « full lenght » est la forme intégrale du récepteur capable d'induire une signalisation en aval régulant la survie, la croissance et la prolifération cellulaire. L'isoforme TrkB-T1 est dépourvue de la partie signalisatrice intracytoplasmique. L'isoforme TrkB-Shc est dépourvue de la partie cytoplasmique à activité tyrosine kinase mais possède un domaine de liaison Shc pour protéines adaptatrices. Les isoformes TrkB-T1 et TrkB-Shc possèdent aujourd'hui un rôle mal connu mais sont assimilés à des récepteurs leurre. Schéma adapté d'après (Brodeur et al., 2009).

c) Le récepteur TrkC

Le dernier membre de la famille Trk, TrkC, est soumis comme Trk A et B au phénomène d'épissage alternatif. Par conséquent, il existe lui aussi sous différentes formes : entières et tronquées (figure 14). Comme dans les cas précédents la forme TrkC FL correspond à la version active du récepteur. Néanmoins, l'une des formes la plus retrouvée du TrkC est une isoforme tronquée nommé TrkC-T1 dépourvue du domaine intracytoplasmique portant l'activité tyrosine kinase. Par conséquent, seule la forme entière du récepteur est capable d'induire une signalisation. Les formes tronquées de TrkC ont un rôle mal connu et pourraient jouer un rôle de dominants négatifs ou récepteurs leurres (Brodeur et al., 2009).

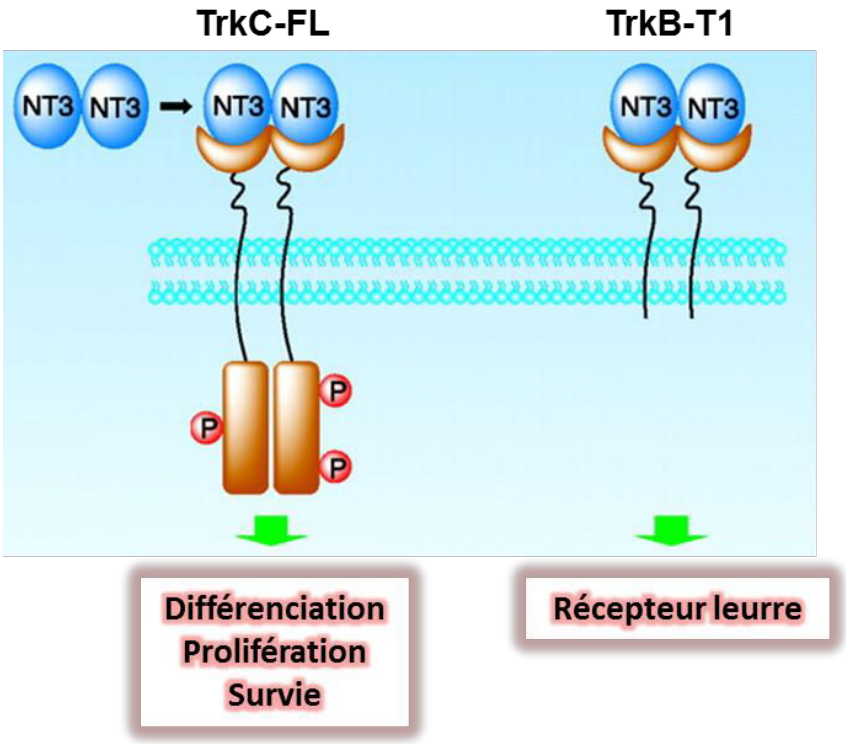


Figure 14 : Les différentes isoformes du récepteur TrkC. La forme TrkC-FL ou « full lenght » est la forme intégrale du récepteur capable d'induire une signalisation régulant la survie, la croissance et la prolifération cellulaire. L'isoforme TrkC-T1, dépourvu de la partie intracytoplasmique, est la plus retrouvée et est assimilée à un récepteur leurre. Schéma adapté d'après (Brodeur et al., 2009).

2°) Le récepteur p75^{NTR}

Le p75 Neurotrophin Receptor ou récepteur p75^{NTR}, découvert en 1973 (Herrup and Shooter, 1975) a été initialement identifié comme capable de lier le NGF, ce qui lui avait valu son nom initial, LNGFR (Low affinity Nerve Growth Factor). Depuis, il a été montré que ce récepteur est capable de fixer l'ensemble des NTs matures mais avec une affinité moins forte que celle des Trk (Rodriguez-Tébar et al., 1990). C'est pour cette raison que le p75^{NTR} est connu comme récepteur de « faible affinité ». Son poids moléculaire est de 75 kDa. Son domaine extracellulaire (N-terminal) contient des régions riches en cystéines qui, comme pour les Trk, permet la fixation des NTs et/ou des pro-NTs. Le domaine transmembranaire est composé d'une hélice α unique. Enfin le domaine intracytoplasmique présente un domaine de mort ou DD (« Death Domain ») phosphorylé sur des résidus sérines et thréonines, et comportant 6 hélices α (Roux and Barker, 2002). Il est capable de déclencher la cascade des caspases et ainsi la mort cellulaire par apoptose suite à la fixation d'une pro-

NTs puis par l'activité d'effecteurs comme RIP2 et RhoA. Entre le domaine DD et la partie transmembranaire du récepteur, se situe la région chopper qui est aussi capable de lier des protéines adaptatrices et particulièrement des protéines de la famille TRAF (TNF Receptor Associated Factor) (figure 15) favorisant l'apoptose.

De la même manière que pour les récepteurs de la famille Trk, le récepteur $p75^{NTR}$ présente différentes isoformes. Cependant, contrairement aux Trk et même si certains isoformes sont dues à un épissage alternatif, d'autres proviennent d'un mécanisme de protéolyse directe du récepteur. L'une des isoformes a subit un épissage de l'ARNm provocant la perte de la partie extracellulaire riche en cystéines (Dechant and Barde, 1997). Par conséquent, cet isoforme est incapable de fixer son ligand. Sa fonction reste actuellement inconnue. Concernant le mécanisme de protéolyse, il fait intervenir les MMP extracellulaires comme ADAM10 ou ADAM17.

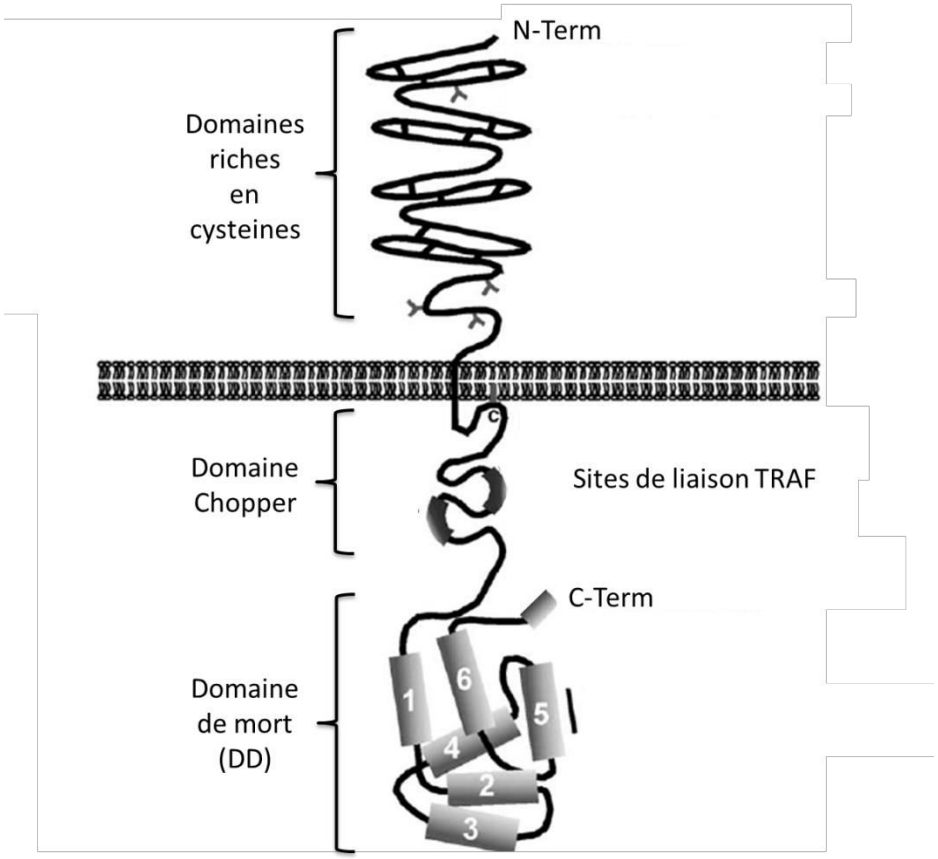


Figure 15 : Structure du récepteur $p75^{NTR}$. La partie extracellulaire présente 4 domaines riches en cystéines permettant la liaison du ligand au récepteur. La partie intracytoplasmique peut être subdivisée en deux segments. Le premier correspondant au « domaine chopper » capable de lier TRAF et le second au domaine de mort « Death Domain » permettant le déclenchement de la cascade des caspases.

IV- Voies de signalisation induites par les NTs

1) Les voies activées par les récepteurs de type Trk (formes entières)

Les récepteurs Trk entraînent l'activation de voies intracellulaires impliquées dans la survie cellulaire, la différenciation, la croissance et la plasticité synaptique dans le cas des cellules neuronales (Arévalo and Wu, 2006). Aujourd'hui, les Trk et leur signalisation sont retrouvés dans de très nombreux types cellulaires et d'une manière générale, leur rôle demeure inchangé.

Lors de la fixation du ligand (NT) sur le récepteur (Trk), l'activation de 3 voies majeures de survies est déclenchée (Stoilov et al., 2002) (figure 16):

- La voie PI3K/AKT (Phosphatidyl Inositol 3 kinase).
- La voie des MAPK (Mitogen Associated Protein Kinases).
- La voie de la PLCγ (Phospholipase C γ).

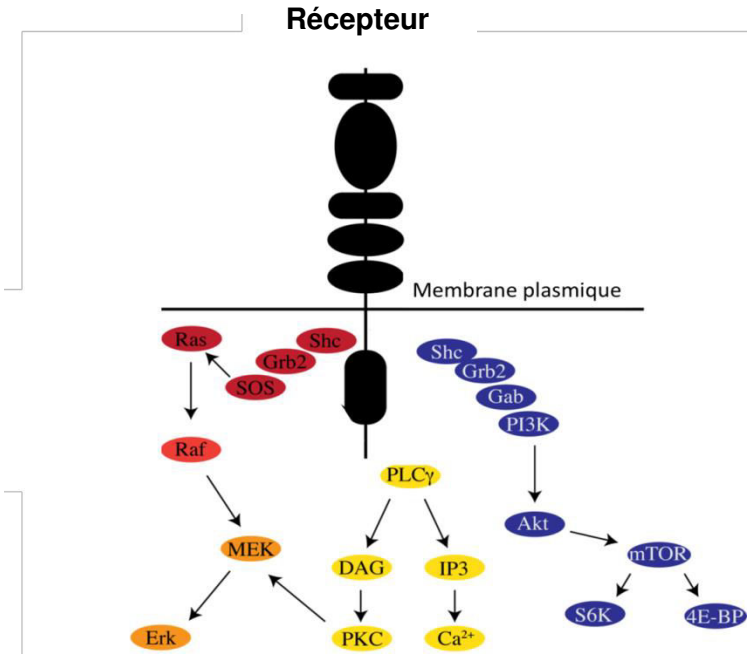


Figure 16 : Les différentes voies de signalisation activées par les récepteurs Trk. Une fois activés par la fixation de leur ligand respectif, les récepteurs Trk permettent l'activation de 3 voies principales de survie cellulaire : la voie des MAPK, de la PLC γ et PI3K/AKT. Cette signalisation est permise par la phosphorylation de résidus tyrosines présents sur le domaine intracellulaire du récepteur. Schéma adapté d'après (Deinhardt and Jeanneteau, 2012).

Pour permettre l'activation de ces différentes voies de survie, les NTs matures doivent se lier à leur récepteur spécifique, ce qui entraîne l'homodimérisation des Trk activés ainsi que leur transphosphorylation. Elle a lieu sur des résidus tyrosine en position 490 et 785 pour le TrkA et dans des localisations relativement semblables pour TrkB (positions 515 et 816) et TrkC (Arévalo and Wu, 2006; Blum and Konnerth, 2005).

L'activité pro survie en aval des Trk est particulièrement liée à la voie PI3K/AKT. Suite à son recrutement, la protéine PI3K phosphoryle PI2P en PI3P. Cette modification active la protéine AKT par phosphorylation de la thréonine 308 et de la sérine S473. Une fois activée, cette protéine joue le rôle d'une véritable plaque tournante de signalisation. En effet, AKT présente des cibles très variées telles que la protéine BAD, qu'elle inactive par phosphorylation sur 2 résidus sérines (S112 et S136). Cela provoque sa séquestration par la protéine 14-3-3 empêchant son interaction avec la protéine BCL-2 (anti-apoptotique). Par conséquent, la voie PI3K/AKT possède un rôle anti apoptotique. Elle présente aussi un rôle pro-survie direct, notamment par l'activation de facteurs de transcription comme NFκB (en phosphorylant son inhibiteur IκB) ou encore FoxO.

AKT est également responsable de l'activation d'une kinase capitale pour la survie cellulaire et la prolifération, la protéine mTOR. Elle peut avoir lieu directement par phosphorylation sur la sérine 2448 ou indirectement par phosphorylation et par conséquent inhibition du complexe TSC1/TSC2, lui-même inhibiteur de Rheb, activateur de mTOR (figure 17).

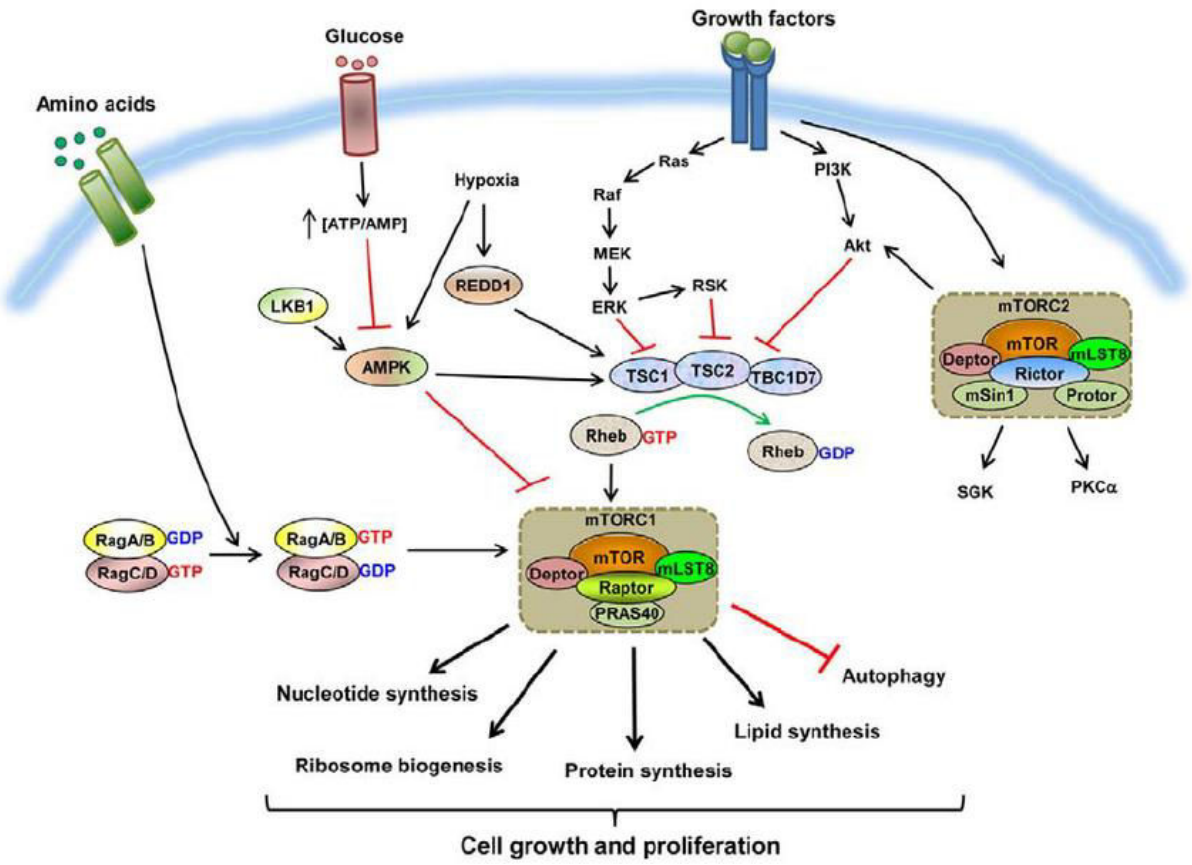


Figure 17 : Régulation de la signalisation de la protéine mTOR. mTOR est régulée par différents acteurs positifs (en rouge) ou négatifs (en bleu). mTOR peut être activée par l'inhibition de régulateurs négatifs comme le complexe TSC1/TSC2. L'activation de la voie PI3K/AKT est l'un des inducteurs de cet effet. Schéma adapté d'après (Kim et al., 2013).

Lorsque mTOR est engagée, elle entraine alors l'activation de ses cibles, la p70S6K et le facteur initiateur de la transcription, l'eIF4E (Eukaryotic translation Initiation Factor 4E) par inhibition du 4E-BP1 (4E-Binding Protein 1), ce qui favorise la traduction et la croissance cellulaire. (Hay and Sonenberg, 2004). Pour exercer ses effets, mTOR participe à la formation de 2 complexes distincts : mTOR1 et 2. Le complexe mTORC1 intervient dans la synthèse protéique via les phosphorylations de p70S6K et 4EBP1 (Bracho-Valdés et al., 2011). Il joue également le rôle de régulateur négatif de l'autophagie (fonction détaillée plus loin). Le complexe mTORC2 est quant à lui impliqué dans la migration cellulaire et la survie via l'activation de Rho GTPases et de phosphorylation de la protéine AKT (Bracho-Valdés et al., 2011).

La signalisation des NTs permet aussi de déclencher la voie des MAPK. Après fixation du ligand sur le récepteur, la petite protéine G Ras est activée. Elle peut alors à son tour stimuler Raf qui déclenche l'activation de MEK1 (Mitogen Activated Protein 1) et/ou MEK2 qui vont à leur tour phosphoryler Erk1 et Erk2 (English et al., 1999). La signalisation

des MAPK active aussi différents facteurs de transcription essentiels à la différenciation et la survie cellulaire. C'est par exemple le cas pour le facteur CREB (cAMP response element binding protein) (Lonze and Ginty, 2002) ou pour NFKB (Sakai et al., 2002) et AP-1 (Karin, 1995). Raf est aussi capable de phosphoryler les MEK (ou MAPKK) activant ainsi les protéines JNK (MAPK) et p38 (Huang and Reichardt, 2003). De plus, cette dernière est particulièrement incriminée dans la sensibilité des cellules de CCR à la chimiothérapie (de la Cruz-Morcillo et al., 2013).

Une autre signalisation déclenchée par les récepteurs aux NTs correspond à la voie de la PLCγ. Après activation du récepteur, elle est recrutée via les phospho-tyrosines de la région intracytoplasmique. La PLCγ hydrolyse alors le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate en IP3 (inositol 1,4,5 triphosphate) et en DAG (diacylglycérol) (Obermeier et al., 1993). En aval, les isoformes de la PKC vont être activées et le calcium intracellulaire mobilisé. Cette activation de la PLCγ va permettre par exemple une meilleure plasticité synaptique neuronale (Matsumoto et al., 2001).

2) Les voies activées par le récepteur $p75^{NTR}$

Le récepteur $p75^{NTR}$ a des rôles antagonistes selon le ligand qu'il fixe. En effet, lorsqu'il fixe des NTs matures, le récepteur $p75^{NTR}$ peut engager une signalisation de survie cellulaire, de différenciation ou de prolifération (comme la famille Trk) (figure 17). Cependant, il peut induire une mort par apoptose lorsqu'il lie les pro-NTs. En général, il est plus particulièrement connu pour son second rôle (Arévalo and Wu, 2006). Contrairement aux Trk, le récepteur $p75^{NTR}$ est incapable de transphosphorylation sur son domaine cytoplasmique. Pour déclencher une quelconque signalisation, il doit donc avoir recours à des protéines adaptatrices recrutées au niveau du domaine intra cellulaire.

Le récepteur $p75^{NTR}$ est capable de promouvoir la survie cellulaire et la croissance axonale, ce rôle semblant lié à l'activation du facteur de transcription NFκB (Arévalo and Wu, 2006; Nykjaer et al., 2005). Cependant, d'autres études ont montrées que $p75^{NTR}$ était capable d'activer la voie PI3K/AKT (Roux et al., 2001).

En parallèle, $p75^{NTR}$ possède un rôle pro-apoptotique. La fixation du ligand (pro-NTs) sur le récepteur induit l'activation de la voie JNK kinase (*c-Jun N-terminal Kinase)* et de p53 consécutivement au recrutement de la protéine adaptatrice Rac1. D'autres protéines adaptatrices comme SC-1, NRAGE, NRIF et NADE peuvent être retrouvées. Les protéines

de type TRAF sont également impliquées comme protéines adaptatrices et entraînent une forte augmentation de l'activation de la voie JNK favorisant ainsi l'apoptose (Arévalo and Wu, 2006).

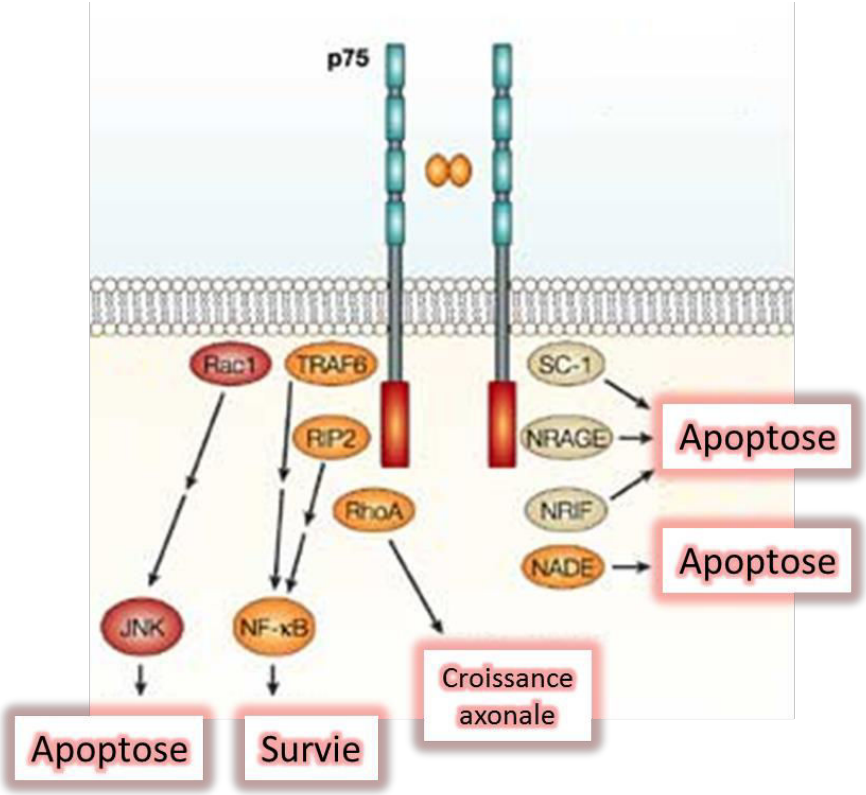


Figure 18 : Voies de signalisations induites par p75^{NTR}. Après fixation du ligand (NT mature ou pro NT) au récepteur p75^{NTR}, différentes voies de signalisation intracellulaire sont déclenchées. Selon les protéines adaptatrices recrutées, la signalisation peut promouvoir la survie ou la croissance axonale mais aussi l'apoptose cellulaire. Schéma adapté d'après (Chao, 2003).

P75^{NTR} a la possibilité de se dimériser avec un récepteur de la famille Trk. Ce complexe fixe les NTs matures avec une haute affinité et engage des voies de signalisation intracellulaire pro-survie. De manière tout à fait intéressante, il semble que ce soit le récepteur Trk qui induise la sélectivité du ligand. En effet, l'association TrkA / p75^{NTR} ne peut lier que le NGF. De même le complexe TrkB / p75^{NTR} ne peut lier que le BDNF et TrkC / p75^{NTR} ne peux fixer que la NT3 (Yano and Chao, 2000). En conséquence, en absence de Trk, p75^{NTR} devient médiateur de mort cellulaire ou d'apoptose, et en présence de récepteur Trk, médiateur de survie cellulaire.

Notons enfin que le récepteur p75^{NTR} est aussi capable de lier la sortiline (récepteur à la neurotensine). Cette association p75^{NTR} / sortiline entraîne l'induction de l'apoptose en présence de pro NTs.

V- Cas particulier de la sortiline

Le récepteur NTSR3, aussi appelé sortiline, est un des récepteurs à la neurotensine. La sortiline présente un poids moléculaire de 95kDA et appartient à une famille de transporteurs (Vps10p-D pour Vacuolar Protein Sorting Domain).

Comme pour la famille Trk et $p75^{NTR}$, le domaine transmembranaire est court et unique. La sortiline a été initialement retrouvée au niveau du système nerveux central et plus précisément de l'hippocampe et des cortex (Petersen et al., 1997). Mais comme dans le cas des NTs, elle a été ultérieurement identifiée dans de nombreux autres organes comme le pancréas, les muscles, l'intestin…(Petersen et al., 1997).

La sortiline présente un domaine extracellulaire riche en cystéines ainsi qu'une région peptide signal et un pro peptide. Le domaine intracytoplasmique est relativement court et composé d'une séquence hexapeptidique d'internalisation. Ce domaine interne ne possède pas d'activité catalytique (figure 18). Par conséquent, la sortiline seule ne peut pas induire l'activation de voies de signalisation, elle doit s'associer à un partenaire pour cela.

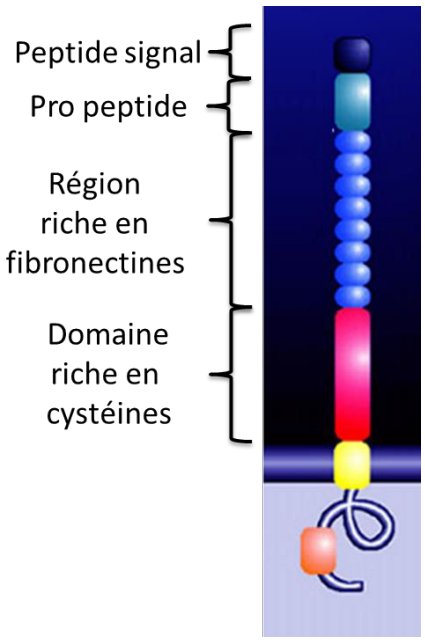


Figure 19 : Structure de la sortiline. Le domaine extracellulaire comporte 4 régions particulières. La première correspond à un peptide signal suivi d'un pro peptide pouvant être libéré par l'action de furines, puis une région riche en fibronectine et un domaine enrichi en cystéines. Le domaine transmembranaire est court et unique. Le domaine intracellulaire est composé d'une séquence

hexapeptidique d'internalisation dépourvue d'activité catalytique. Schéma adapté d'après Mazella, 2004.

La localisation de cette protéine est principalement intracellulaire, notamment aux alentours du Golgi et de son réseau (Petersen et al., 1997). Elle possède un pro peptide dans sa partie N-terminale. Lors du clivage de ce peptide par l'action de furine, la sortiline endosse alors le rôle de transporteur des NTs. Ce clivage va en parallèle permettre d'adresser la sortiline à la membrane cellulaire, permettant ainsi le transport des NTs matures ou des pro NTs.

L'expression de la sortiline à la membrane plasmique lui confère le rôle de corécepteur. En effet, elle est capable d'interagir avec le $p75^{NTR}$, enclenchant en aval, une signalisation de mort (Nykjaer et al., 2004). Cependant, certaines exceptions sont retrouvées comme par exemple dans le cas du mélanome où ce duo n'entraine pas la mort cellulaire mais une augmentation importante de la migration cellulaire (Truzzi et al., 2008) ainsi que la survie cellulaire (Vaegter et al., 2011).

VI- LES NEUROTROPHINES ET LE CANCER.

Initialement découvertes dans le système nerveux central, les NTs possèdent un rôle bénéfique pour la survie et la prolifération cellulaire. Cependant, depuis quelques années, il est démontré qu'elles sont fortement impliquées dans le processus cancéreux. Les liens entre la pathologie cancéreuse et l'expression des NTs et de leurs récepteurs semblent varier en fonction des molécules considérées. En effet, l'implication du couple TrkB/BDNF semble être généralement de mauvais pronostic, ce qui n'est pas forcément le cas pour les autres membres de la famille (Jia et al., 2015; Okamura et al., 2012). Nous apporterons ici des données en nous concentrant sur le BDNF et son récepteur TrkB, notre étude se focalisant sur l'étude de ce couple. En effet, dans les tumeurs de cellules neurales comme le neuroblastome, l'expression de TrkB favorise l'agressivité tumorale (Matsumoto et al., 1995) et est corrélée à un mauvais pronostic (Yu et al., 2010). Il a également été montré que l'interaction TrkB /BDNF est fortement incriminée dans l'apparition de métastases (Smit et al., 2009), la résistance aux traitements (Middlemas et al., 1999) ou l'angiogénèse (Nakamura et al., 2006). Dans le cas des gliomes, les acteurs BDNF et TrkB sont

surexprimés (Xiong et al., 2015) et impliqués dans l'augmentation de la prolifération cellulaire (Xiong et al., 2013). Ce couple pourrait également favoriser le maintien de cellules souches cancéreuses, initiatrices de gliomes (Lawn 2015).

Outre les tumeurs du SNC, les NTs et leurs récepteurs sont fortement étudiés dans d'autres cancers comme celui du pancréas (Miknyoczki et al., 1999), du sein (Descamps et al., 1998), de la prostate (Satoh et al., 2001)… De manière intéressante, ce couple induirait des réponses proches de celles retrouvées dans le SNC. En effet, TrkB permet la suppression de l'anoïkis ainsi que l'induction de métastases dans les cancers épithéliaux (Douma et al., 2004). Dans le cancer du poumon, l'expression de TrkB/BDNF est associée à un mauvais pronostic (Okamura et al., 2012). Ces données permettent donc d'envisager que le couple TrkB/BDNF peut être une cible thérapeutique (Odate et al., 2013). Dans les cancers pancréatiques, TrkB est associé à une diminution de $p75^{NTR}$ au cours de l'évolution de la maladie (Sclabas et al., 2005). Cette même équipe a aussi montré que la surexpression de ces protéines est associée à une augmentation de l'agressivité de la pathologie ainsi qu'à une prolifération cellulaire accentuée. Le rôle anti apoptotique des NTs est aussi retrouvé dans les lymphomes (Dubanet et al., 2015). Enfin, le BDNF possède un rôle majeur dans la survie des cellules lymphocytaires B (Fauchais et al., 2008).

Dans le cas du CCR, le couple TrkB /BDNF est une nouvelle fois incriminé dans l'apparition de métastases (Fan et al., 2014) et de résistance aux traitements (de Farias et al., 2012). La corrélation entre la surexpression de TrkB et un mauvais pronostic pour le patient a aussi été établie (Fan et al., 2014; Sasahira et al., 2013). De plus, notre laboratoire a montré que les cellules de CCR sont capables d'utiliser une voie de survie autocrine ou paracrine faisant intervenir le BDNF (Akil et al., 2011).

Par conséquent, les NTs représentent aujourd'hui un secteur majeur de recherche en cancérogénèse du fait de leur capacité à favoriser la survie et la résistance des cellules cancéreuses. Elles représentent donc une cible thérapeutique potentielle, notamment dans le cas du CCR (de Farias et al., 2012). Cependant, les NTs et leurs récepteurs à elles seules ne peuvent pas expliquer l'ensemble des mécanismes de résistance. Il existe en effet, de nombreuses autres voies de survie, parmi lesquelles l'autophagie tient un rôle majeur. Ce processus est d'autant plus intéressant à considérer que neurotrophines et autophagie ont la particularité de présenter un nœud de signalisation commun : la protéine kinase mTOR.

CHAPITRE 3 : L'AUTOPHAGIE

Le mot autophagie vient du grec « auto » (αυτο) et « phagie » (φαγειν) signifiant littéralement « se manger soi-même ». Il s'agit d'un mécanisme catabolique particulièrement bien conservé au cours de l'évolution des espèces initialement identifié chez la levure. Il est retrouvé dans de très nombreux organismes comme les plantes, les insectes, la souris ou l'homme (Levine and Yuan, 2005). L'intérêt pour ce mécanisme a été souligné très récemment par l'obtention du prix Nobel de médecine et physiologie 2016, décerné à Yoshinori Ohsumi pour ses travaux sur l'autophagie chez la levure.

Dans la cellule, deux voies majeures de dégradation sont retrouvées. La première correspond à celle du protéasome responsable de la dégradation des protéines à courte durée de vie. La seconde correspond à l'autophagie, qui permet la dégradation des protéines à durée de vie longue en les adressant au lysosome. Elle permet aussi la dégradation de molécules surnuméraires, de protéines mal repliées ainsi que d'organites altérés. Outre sa fonction à l'état basal, elle est déclenchée en cas de stress cellulaire, où elle favorise la production rapide d'acides aminés et d'acides gras permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire (Codogno and Meijer, 2005).

Actuellement, de nombreuses études mettent en évidence le rôle de l'autophagie en réponse à de nombreux stress cellulaires (infections, carences nutritives, hypoxie, thérapie…) où elle va favoriser la survie. Dans le cas des cellules cancéreuses, l'autophagie possède néanmoins un rôle ambigu. En effet, elle aurait un role de suppresseur de tumeur, notamment dans les premiers stades tumoraux, en dégradant les macromolécules altérées, alors que, dans des stades plus tardifs, elle favoriserait la survie des cellules tumorales en conditions de stress (nutritif, hypoxique et/ou thérapeutique). Cependant bien que ce ne soit pas son objectif initial, un excès d'autophagie, non contrôlée, pourrait entrainer la mort cellulaire.

I - Les différents types d'autophagie

L'autophagie se décline en 3 grands types : la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la macroautophagie (figure 20).

1) La microautophagie

Il s'agit d'un mécanisme non sélectif, totalement indépendant d'un éventuel stress cellulaire. Il correspond à l'invagination de la membrane du lysosome permettant la captation directe de molécules environnantes. La microautophagie correspond au bourgeonnement d'une vésicule à l'intérieur de la lumière vacuolaire, grâce à laquelle sont internalisées des portions cytoplasmiques contenant les substrats. Ce type d'autophagie nécessite le maintien du potentiel membranaire vacuolaire (Cuervo et al., 2004).

2) L'autophagie dépendante des chaperonnes

Ce type d'autophagie permet l'adressage au lysosome de protéines portant la séquence KFERQ (Lys, Phe, Glu, Arg, Gln ou lysine, phenylalanine, glutamine, arginine, glycine). Lorsqu'elles sont altérées celles-ci sont reconnues via ce motif par une protéine chaperonne de la famille des hsp70 (heat schock protein). Le complexe est ensuite dirigé vers le lysosome où il se fixe au récepteur de la membrane lysosomale : LAMP2 (Lysosome Associated Membran Protein) (Cuervo and Dice, 2000). La protéine LAMP2 est impliquée dans la translocation du substrat dans la lumière lysosomale (Majeski and Dice, 2004). Même si ce type d'autophagie n'est pas le plus décrit, son altération est une source de pathologies, comme par exemple dans la maladie de Parkinson, où l'accumulation de la protéine α-synucléine dans les corps de Lewy est provoquée par un défaut d'internalisation dans le lysosome (Cuervo and Wong, 2014; Cuervo et al., 2004; Xilouri et al., 2008, 2013).

3) La macroautophagie

La macroautophagie est le processus majeur de dégradation lysosomale et est communément référencée sous le terme d'autophagie. C'est une voie constitutive existant à un niveau basal dans tous les types cellulaires possédant un système lysosomal fonctionnel. Elle est donc directement dépendante du trafic vésiculaire. Néanmoins, les niveaux autophagiques basaux ne sont pas équivalents d'un type cellulaire à l'autre (Mizushima and Kuma, 2008).

La macroautophagie correspond à l'individualisation d'une vésicule, qui va séquestrer une partie du cytoplasme et des composants intra cellulaires pour les adresser au lysosome. A partir de l'élongation de membranes isolées appelées phagophores, une vésicule à double membrane nommée autophagosome est constituée (Juhasz and Neufeld, 2006). Par la suite, cet autophagosome va fusionner avec le lysosome pour former l'autophagolysosome permettant la dégradation du contenu par acidification du pH et action d'hydrolases contenues dans le lysosome. La dégradation ainsi réalisée permet l'obtention d'acides aminés ou d'acides gras utilisés comme précurseurs du métabolisme, après leur libération dans le cytoplasme.

Le processus autophagique est un phénomène se déroulant à l'état basal (hors stress) et de façon continue dans la cellule, responsable du flux autophagique (Nixon and Yang, 2011). Il peut être modifié en cas de problème de maturation des autophagosomes. En conséquence, ces derniers s'accumulent, ce qui peut aller jusqu'à entraîner la mort cellulaire, alors que l'autophagie est avant tout un mécanisme de survie cellulaire.

Dans certains cas, l'autophagie assure une dégradation sélective d'éléments du cytoplasme : la ribophagie pour les ribosomes (Kraft et al., 2008) ou la mitophagie pour la mitochondrie (Kim et al., 2007).

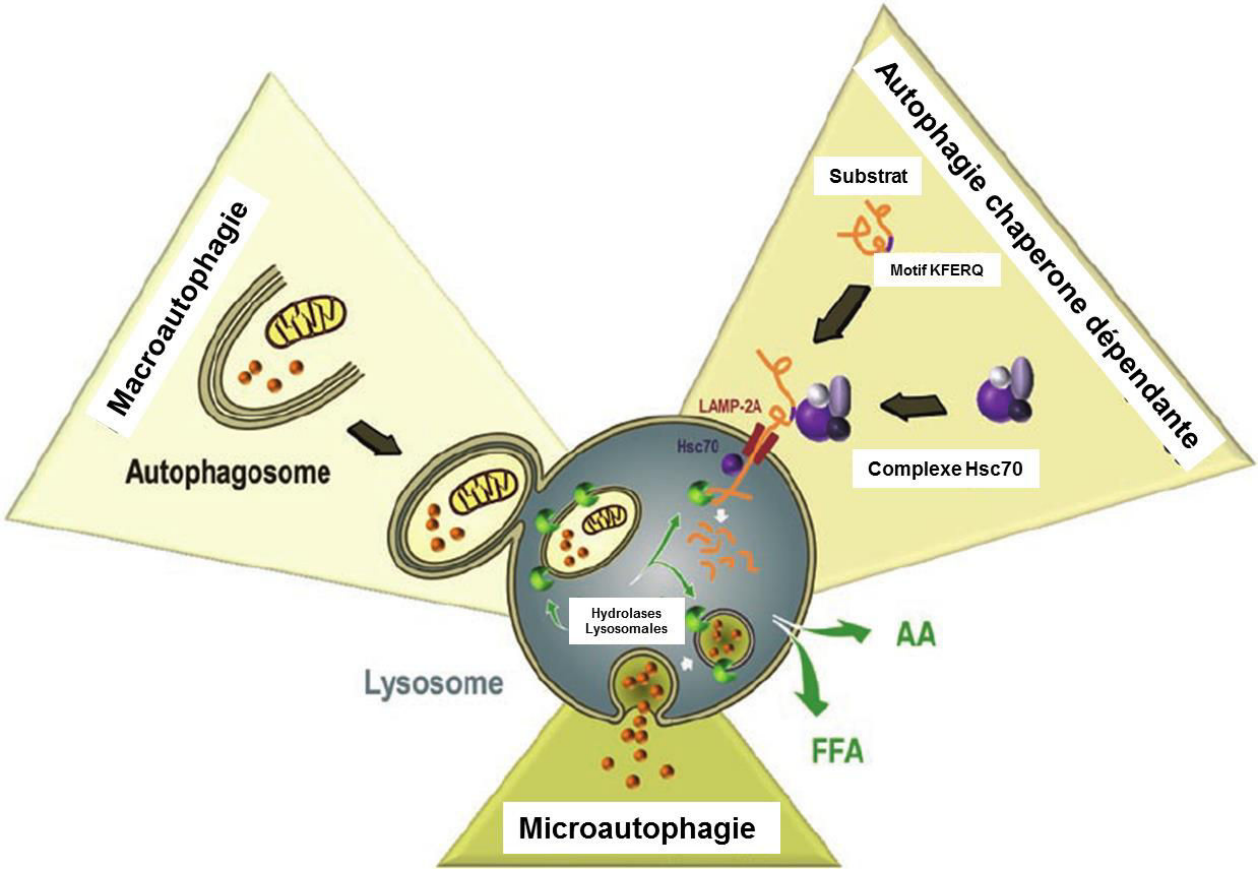


Figure 20 : Les trois grands types d'autophagie. Trois formes d'autophagie sont décrites: la microautophagie, la macroautophagie et l'autophagie dépendante des chaperonnes. La macroautophagie correspond au mécanisme classique assurant la dégradation de protéines à longue durée de vie. Le contenu séquestré dans l'autophagosome est adressé au lysosome où il est dégradé puis recyclé en précurseurs métaboliques. La microautophagie correspond à la pénétration directe des éléments à dégrader dans le lysosome. L'autophagie chaperonne-dépendante est initialisée après reconnaissance d'un motif KFERK sur la protéine à dégrader. Par la suite il y a fixation sur le récepteur LAMP2 retrouvé sur la membrane du lysosome. Schéma adapté d'après Wirawan et al ; 2012.

II - Déroulement de l'autophagie (figure 21)

Ce mécanisme est dépendant d'une famille de gènes nommés *ATG* (AuTophaGy-related genes) codant les protéines ATG (Klionsky et al., 2003). Ils ont été initialement caractérisés chez la levure en 2007 par l'équipe de Mizuchima et ensuite chez d'autres espèces plus évoluées. Les protéines découlant de la transcription des gènes sont classées

en 4 sous-groupes. Le premier groupe correspond au complexe ATG1/ULK1, le second au complexe ATG6/Beclin1 PI3K (classe III) et le troisième au complexe ATG9. Enfin, le dernier sous-groupe est représenté par les protéines ATG12 et ATG8 (LC3).

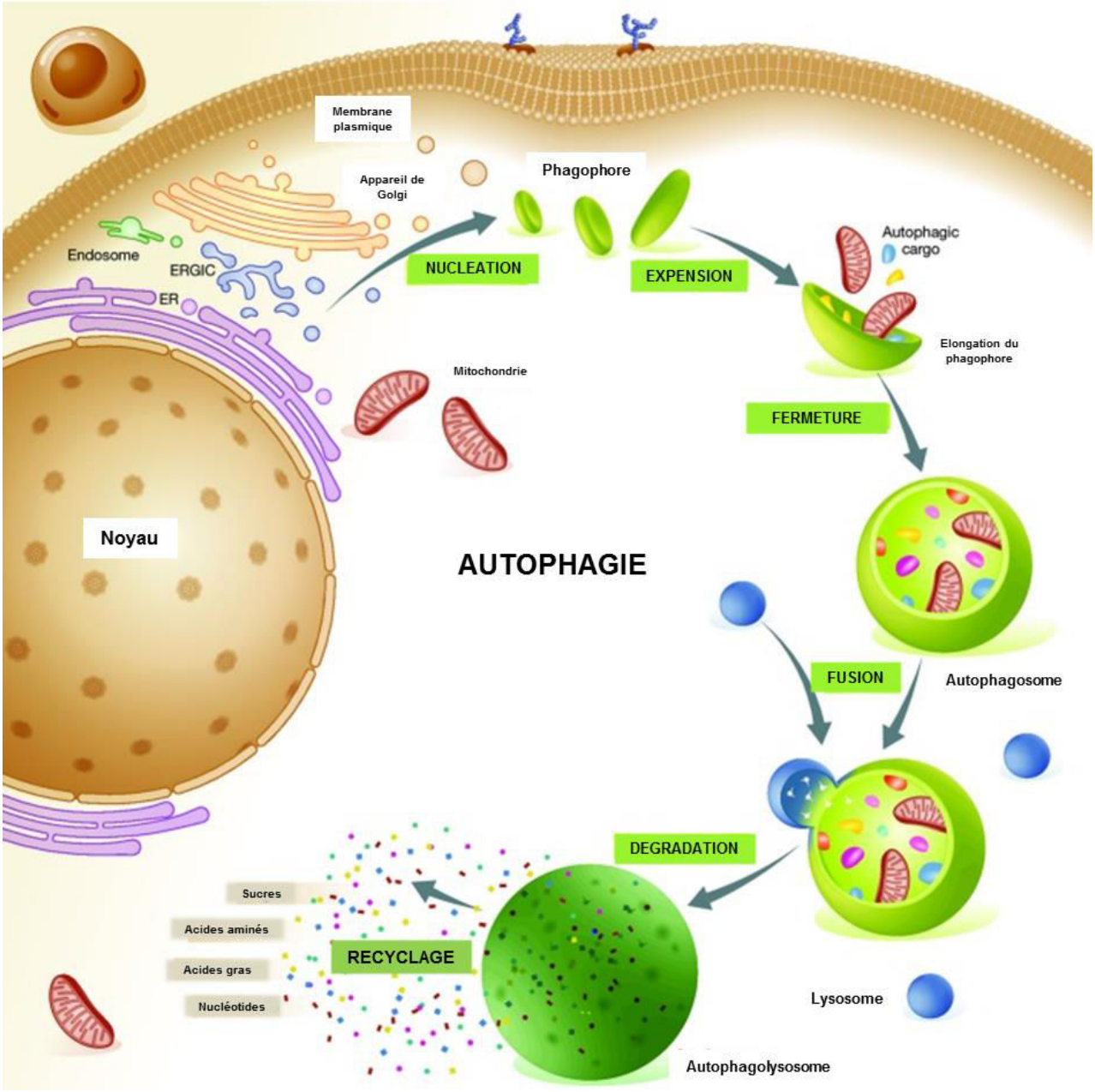


Figure 21 : Les principales étapes de l'autophagie. Le mécanisme autophagique se décompose en plusieurs temps. Le premier correspond à la nucléation (ou initiation du mécanisme). Ensuite l'autophagosome s'étend puis se referme avant de fusionner avec le lysosome. Enfin, le contenu de l'autophagolysosome est dégradé. L'autophagie est impliquée dans la dégradation de protéines ou organites altérés via la formation d'autophagolysosomes. Schéma adapté d'après (Galluzzi et al., 2015).

Le déclenchement de l'autophagie nécessite comme pré requis l'existence d'une membrane comme base de l'autophagosome : le phagophore. Cette membrane peut provenir du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, de la membrane plasmique ou de la mitochondrie (Dunn, 1990). D'autres données montrent que dans certaines conditions de privation (sérique ou d'oxygène), la formation d'une vésicule riche en phosphatidylinositol 3 phosphate (PI3P) à partir de la membrane du réticulum est observée (Axe et al., 2008) à proximité de compartiments riches en PI3K de classe III. Ainsi, l'Omégasome formé permettrait de regrouper un ensemble de protéines appartenant à la famille ATG pour former le phagophore.

1) Mécanisme d'initiation de l'autophagosome

Plusieurs complexes protéiques sont requis pour le déroulement des premières étapes de l'autophagie. Parmi ceux-ci, les principaux sont :

- <u>ATG1/ULK1:</u> Le mécanisme d'autophagie débute par la formation de l'autophagosome. Celle-ci est réalisée par le complexe ATG1 (chez la levure) ou ULK1/2 (chez les mammifères), formé par les protéines UKL1, ATG13, ATG17 (aussi appelée FIP200) et ATG101. Ce complexe d'initiation est colocalisé avec l'Omégasome (Karanasios et al., 2013) (figure 22). C'est la protéine Ulk1 qui joue le role déterminant. Il s'agit d'une protéine présentant 16 sites potentiels de phosphorylation, qui n'ont pas tous la même fonction. Ainsi la phosphorylation par mTOR est inhibitrice alors que celle réalisée par l'AMPK est activatrice. Quand Ulk1 est activée, elle va s'autophosphoryler et phosphoryler également ATG13 initiant le processus autophagique.

- <u>ATG6 (Beclin1) / (PI3K III):</u> La formation de l'autophagosome nécessite l'intervention de la PI3K de classe III (figure 22). En effet, elle est à l'origine de la production de PI3P, indispensable à la formation de l'autophagosome (Axe et al., 2008). Pour assurer cette fonction, la PI3KclIII doit être associée aux molécules Beclin1 (ou ATG6) et Vsp15. Ainsi, un complexe minimum pouvant lier d'autres protéines comme UVRAG, ATG14 ou Ambra 1 est obtenu. Ces dernières sont des cofacteurs nécessaires à l'activité du complexe Beclin 1.

La fonction de cette protéine est assimilable à un régulateur de l'activité du complexe. En effet, Beclin1 fait partie du sous-groupe des « BH3-only proteins » de la famille BCL-2 et est capable d'interagir avec un grand nombre de partenaires, activateurs ou inhibiteurs.

- Le complexe ATG9: La protéine ATG9 fait partie de la membrane de l'autophagosome (figure 22). Elle est transmembranaire et est impliquée dans le recrutement de molécules nécessaires à la formation des membranes de vacuolisation (Kim et al., 2002; Reggiori and Tooze, 2012; Shibutani and Yoshimori, 2014). Elle va permettre de fixer le PI3P fournit par le complexe Beclin1/PI3K.

2) Mécanisme d'élongation de l'autophagosome

Après son initiation, l'autophagosome subit une élongation grâce à deux systèmes distincts apparentés à la conjugaison « ubiquitine-like » :

- Le système ATG12-ATG5-ATG16: La conjugaison ATG12/ATG5 est obligatoire et même essentielle à l'élongation du phagophore (Mizushima et al, 2001) (figure 22). ATG7 active ATG12 en présence d'ATP (adénosine tri phosphate). ATG12 est ensuite relocalisée au niveau d'ATG10. Puis la glycine en position C terminale d'ATG12 se lie avec ATG5. Cet ensemble ATG12/ATG5 s'associe à ATG16 pour former le complexe ATG12-ATG5-ATG16 (Mizushima et al., 2003). Ce dernier est retrouvé sur la partie extérieure de l'autophagosome et va permettre le recrutement du second système de conjugaison impliquant la protéineLC3.

- Système de conjugaison LC3 / phosphatidyléthanolamine: Après sa synthèse sous forme de pro-LC3 (Kirisako et al., 2000), la protéine LC3 mature ou ATG8 est présente dans le cytoplasme sous sa forme LC3-I (figure 22). Lorsque le mécanisme d'autophagie est déclenché, la forme LC3-I est clivée au niveau de sa partie C terminale par la protéine ATG4. La LC3-I est ensuite activée par ATG7 puis transférée sur ATG3 qui va induire la conjugaison de LC3-I avec la PE (phosphatidyléthanolamine ; Kirisako et al., 2000). La forme

complexée à la PE constitue la LC3-II, indispensable à la formation de l'autophagosome. LC3 est retrouvée sur les deux faces de la membrane de l'autophagosome et représente donc un substrat du processus autophagique. ATG4 peut alors une nouvelle fois exercer son action de protéase en clivant le complexe LC3-II/PE pour restaurer la LC3-I cytoplasmique.

La protéine LC3 est l'un des marqueurs par excellence du mécanisme d'autophagie puisqu'elle est absente des autres membranes cellulaires et qu'elle reste liée à l'autophagosome pendant toute la durée du processus autophagique. La quantité de LC3-II est donc proportionnelle au nombre d'autophagosomes.

3) Fermeture de l'autophagosome

Après l'élongation de l'autophagosome et la séquestration du matériel à dégrader, ce dernier peut alors être refermé.

La fermeture de l'autophagosome est médiée par un processus de déconjugaison d'ATG8 par l'activité de la protéine ATG4 (Xie et al., 2008a). Par conséquent, ATG4 possède une activité de régulation du mécanisme d'expansion de l'autophagosome mais aussi un rôle dans la taille finale de l'autophagosome (Xie et al., 2008a, 2008b). La déconjugaison d'ATG8 par ATG4 est régulée par deux autres protéines: ATG18 et ATG21. Elles participent elles aussi à la régulation de la taille de l'autophagosome (Nair et al., 2010). Après fermeture de l'autophagosome, ATG8 est absent de la face extérieure de la membrane et n'est retrouvée que du côté luminal, où il constitue un substrat comme les autres de l'autophagie(Kabeya et al., 2000). La part cytoplasmique de LC3II est clivée de la PE par ATG4 puis recyclée dans le cytoplasme sous forme de LC3I.

4) Etape de maturation de l'autophagosome

Après fermeture de l'autophagosome, deux mécanismes de maturation ont alors lieu :

- Fusion avec le lysosome : Une fois formé, l'autophagosome est acheminé vers le lysosome par l'intervention des petites protéines G de la famille Rab. La vésicule autophagique fusionne ensuite avec le lysosome pour donner l'autophagolysosome (figure 22). Cette fusion peut être directe ou indirecte. La fusion directe correspond au

« couplage » des membranes de l'autophagosome et du lysosome (Dunn, 1990). Dans le cadre de la fusion indirecte, l'autophagosome fusionne avec les endosomes précoces, puis avec les endosomes tardifs par l'intermédiaire du système ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Puis la fusion entre l'autophagosome et le lysosome est permise par l'intervention des protéines SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factors attachment protein receptors) (Razi et al., 2009).

- Dégradation du contenu de l'autophagolysosome: Lorsque l'autophagosome et le lysosome fusionnent, une diminution du pH est observée permettant une dégradation du contenu de l'autophagolysosome par l'action d'hydrolases activées (Kroemer and Levine, 2008) (figure 22). L'ensemble des produits de dégradation est ensuite dirigé vers le cytoplasme grâce aux perméases présentes dans la membrane lysosomale (Saftig and Klumperman, 2009).

Remarque : Ubiquitination et autophagie : Pendant les premières années, l'autophagie a été considérée comme un mécanisme non sélectif de dégradation. Cette notion a évoluée depuis la caractérisation de la protéine p62, aussi appelée sequestosome 1 (SQSTM1) et des autres membres de cette famille (SLRs, (p62/SQSTM1)-Like Receptors) (Pankiv et al., 2007). La p62 présente 2 domaines remarquables, lui permettant de se lier, à l'ubiquitine, elle-même fixée à des agrégats protéiques ou des organites à dégrader, et à la protéine LC3 par la séquence LIR (LC3 interacting region). La protéine p62 assure donc la fonction de récepteur autophagique enclenchant l'agrégation et l'élimination sélective de protéines pouvant être délétères (Pankiv et al., 2007). Elle sera elle aussi dégradée par l'autophagolysosome.

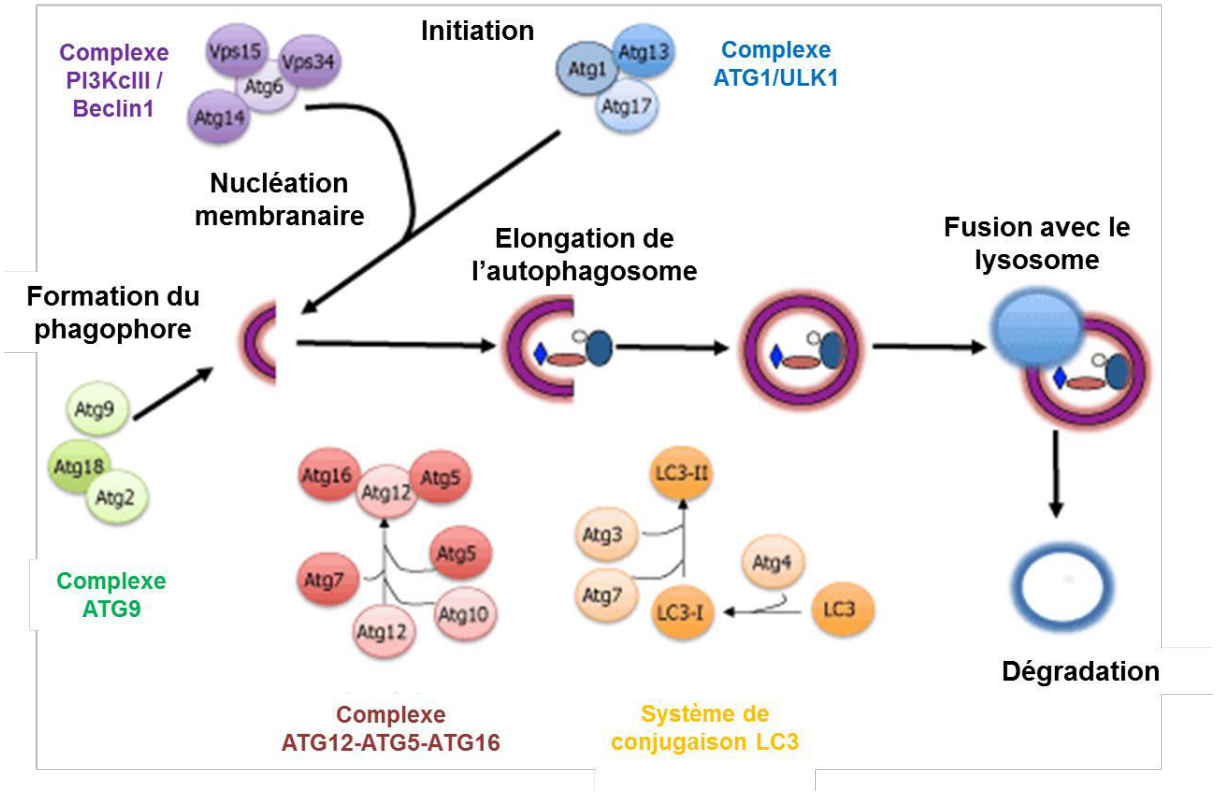


Figure 22 : Les processus de l'autophagie. L'autophagie correspond à un ensemble d'étapes : l'induction, la nucléation membranaire, la formation du phagophore, l'élongation de l'autophagosome et la fusion avec le lysosome pour permettre la dégradation du contenu de l'autophagolysosome. Ces différentes étapes sont contrôlées par des complexes moléculaires : les complexes ATG1/ULK1, PI3KcIII/Beclin1 et ATG9 de l'initiation à la formation du phagophore. Viennent ensuite les complexes ATG12-ATG5-ATG16 et LC3/phosphatidyl éthanolamine pour l'étape d'élongation de l'autophagosome. Schéma adapté d'après (Gelino and Hansen, 2012).

L'autophagie est un mécanisme finement régulé. Cette régulation peut être réalisée par différents acteurs comme mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (Yoshimori, 2004), mais aussi par la phosphatidyl Inositol 3 kinase (PI3K) (Kihara et al., 2001) ou l'AMP activated protein kinase (AMPK). Les mitogen activated protein kinase (MAPK), la protéine kinase C (PKC) ainsi que NF-κB peuvent quant à elles réguler l'expression de certaines protéines impliquées directement dans l'autophagie. Le plus souvent les voies de régulation de l'autophagie sont interconnectées. Elles ont généralement une relation directe avec le niveau énergétique cellulaire.

III- Régulateurs directs du mécanisme d'autophagie

1) Mammalian Target Of Rapamycin : mTOR

La protéine kinase mTOR est une sérine/thréonine kinase identifiée comme cible de la molécule chimique rapamycine (Sabers et al., 1995). Elle se situe classiquement en aval de la voie de signalisation des facteurs de croissance, passant par la PI3K/AKT. Lorsqu'elle est activée, elle augmente la traduction et la croissance cellulaire par l'intermédiaire de ses cibles, la protéine p70S6 kinase (p70S6K) et la protéine 4EBinding Protein 1 (4E-BP1) (Kim et al., 2002). Cette protéine se comporte comme indicateur du niveau d'énergie cellulaire mais surtout comme régulateur majeur du processus autophagique (Menéndez-Benito and Neefjes, 2007). Elle participe à deux complexes importants que sont mTORC1 et mTORC2 : mTORC1 est composé de mTOR, rapTOR, mLST8 et PRAS40 et mTORC2 est composé de mTOR, ricTOR, mLST8 et Sin1. L'activité du complexe mTOR1 est notamment régulée par la présence de facteurs de croissance et de nutriments dans le milieu. Cependant d'autres paramètres comme l'insuline ou le dioxygène peuvent aussi moduler son activité (Corradetti and Guan, 2006). En condition basale (absence de stress cellulaire), l'activité du complexe mTORC1 entraine l'inhibition de la formation d'autophagosomes, par la phosphorylation inhibitrice des protéines ULK1 et ATG13 (Hosokawa et al., 2009).

Dans la situation contraire, lors de stress cellulaires (carence en facteurs de croissance ou privation sérique), le complexe mTORC1 est inhibé. Il ne réalise plus laphosphorylation inhibitrice de ULK1, qui peut alors déclencher l'autophagie. Un « équilibre autophagique » est alors assuré (Sridharan et al., 2011) afin d'éviter une activation trop élevée de l'autophagie qui pourrait entraîner une perte cellulaire par excès.

Même si mTORC2 n'a pas un rôle majeur comme mTORC1 dans le contrôle de l'autophagie, il peut la réguler en modulant l'activité des protéines AKT et PKC (Sarbassov et al., 2006).

2) Adenosin MonoPhosphate activated Protein Kinase (AMPK)

L'AMP Kinase est une protéine sensible aux niveaux d'AMP et d'ATP, elle qui est activée en cas de stress énergétique et induit l'autophagie en réponse à un stress sérique (Meley et al., 2006; Zhao and Klionsky, 2011). Pour cela, elle régule négativement le complexe mTORC1 par activation du complexe TSC2 (inhibiteur de mTOR) et blocage de la protéine rapTOR, ce qui enclenche le mécanisme d'autophagie (Inoki et al., 2003). Ceci a

été observé en absence de stress nutritif mais en réponse à une augmentation du calcium cytoplasmique (Høyer-Hansen et al., 2007). Le déclenchement du mécanisme autophagique par l'activité de l'AMPK peut également être retrouvé dans d'autres conditions comme l'hypoxie (Degenhardt et al., 2006; Laderoute et al., 2006). L'AMPK est donc un régulateur de l'autophagie situé en amont de mTOR (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007; Meijer and Codogno, 2007).

Par ailleurs, l'AMPK induit aussi une phosphorylation activatrice de ULK1 (Lee et al., 2010) ce qui déclenche la formation d'autophagosomes (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011). De plus, il semble que ULK1 puisse elle aussi agir sur l'AMPK en induisant la phosphorylation de ses sous unités α, β et γ. Cette rétroaction de ULK1 entraine une modulation négative de l'activité de l'AMPK. Néanmoins, ce dernier point reste mal connu puisque la phosphorylation de l'AMPK peut être indépendante de son association avec ULK1(Löffler et al., 2011).

Le facteur de transcription FoxO3 constitue une autre cible de l'AMPK qui provoque son accumulation dans le noyau. Par conséquent l'expression des gènes cibles comme celui codant la LC3 est fortement stimulée (Chiacchiera and Simone, 2009).

3) Protéine p53

La protéine p53 est un facteur de transcription clé fortement impliqué dans la régulation de la mort et de la survie cellulaire mais aussi dans la régulation du métabolisme (Vousden and Prives, 2009). En cas de stress cellulaire comme la privation sérique, la protéine p53 peut être activée et s'accumule au niveau du noyau de la cellule entrainant ainsi la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la modulation de l'autophagie comme *Dram* ou *Tigar*. La protéine lysosomale Dram (Damaged Related Autophagy Modulator) entraine une accumulation des autophagosomes pour favoriser la formation d'autophagolysosomes (Crighton et al., 2006). Tigar quant à elle est impliquée dans la modulation de la glycolyse et régule indirectement le niveau d'espèces oxygénées réactives (ROS) (Bensaad et al., 2006), notamment en fonction de la quantité de nutriments. Il peut ainsi inhiber l'autophagie (Bensaad et al., 2009).

En plus de ce rôle transcriptionnel, il a été montré par l'équipe de G Kroemer (Tasdemir et al., 2008) que la protéine elle-même, dans sa localisation cytoplasmique pouvait interagir avec le complexe Ulk1, bloquant l''initiation du processus. Ces fonctions

sont néanmoins associées à l'expression d'une p53 sauvage. La régulation semble être plus complexe quand la protéine est mutée, comme notre équipe l'a montré dans un modèle de neuroblastome (Naves et al., 2013). Dans ce cas, l'accumulation de la protéine mutée dans le noyau, inactive pour la transcription des gènes, est associée à l'activation de l'autophagie.

IV- Régulateurs indirects du mécanisme d'autophagie

Outre ces régulateurs directs de l'autophagie, l'ensemble des voies de signalisation en aval des récepteurs aux facteurs de croissance peut intervenir dans la régulation du déroulement de l'autophagie.

1) La voie Phospholnositide 3 Kinase (PI3K) / AKT

Les phosphoinositide 3 kinases assurent la transformation du PI2P en PI3P. Trois classes de PI3K sont décrites :

- PI3K de classe I : Ce sont elles qui sont activées en aval des facteurs de croissance et catalysent la production de PI3P mais aussi de PI3,4P2 et de PI3,4,5P3. Ces seconds messagers activent des protéines majeures de signalisation comme par exemple AKT (Lawlor and Alessi, 2001). Par conséquent, la classe I des protéines PI3K entraîne une régulation négative de l'autophagie, notamment en activant mTOR (Furuta et al., 2004).

- PI3K de classe II : peu de données existent sur cette forme de PI3K.

- PI3K de classe III : Egalement connue sous le terme de vps34, elle qui interagit avec Beclin1 (figure 21) pour former le complexe de nucléation des autophagosomes (Kihara et al., 2001). La PI3K III permet aussi l'adressage de certaines protéines au niveau de la membrane de l'autophagosome comme pour ATG18 (impliquée dans la lipidation de la protéine LC3) (Polson et al., 2010).

Même si la molécule wortmannine peut inhiber l'ensemble des trois formes, la PI3Kclasse III est quant à elle inhibée plus spécifiquement par la 3-MA (3-méthyadénine). Cette molécule est de ce fait utilisée comme inhibiteur de l'autophagie (Seglen and Gordon, 1982).

2) La voie Mitogen Activated Protein Kinase (MAPKs)

Comme décrit dans le chapitre 2, les MAP Kinases sont des sérine/thréonine kinases, activées notamment par les facteurs de croissance. La signalisation déclenchée par les MAPK entraîne la phosphorylation de différents acteurs parmi lesquels certains facteurs de transcription. Cette voie est elle-même subdivisée en 3, en fonction des signaux activateurs, des cellules qui les expriment et de l'effet biologique (figure 23):

- Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK), active en cas de prolifération cellulaire.
- p38, active notamment en cas de stress cellulaire.
- JNK, active notamment en cas de stress cellulaire.

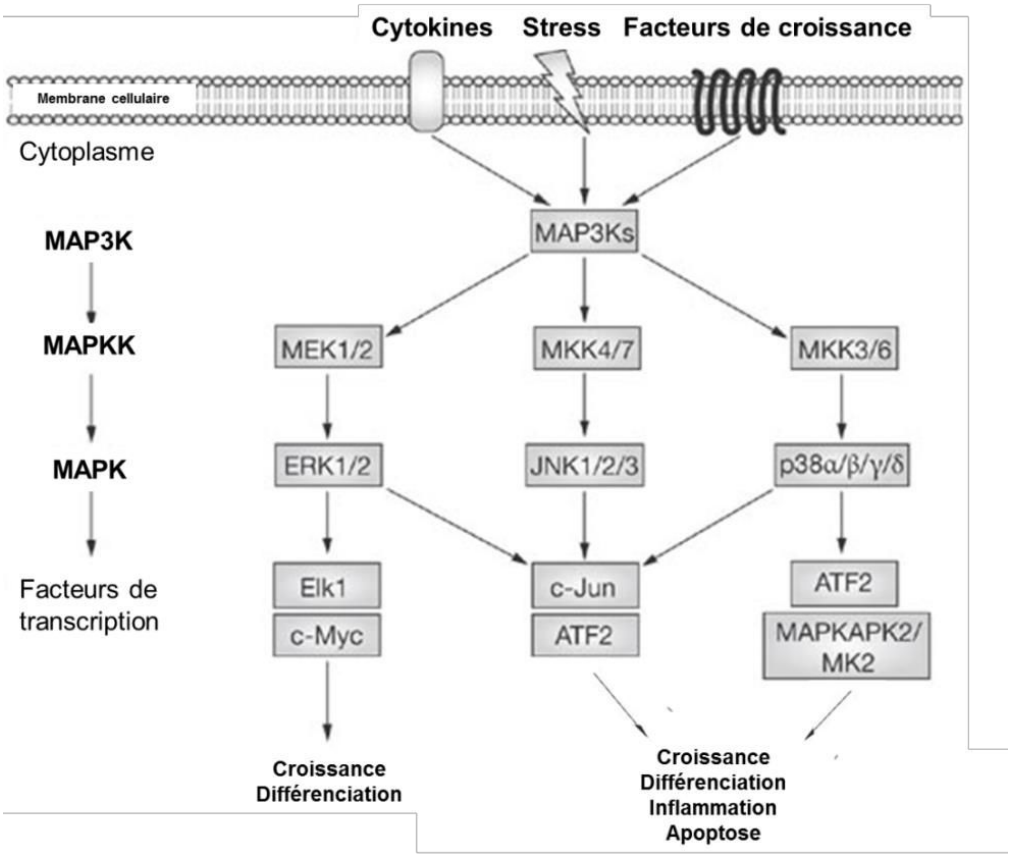


Figure 23 : Cascades de signalisation des MAPK. Après un stimulus extracellulaire, les MAPK peuvent induire différentes cascades de signalisation : ERK, JNK et p38. Ces différents acteurs sont capables de réguler l'expression de nombreux gènes par la phosphorylation de facteurs de transcription. Ces gènes sont impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire, l'inflammation ou l'apoptose. Schéma adapté d'après (Sweeney and Firestein, 2007).

Les protéines ERK1/2 sont activées par les MAPK extracellular signal regulated kinase (MEK) (McKay and Morrison, 2007) (figure 23). ERK1/2 sont impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Elles possèdent aussi un rôle dans le mécanisme d'autophagie puisque dans le cas du CCR, l'inhibition de ERK entraîne une inhibition de l'autophagie (Ogier-Denis et al., 2000).

La protéine p38 induit un arrêt du cycle cellulaire ou l'induction de l'apoptose (Wagner and Nebreda, 2009) mais elle est aussi capable d'inhiber le trafic de la protéine ATG9 entre l'appareil de Golgi et les autophagosomes empêchant ainsi leur formation (Webber and Tooze, 2010). Elle est aussi responsable d'une élévation de l'expression de certaines protéines ATG (notamment ATG5) ainsi que de Beclin1 (Lim et al., 2010). Dans le cas du CCR, une augmentation de l'expression de Beclin 1 provocant l'induction de l'autophagie est retrouvée. Cependant, elle n'est pas due à l'activation de p38 mais bien induite par son inhibition (Thyagarajan et al., 2010). Une autre étude a montré que la p38 modifie la sensibilité de cellules de CCR face au traitement par le 5 fluorouracile puisque l'inhibition de p38 entraine le blocage de l'apoptose en induisant l'autophagie. Les cellules de CCR deviennent alors résistantes au traitement (de la Cruz-Morcillo et al., 2013). Il apparaît donc la p38 peut influencer de multiples façons le déroulement de l'autophagie, soit en l'inhibant, soit en l'activant.

Enfin, les protéines JNK sont activées après un stress cellulaire induit par une modification osmotique ou des irradiations (Kayali et al., 2000). Les protéines JNK possèdent un rôle dans le déclenchement de l'autophagie lors de privation sérique (Li et al, 2006), notamment par l'activité de Beclin1 (Scarlatti et al., 2004). De plus, c-Jun (cible de la voie JNK) contrôle la transcription du gène *Becn1* (codant pour la protéine Beclin1) (Scarlatti et al., 2004; Wu et al., 2010) ainsi que l'induction de la mort autophagique en réponse à un stress (Scarlatti et al., 2004; Shimizu et al., 2010). De la même manière, les protéines JNK sont impliquées dans le stress du réticulum endoplasmique (Ogata et al., 2006). Dans le CCR, les JNK entraine la surexpression de Beclin1 et la mort autophagique (Park et al., 2009).

3) Protéine Kinase C (PKC)

Différentes isoformes de PKC impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires ont été identifiées. Elles sont activées par la phospholipase C et présentent une activité sérine et thréonine kinase. Leur rôle demeure actuellement mal connu quant à l'effet sur la

régulation de l'autophagie. En effet, certains travaux montrent un rôle inhibiteur (Jiang et al., 2010; Tan et al., 2012) alors que d'autres études démontrent un rôle d'activateur (Sakaki et al., 2008).

V- Fonctions de l'autophagie

Dans sa fonction de base, le mécanisme autophagique contribue au maintien de l'équilibre cellulaire en assurant le recyclage et le nettoyage du cytoplasme (Ravikumar et al., 2010). Comme dit précédemment, il peut être exacerbé en cas de stress pour assurer l'apport en nouveaux éléments métaboliques. Néanmoins, un excès d'autophagie entraine la mort cellulaire. L'autophagie est impliquée dans de nombreux processus physiologiques mais également dans des pathologies qu'elles soient dégénératives ou tumorales (figure 24).

1) La survie cellulaire médiée par l'autophagie

L'autophagie présente avant tout un rôle important dans la survie cellulaire (figure 24). En effet, l'accumulation d'organites surnuméraires ou altérés, par défaut d'autophagie, conduit les cellules à la mort. Son activation est par conséquent un mécanisme essentiel à la survie de la cellule. En assurant le recyclage rapide de composants cellulaires, elle favorise la résistance des cellules face à divers stress comme la privation sérique, la perte de signalisation due à la diminution de facteurs de croissance ou l'hypoxie. L'autophagie permet alors de produire les composants métaboliques et l'ATP fondamentaux au fonctionnement cellulaire (Mizushima, 2005). De plus, dans certaines conditions (surplus de matériel à dégrader, excès de protéines altérées et/ou mal repliées), le protéasome (autre système de dégradation cellulaire) ne peut pas jouer son rôle suite au volume trop important de composants à dégrader (agrégats protéiques). C'est alors la protéine p62 qui va reconnaître les agrégats précédemment ubiquitinylés et les adresser aux autophagosomes, par sa séquence assurant une double liaison à l'ubiquitine et à la LC3.

2) La mort autophagique : un nouveau concept ?

La mort autophagique demeure aujourd'hui encore controversée. En effet, elle est induite par l'accumulation excessive de vacuoles autophagiques, provenant d'un mécanisme suractivé, sans qu'il n'y ait condensation de la chromatine (González-Polo et al., 2005;

Kroemer and Levine, 2008). Ce type de mort est différent de l'apoptose puisqu'elle ne fait pas intervenir les caspases (Yonekawa and Thorburn, 2013; Yu et al., 2004) mais les deux processus partagent des régulateurs communs. En effet, les protéines de la famille BcL-2 sont capables d'interagir avec Beclin1 (Maiuri et al., 2007, 2010) et ainsi d'inhiber l'autophagie.

La mort autophagique est impliquée dans plusieurs pathologies dégénératives comme par exemple les maladies de Parkinson, Huntington ou Alzheimer (Ravikumar et al., 2010), mais aussi dans les cancers (Shimizu et al., 2014). Dans certains cas, des traitements anticancéreux peuvent induire une mort par autophagie (Levine and Yuan, 2005; Notte et al., 2011). Sa survenue a été identifiée dans plusieurs types de cancer (Lin and Baehrecke, 2015; Shimizu et al., 2014). De plus, des travaux ont identifié ce type de mort cellulaire comme un mécanisme potentiellement suppresseur de tumeur (Ávalos et al., 2014; Gozuacik and Kimchi, 2004). Ces résultats démontrent donc l'importance de l'autophagie dans le domaine de la cancérogénèse.

3) Le double rôle de l'autophagie en cancérogenèse

Le mécanisme autophagique est très souvent incriminé dans les pathologies cancéreuses (Brech et al., 2009; Degenhardt et al., 2006; Guo et al., 2013; Han et al., 2015; Sui et al., 2013; Thorburn et al., 2014; Yang et al., 2011b). Certains gènes sont absents des cellules tumorales. Parmi eux, on peut citer *BECN1* (codant de la protéine Beclin1) identifiés comme suppresseur de tumeur (Aita et al., 1999; Morselli et al., 2009) ou encore la protéine Atg7 (Miyakis et al, 2003). Comme l'autophagie intervient dans la dégradation de l'ADN (Mathew et al., 2009), l'inhibition du mécanisme peut induire une augmentation de ses altérations et par conséquent favoriser l'apparition de cancers (Tsuchihara et al., 2009). Ces résultats sont consolidés par l'hypothèse que des gènes suppresseurs de tumeurs comme *PTEN* sont capables d'activer l'autophagie (Maiuri et al., 2009).

Cependant, ce processus de recyclage possède un double rôle (Burada et al., 2015; Thorburn, 2014). Le principe même de l'autophagie est ici mis en cause puisque sa propriété de recyclage du contenu cellulaire en fait un excellent moyen d'adaptation aux conditions hostiles retrouvées au sein d'une tumeur (privation sérique suite à un défaut de vascularisation, hypoxie, etc …) (figure24).

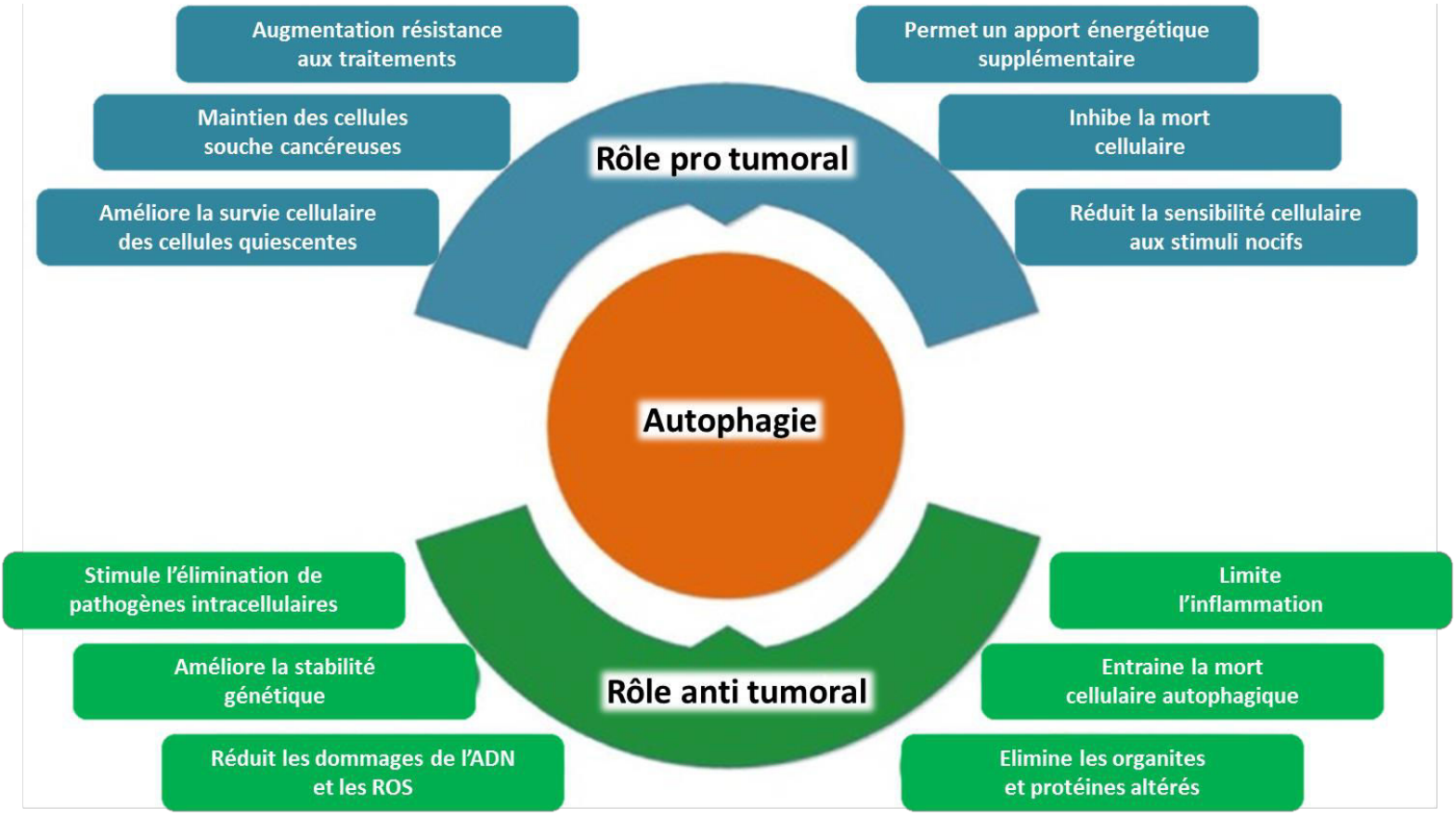


Figure 24 : Le double rôle de l'autophagie en cancérogénèse. L'autophagie peut jouer un rôle pro tumoral ou anti tumoral. Elle permet la formation de tumeur en apportant une source énergétique supplémentaire et une résistance aux traitements. Son activation inhibe la mort cellulaire permettant le maintien des cellules cancéreuses et notamment des cellules souches cancéreuses. L'autophagie protège les cellules saines de différentes mutations en éliminant les organites ou protéines altérés et en diminuant les modifications de l'ADN. Elle permet ainsi une stabilité du génome et participe à l'élimination des pathogènes intracellulaires. Schéma adapté d'après (Burada et al., 2015).

Concernant les thérapies utilisées chez les patients, il est aussi possible d'observer un double rôle de l'autophagie. En effet, ce mécanisme améliore ou non le traitement : elle favorise la résistance des cellules tumorales face aux traitements de chimiothérapie, s'opposant ainsi à leur efficacité (Sui et al., 2014). C'est par exemple le cas pour les cancers gastointestinaux après utilisation du 5-fluorouracile (Li et al., 2010; Tang et al., 2016). A l'opposé, le mécanisme autophagique entraîne la mort cellulaire suite à différents traitements (Yang et al., 2011b). De plus, la forte expression de protéines autophagiques comme Beclin1 ou LC3 a été décrite comme associée à une diminution de l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques néoadjuvants (Shim et al., 2016).

4) L'autophagie et le CCR

L'autophagie possède de nombreux rôles physiologiques et pathologiques (figure 25). Dans le cas plus précis du CCR, l'autophagie a été caractérisée et induit la survie cellulaire en condition de stress nutritif (Sato et al., 2007) ou l'hypoxique (Lai et al., 2016). De plus, l'inhibition de ce mécanisme limite la tumorigénèse (Lévy et al., 2015). Il a également été montré que les cellules cancéreuses expriment le gène *Becn1* en quantité supérieure à celle des cellules saines de côlon (Groulx et al., 2012), favorisant le déroulement de ce processus. Le rôle néfaste de l'autophagie dans cette pathologie est lié à l'augmentation de l'agressivité et de la capacité à s'adapter aux stimuli apoptotiques (Zheng et al., 2012). C'est ainsi que l'utilisation de 5-fluorouracile ou d'oxaliplatine sur des cellules de CCR soumises à un stress hypoxique favorise leur survie par autophagie (Yang et al., 2015a).

Pour contrecarrer ces effets bénéfiques de l'autophagie, des expériences d'inhibition ont été conduites. De nouveaux travaux ont démontrés que l'inhibition de la protéine Atg7 dans les cellules épithéliales intestinales, chez un modèle murin muté pour le gène *APC,* diminuait la tumorigénèse intestinale et la croissance des adénomes (Lévy et al., 2015). Cette même équipe a aussi montré que l'inhibition d'Atg7 favorisait la réponse immune anti-tumorale. Une seconde étude récente montre que l'inhibition de l'autophagie induit l'apoptose via l'activation de la protéine p53 et l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique (Sakitani et al., 2015). De plus, l'inhibition de l'autophagie sensibilise les cellules de CCR aux traitements anti-angiogéniques (Selvakumaran et al., 2013). D'autres études démontrent que le traitement de cellules de CCR à la sélénite (Yang et al., 2015b) ou par le stéroïde spicatoside A (Kim et al., 2016) active simultanément autophagie et apoptose conduisant ainsi à la mort cellulaire.

Depuis le milieu des années 1900, la chimiothérapie est le traitement majoritairement utilisé pour le cancer. Mais les 20 dernières années ont vu de nombreuses autres découvertes permettant d'ouvrir de nouvelles perspectives. L'ensemble des données de la littérature s'accorde sur le fait que l'autophagie possède un rôle majeur dans le cancer et que ce mécanisme doit être ciblé pour améliorer ou découvrir de nouveaux traitements (Chen and Karantza, 2011; Duffy et al., 2015; Yang et al., 2011b). Utiliser l'autophagie comme cible pourrait aussi aider à découvrir indirectement de nouveaux traitements et notamment de nouvelles molécules anti-cancéreuses (Liu et al., 2013). En 2014, une étude a montré que l'autophagie doit être utilisée pour cibler les cellules cancéreuses, en utilisant la létalité synthétique comme thérapie anti cancéreuse (Reyjal et al., 2014). Cette approche est

renforcée par la mise en place d'études cliniques de ces inhibiteurs dans le but d'améliorer les thérapies déjà existantes chez les patients (Rebecca and Amaravadi, 2016).

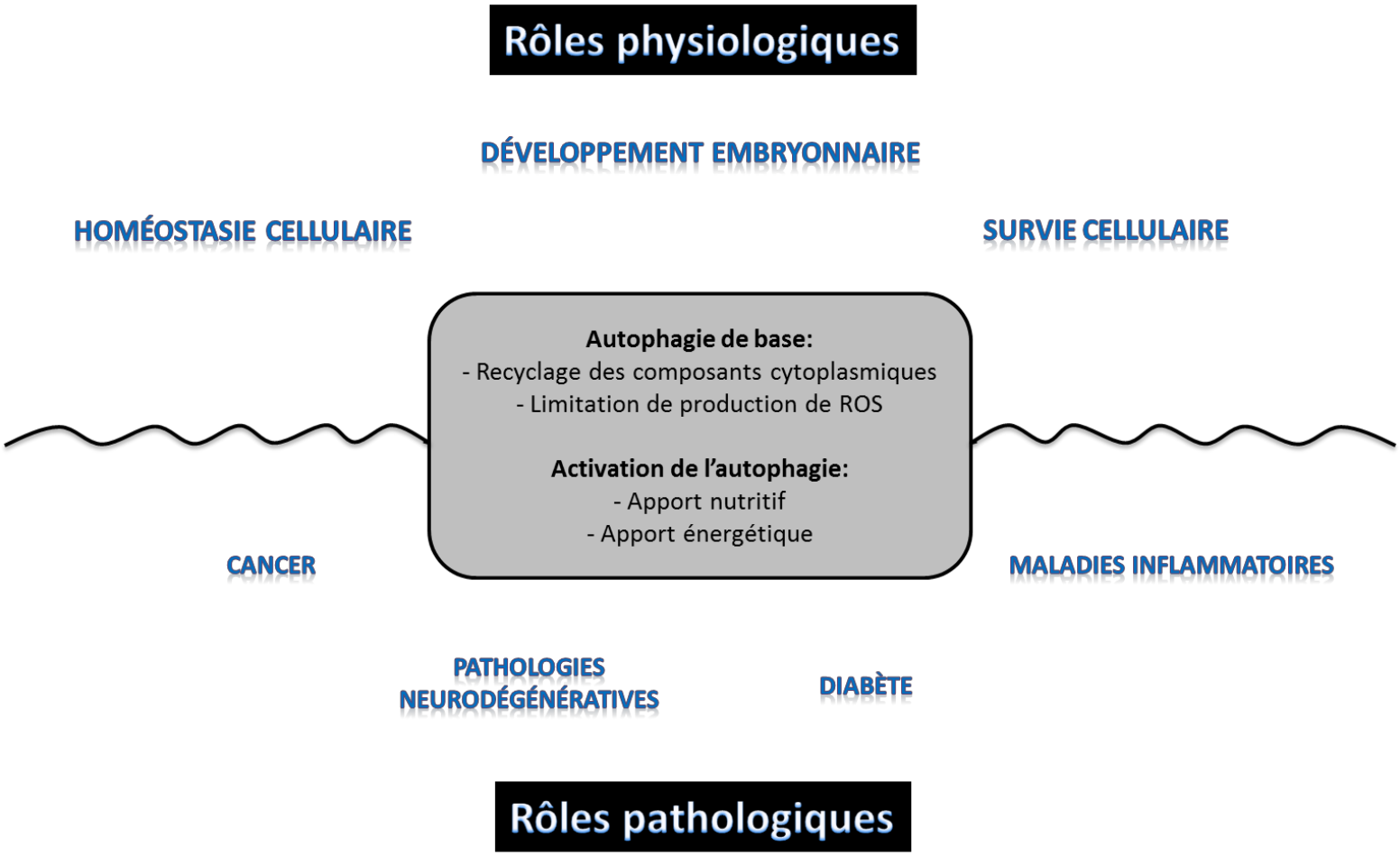


Figure 25 : Rôles et implications de l'autophagie. L'autophagie de base permet le maintien de l'homéostasie cellulaire en assurant le nettoyage du cytoplasme (organites altérés, protéines agrégées…) et aussi la limitation du nombre d'espèces réactives oxygénées (ROS). Elle intervient également dans le développement embryonnaire. La présence d'un stress cellulaire entraîne l'induction de l'autophagie conduisant à la production rapide de nutriments et d'énergie. Cela permet à la cellule de s'adapter aux nouvelles conditions environnementales comme dans le cadre des cancers, des pathologies neurodégénératives, le diabète ou les maladies inflammatoires.

OBJECTIFS DE LA THESE

Malgré les progrès réalisés dans la prise en charge thérapeutique des cancers colorectaux, tous stades confondus, la survie à 5 ans est d'environ 15%. Le contrôle de la maladie, pour les stades les plus avancés reste basé sur la chirurgie d'exérèse et l'utilisation de chimiothérapies systémiques associées si besoin à des anti-angiogéniques. Les rechutes et les résistances aux thérapies proposées, incitent à analyser les mécanismes entrant en jeu dans ces résistances afin de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ce travail se base sur l'existence de boucles autocrines et paracrines de survie en condition de privation nutritive et utilisant la signalisation TrkB/BDNF dans les cellules de CCR (Akil et al., 2011). La voie des neurotrophines (NTs) étant un acteur de la résistance cellulaire, la première partie de ce travail a consisté à étudier l'effet de l'inhibition de cette voie par l'utilisation d'un inhibiteur des récepteurs Trk : le K252a.

De plus, le comportement cellulaire peut être différent en fonction du stade tumoral. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser deux lignées cellulaires (SW480 et SW620) issues d'un même patient traité pour un CCR stade 3: SW480 correspond à la tumeur primaire et SW620 correspond à l'envahissement ganglionnaire.

La signalisation des NTs peut conduire à l'activation de mTOR, régulateur négatif du processus autophagique montrant une éventuelle connexion entre NTs et autophagie même si actuellement, la littérature n'apporte pas une grande quantité de données sur ce sujet. En effet, en 2004, Florez McClure et son équipe ont mis en évidence un phénomène de mort autophagique associé à l'activation du récepteur $p75^{NTR}$ (Florez-McClure et al., 2004). En 2007, Hansen et son équipe ont mis en évidence que le récepteur TrkA pouvait induire la mort autophagique dans des cellules de glioblastome. Les NTs elle-même peuvent être reliées à l'autophagie puisque le BDNF pourrait induire l'autophagie (Chen, 2013). Le BDNF pourrait aussi moduler l'autophagie via mTOR (Smith et al., 2014).

In vitro, l'inhibition des NTs par le K252a a montré une augmentation de l'expression du TrkB et du BDNF au sein de la cellule laissant supposer un rétrocontrôle cellulaire visant à réactiver la voie précédemment inhibée. Mais cette inhibition induit aussi une levée d'inhibition de la protéine kinase mTOR et donc une activation du mécanisme d'autophagie. .

La seconde partie de cette étude s'est donc logiquement consacrée à étudier l'effet de l'inhibition du processus autophagique (par l'utilisation de la chloroquine ou de siRNA

dirigés contre la protéine ATG5). Ce blocage induit une activation de la voie dess NTs (TrkB/BDNF) démontrant l'existence d'une relation entre les deux voies de survie.

La viabilité cellulaire n'étant que faiblement altérée par les traitements individuels, nous avons donc poursuivi notre travail par l'inhibition simultanée des deux voies de signalisation. Bien qu'une nouvelle fois, la viabilité cellulaire est faiblement affectée, l'activité métabolique est quant à elle fortement diminuée. Les résultats obtenus *in vivo* avec des greffes sous cutanées sur souris Nude confirment l'efficacité du ciblage simultané des deux voies de survie, les NTs et l'autophagie.

Finalement, une étude *ex vivo* qui a consisté à analyser la présence et l'activation des deux voies de survie dans des tissus de patients démontre que les NTs et l'autophagie sont effectivement présentes mais surtout actives dans les tissus de patients atteints de CCR. L'ensemble de ces travaux fait actuellement l'objet d'un article soumis (Mazouffre et al, soumis).

Enfin, pour confirmer l'implication des NTs et de l'autophagie dans le développement du CCR, il serait important de disposer d'un modèle murin dans lequel le cancer serait localisé dans le côlon. Pour cela, la dernière partie de cette étude a consisté à mettre en place un modèle de CCR chimiquement induit à l'aide de souris Balb-C. Nos premiers résultats sont encourageants, et doivent être approfondis.

MATERIELS ET METHODES

I- MATERIELS

1) Lignées cellulaires

Les deux lignées cellulaires utilisées proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) : les SW480 (ref : CCL-228) et les SW620 (ref : CCL-227). La lignée SW480 est issue d'une tumeur primaire (stade II de CCR) alors que la lignée SW620 provient d'un envahissement ganglionnaire local (stade III de CCR). Ces deux lignées présentent la particularité d'avoir été isolées à partir d'un même patient (prélèvement tumoral à 1 an d'intervalle). Elles expriment une protéine p53 mutée (mutation sur le codon 273 du gène *TP53*), correspondant à un remplacement de base (guanine par adénine) responsable d'une modification d'acide aminé: une arginine est remplacée par une histidine (Ahmed et al., 2013). Ces deux lignées présentent les mêmes mutations des gènes *Kras* (guanine modifée en valine) et c-myc. Le gène *Braf* est retrouvé sous forme sauvage. Les protéines PI3K et PTEN sont retrouvées sous formes sauvages.

2) Molécules utilisées pour les traitements

Dans le cadre de ces travaux, nous avons été amenés à utiliser différentes molécules pharmacologiques modulant la signalisation des neurotrophines ou de l'autophagie. Il s'agit :

- Du K252a (SF 2370 ; Alomone labs), spécifique des récepteurs à activité tyrosine kinase et qui empêche l'autophosphorylation des récepteurs Trk et constitue donc un inhibiteur de la voie d'activation des NTs (Tapley et al., 1992a).
- De la Chloroquine (CQ) (C6628 ; Sigma Aldrich), qui est un inhibiteur des pompes à protons ATPases dépendantes. Son utilisation empêche l'acidification des lysosomes, nécessaire à l'activité des enzymes lysosomales et inhibe la phase finale de l'autophagie.
- De la Rapamycine (R 8781 ; Sigma), qui est un inducteur de l'autophagie par inhibition de la protéine mTOR. Elle a été utilisée comme témoin positif.

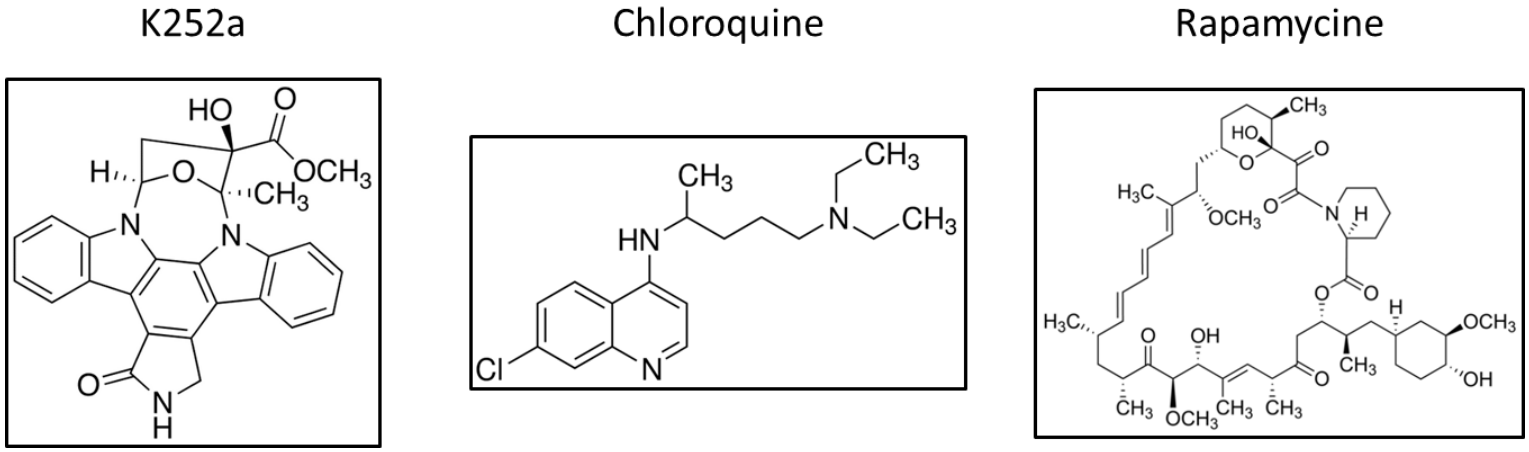


Figure 26 : Formules chimiques des différents composés utilisés : K252a, chloroquine et rapamycine.

3) Tissus de patients atteints de CCR

Les échantillons de tissus proviennent de patients atteints de CCR ayant subi une résection chirurgicale au sein du service de chirurgie digestive endocrinienne et générale du Centre Hospitalier Universitaire de Limoges. Les prélèvements ont été réalisés entre mars 2011 et avril 2014 et proviennent de patients agés de 70 à 88 ans. L'utilisation des tissus de patients à été approuvée par le commité éthique (Comité de Protection des Personnes, Sud Ouest Outre Mer'; CPP SOOM4; number DC-2008-604).

4) Anticorps

L'ensemble des anticorps primaires et secondaires utilisés lors des différentes expérimentations est référencé dans les tableaux 3,4 et 5 ci-dessous.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution	Espèce
BDNF	R&D	MAB248	1/500	Souris
TrkB	BD Biosciences	610101	1/500	Souris
Phospho-TrkB	Millipore	ABN1381	1/750	Lapin
TrkA	Cell Signaling	#2505	1/1000	Lapin
TrkC	Cell Signaling	#3376	1/1000	Lapin
$P75^{NTR}$	Santa Cruz	Sc-8317	1/400	Lapin
Sortiline	Santa Cruz	Sc-25055	1/400	Chèvre
AKT	Cell Signaling	#2920	1/2000	Souris
Phospho-AKT (Ser 473)	Cell Signaling	#4060	1/1000	Lapin
mTOR	Abcam	Ab2732	1/1000	Lapin
Phospho-mTOR (ser 2448)	Abcam	Ab1093	1/1000	Lapin
Beclin 1	Cell Signaling	#3738	1/1000	Lapin
ATG5	Cell Signaling	#2630	1/1000	Lapin
LC3	Cell Signaling	#2775	1/1000	Lapin
PARP	Santa Cruz	sc-56196	1/500	Souris
ERK	Cell Signaling	#9102	1/1000	Lapin
Actine	Sigma Aldrich	A2228	1/10000	Souris

Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés en western Blot et conditions d'utilisation.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution	Espèce hôte
Anti-IgG de souris HRP	DAKO	P0448	1/1000	Chèvre
Anti-IgG de lapin HRP	DAKO	P0447	1/1000	Chèvre
Anti-IgG de chèvre HRP	DAKO	P0449	1/1000	Rabbit

Tableau 4: Anticorps secondaires utilisés en western blot et conditions d'utilisation.

Anticorps primaires	Fournisseur	Référence	Dilution	Espèce hôte
TrkB	R&D	MAB3971	1/150	Souris
Phospho TrkB	Millipore	ABN1381	1/200	Lapin
Sortiline	Santa Cruz	sc-25055	1/150	Chèvre
BDNF	Santa Cruz	Sc-20981	1/150	Lapin
LC3	Cell Signaling	#2775	1/200	Lapin

Tableau 5: Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence et conditions d'utilisation.

Pour la réalisation des immunomarquages, deux anticorps secondaires ont été utilisés a une dilution au 1/3000 : l'Alexa Fluor 488 (Life Technologies, A10226), l'Alexa fluor 594 (Life Technologies, A10270) et l'Alexa fluor 594 (Life Technologies, A11058). .

II- METHODES

1) Culture cellulaire

Conditions de culture et de conservation

Les cellules ont été cultivées avec le même milieu RPMI 1640 (Gibco). Ce milieu complet est enrichi de 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen) préalablement décomplémenté 30min à 56°C, de 5% de péniciline et de streptomycine et de 5% pyruvate de sodium (Invitrogen). Les cellules sont maintenues à 37°C, sous atmosphère humide enrichie avec 5% de CO_2.

Lorsque la culture atteint 80% de confluence, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) avant d'être décollées du support par une solution de trypsine (1X) contenant 0,05 % d'EDTA (Invitrogen ; chélateur du calcium facilitant l'action de la trypsine) pendant 5 min à 37°C. Elles sont ensuite reprises dans le milieu de culture complet contenant du SVF, qui inhibe l'action de la trypsine, et centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min. Le culot cellulaire est alors remis en suspension dans 1 ml de milieu complet et les cellules sont énumérées sur lame de Malassez en présence de bleu trypan (Sigma).

La conservation des cellules est réalisée par congélation dans l'azote liquide (2 millions par aliquots). Pour cela, les cellules sont lavées, décollées et comptées comme

décrit précédemment. Elles sont ensuite remises en suspension (totalité du cryotube) dans 90% de SVF additionné de 10% de diméthylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) qui est un cryoprotecteur. Le cryotube est placé dans un bloc à congélation contenant de l'isopropanol (qui assure une congélation lente, SigmaAldrich) pendant 24 heures à -80℃, avant d'être stockés dans un container d'azote liquide à -196℃.

La décongélation doit, elle, être rapide : dès la sortie de l'azote, le cryotube est placé dans un bain marie à 37°C jusqu'à décongélation complète. Les cellules sont reprises dans du milieu de culture complet puis l'ensemble est centrifugé à 1500 rpm pendant 5 min pour éliminer le DMSO et le sérum en excès. Les cellules sont ensuite remises en culture en flasque dans du milieu complet.

Traitements cellulaires

10 millions de cellules ont été ensemencées comme décrit précédemment dans des flasques de 75cm² et laissées une nuit dans du milieu complet seul. Le lendemain, les différents traitements ont été réalisés. Le K252a a été dilué inittialement dans du DMSO 100% puis dans du PBS pour obtenir une concentration finale de 100nM ; le traitement a duré 3h ou 72h. La CQ à été dissoute dans du PBS, une série de dilutions a été effectuée pour obtenir une concentration de 25µM. Le traitement avec la CQ a aussi été réalisé pendant 3h ou 72h.

Transfections

Pour réaliser l'inhibition de l'autophagie, nous avons ciblé par siRNA l'expression de la protéine ATG5, qui intervient de facon précoce dans le déroulement du processus. Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 150 000 cellules par puits. Après 24h, une transfection est réalisée avec 20nM de siRNA ATG5 (#6345, cell signaling), 200µL de milieu sans sérum de veau fœtal et 16µL d'interférine (409-10, polyplus). Ce cocktail est incubé pendant 10min à température ambiante avant d'être déposé sur les cellules, pour permettre la formation d'un complexe entre les siRNA et l'interférine. Après 72h, les cellules sont récupérées et conservées sous forme de culot sec à -80℃ pour une analyse ultérieure.

Mesure de la cytotoxicité

Le test MTT est utilisé pour évaluer l'activité déshydrogénase mitochondriale et peut être apparenté à un test de cytotoxicité. Il est basé sur la dégradation du MTT en un sel soluble de « formazan » par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Pour réaliser ce test, les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96 puits (2500 cellules par puits). Le lendemain, elles ont été traitées à l'aide de différentes molécules comme décrit précédemment. A l'issu du traitement, le milieu de culture est changé et les cellules sont incubées 2h dans une solution contenant 100µL de milieu de culture complet additionné de 20µL de solution MTT (Cell Titer 96® AQueous Solution Cell Proliferation Assay ; Promega). Le formazan forme un précipité marron, dosable par spectrophotométrie (490 nm). Les résultats sont directement proportionnels à la cytotoxicité de la molécule testée.

Analyse de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux

Après traitement, 250 000 cellules sont lavées 2 fois au PBS et centrifugées avant d'être remises en suspension dans 200µL de PBS. Ensuite, l'iodure de propidium (0,5 mg/mL) est ajouté juste avant l'analyse au cytomètre en flux (FACS Vantage, BD Biosciences).

Analyse de l'Apoptose par cytométrie en flux

L'analyse de l'apoptose a été déterminée par l'utilisation d'Annexine V couplé au FITC. Cette molécule présente une affinité pour les phosphatidyl-sérine, exposés sur le feuillet externe de la membrane plasmique, lors des étapes précoces de l'apoptose. 250 000 cellules préalablement lavées au PBS additionné de calcium (14080, Gibco) sont incubées avec l'Annexine V-FITC (640906, 90µg/mL - Biolegend) pendant 15 min à l'obscurité, à température ambiante. Après conservation sur glace, l'IP (0,5 mg/mL) est ajouté et l'analyse au cytomètre en flux est réalisée.

2) Analyse transcriptomique

Les transcrits des neurotrophines ainsi que de leurs récepteurs ont été quantifiés par RT-PCR quantitative.

Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été récupérés à partir de culots cellulaires provenant de cultures traitées et stockés à -80°C. Les ARN ont été extraits à l'aide du kit RNAeasy (Qiagen) puis dosés par spectrophotométrie (Nanodrop, Thermoscientist) à 260 nm. Les rapports d'absorbance 260/280 et 260/230 (les protéines absorbant à 280 nm et les polysaccharides à 230 nm) ont été déterminés, afin de vérifier la pureté des ARN extraits. Lorsque ces rapports approchent une valeur de 2, les solutions sont considérées comme pures.

Reverse Transcription des ARN

Les ARNs sont rétro transcrits en ADNc (ADN complémentaires) en utilisant le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem)Le mélange réactionnel de reverse transcription est le suivant :

- 2 µL de tampon 10X RT buffer
- 0.8 µL de dNTP 100 mM
- 2 µL de random primer 10X
- 1µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase
- 4.2 µL H_2O

A ce mélange réactionnel, 10 µL d'ARNs (2 µg) sont ajoutés.

L'ensemble est placé dans un thermocycleur (VWR). Le programme de RT est constitué d'une étape de 10min à 25°C (qui permet d'hybrider les amorces aléatoires), suivi d'une étape de 120 min à 37°C (permettant la synthèse des ADNc) et d'une étape finale de 5 min à 85℃ (pour inactiver la réverse transcriptase).

PCR quantitative (qPCR)

La PCR quantitative de type Taqman repose sur l'utilisation d'une sonde spécifique du fragment d'ADN à amplifier marquée en 5' par une molécule fluorescente, la 6-carboxyfluorescéine, appelée « Reporter R », et en 3' par une autre molécule fluorescente appelée « Quencher Q », marqué à la 6-carboxytetraméthylrhodamine. Les spectres

d'émission du Reporter et du Quencher se chevauchent. Comme le Reporter et le Quencher sont proches, ce dernier absorbe l'émission fluorescente du Reporter. Lors de la synthèse de l'ADN, l'enzyme polymérase contenue dans le « master mix » libère le Reporter. L'émission de fluorescence est obtenue suite à l'hydrolyse de la sonde, permettant de déterminer un « cycle seuil » ou Ct (Cycle threshold) qui correspond au nombre de cycles de PCR nécessaires à la détection de la fluorescence pour un gène d'intérêt. Cette valeur est à la base des calculs pour quantifier l'ADN amplifié de la façon suivante, les résultats étant exprimés en quantité relative (Relative Quantities (RQ):

ΔCt= Ct du gène étudié – Ct du gène de référence

$\Delta\Delta$Ct= ΔCt de la condition contrôle - ΔCt de la condition étudiée

RQ= $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Les ADNc ont été dilués au ¼ dans de l'eau RNase free. La réaction de PCR quantitative est réalisée en plaque 96 puits, chaque puits contenant 4 µL d'ADNc (soit une quantité de 50ng) auxquels sont ajoutés 6 µL du mélange réactionnel constitué de :

- 5 µL de tampon master mix (TaqMan® Fast Advanced Master Mix, Life Technologies)
- 0.4 µM d'amorce sens correspondant au gène d'intérêt (**tableau 6**)
- 0.4 µM d'amorce anti sens correspondant au gène d'intérêt
- 0.4 µM de la sonde Taqman

Les réactions de PCR quantitatives ont été réalisées avec l'appareil StepOne (Life Technologies). Le programme utilisé consiste en une étape de dénaturation à 95°C pendant 12 sec (pour activer la polymérase) suivie de 40 cycles composés chacun d'une dénaturation à 95°C pendant 5 sec puis d'une hybridation des amorces et des sondes à 60°C pendant 20 sec permettant l'élongation. Les analyses ont été réalisées grâce au logiciel StepOne™.

NOM		SEQUENCES	LONGUEUR (PB)
TrkB 145	R	AGGAAATTCACGACGGAAAG	*137*
	F	CTGGTGAAAATCGGGGACT	
	PROBE	TGTACAGCACTGACTACTACAGGGTCGGTG	
TrkB 95	R	GGAAGTGCTGCTTATCTGGG	*138*
	F	AAGATCCCACTGGATGGGTA	
	PROBE	ATAAAGGAAAAGACAGAGAAAGGGGCTGTG	
BDNF	R	CAAAACGAAGGCCTCTGAAG	*123*
	F	GGCTATGTGGAGTTGGCATT	
	PROBE	ATTTCTGAGTGGCCATCCCAAGGTCTAG	
$P75^{NTR}$	R	AAGCAGAACAAGCAAGGAGC	*117*
	F	CACCACCGACAACCTCATC	
	PROBE	CCTACATAGCCTTCAAGAGGTGGAACAGCT	
Sortiline	R	CACTCCACAGACCCTGAAGA	*104*
	F	AGCCAGTGGGTCTCCTACAC	
	PROBE	TCCTTGAAAGGAACTGTGAAGAGAAGGACT	
HPRT1	Applied biosystems; 4325801		

Tableau 6 : Séquences des différentes sondes et amorces utilisées lors des réactions de PCR quantitatives.

Dans le but de pouvoir comparer les résultats, le gène de ménage *HPRT1* a été utilisé comme gène de référence, les variations d'expression d'autres gènes de référence comme le *18S* ou la *GAPDH* s'étant avérées trop importantes (écart-types de Ct de 0,7 maximum).

3) Analyse protéique par Western Blot

La technique de western blot a été utilisée pour évaluer l'expression des protéines de la voie des neurotrophines et de l'autophagie après les traitements cellulaires.

Extraction des protéines en condition dénaturante.

L'extraction protéique est réalisée sur des culots cellulaires (conservés à -80 °C) avec un tampon de lyse « maison » composé comme de 50mM Tris-HCL, pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 1mM DTT, 0.1% Tween 20, 10% glycerol, 2mM Na3VO4, 20mM NaF, proteases cocktail inhibitor (Sigma Aldrich, P8340).

L'incubation se déroule pendant 30 minutes sur glace afin de lyser les cellules. Pour améliorer l'efficacité du tampon, une lyse mécanique est réalisée à l'aide d'un sonicateur (5 cycles de 2sec, à 60Hz pendant une min). Le lysat obtenu est ensuite récupéré et centrifugé pendant 20 min à 4°C et à 14000g. Le surnagent contenant les protéines est transféré dans un tube neuf et conservé à -80°C.

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (Sigma-Aldrich) en référence à une gamme étalon contenant de la BSA (Bovine Serum Albumine) (lecture de DO à 595 nm).

Extraction des protéines à partir des tumeurs de patients de CCR.

30µg de tissus ont été broyés dans un tube contenant des billes de céramique et le tampon de lyse précédemment décrit, grâce au broyeur Percellys à 5500 rpm pendant 40 sec avec une pause de 15 sec. Ce programme est répété 2 fois. Le broyat est centrifugé à 14000g pendant 20 min à 4°C. Le surnagent contenant les protéines est alors récupéré et les protéines dosées comme décrit précédemment.

Electrophorèse, migration et transfert des protéines

30µg de protéines ont été mélangés à un volume identique de tampon de charge 2X (Laemmli Buffer, Biorad). Ce tampon contient du SDS permettant aux protéines d'être chargées négativement pour assurer une migration selon un champ électrique uniquement en fonction de leur poids moléculaire. Il contient également du β-mercaptoéthanol qui complète la dénaturation des protéines, réalisée par incubation des échantillons pendant 5 min à 95°C dans un bain sec. . Les protéines sont séparées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE (4 à 15%, Biorad) dans un système Trans-Blot (Biorad) contenant un tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,01% SDS et pH 8,3 ; Biorad) pendant 1h30 à 95V. Dans le but de vérifier la taille des protéines, un marqueur de taille coloré (EZ-RUN™ protein

Ladder, BP3603-1 ; Fisher Scientific) est déposé sur le gel en même temps que les échantillons protéiques. Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (PolyVinylidène DiFluoride) de 0,2 ou 0,45µm à l'aide d'appareil de transfert semi-sec. Pour cela, 4 papiers Wattman sont imbibés de tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM Glycine, pH 8,3 ; BioRad ; 20% méthanol) puis déposés sur l'anode. La membrane préalablement activée dans du méthanol est déposée par-dessus, puis le gel et 4 autres papiers Wattman, en contact avec la cathode. Le transfert est réalisé soit avec un appareil de transfert classique (Biorad) (20 volts pendant 2h), soit à l'aide de l'appareil Turbo (Biorad) pendant 30 minutes, à 25 volts et 2,5 ampères.

Saturation de la membrane et incubation en présence des anticorps.

Lorsque le transfert est terminé, la membrane est lavée dans une solution de TBS 1X, tween 20 0,1%, puis les sites non spécifiques sont saturés pendant 1 h à température ambiante dans une solution TBS 1X, tween 20 0,1%, 5% de lait demi écrémé. La membrane est ensuite incubée dans la solution d'anticorps primaire d'intérêt (tableau 1 et 2) à 4°C pendant une nuit sous agitation. Elle contient 5% de lait écrémé pour les anticorps dirigés contre les protéines non phosphorylées et 5% de BSA pour les anticorps dirigés contre les protéines phosphorylées. Le lendemain, 3 lavages de la membrane (5 min à température ambiante) sont réalisés avec une solution de TBS 1X, tween 20 0,1%. Elle est ensuite incubée pendant 1h à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La membrane est à nouveau lavée 3 fois en TBS 1X, tween 20 0,1%avant la révélation.

Révélation par chimioluminescence

La révélation repose sur une réaction de chimioluminescence. Elle est due à l'oxydation du luminol par l'oxygène, produit par l'action de la peroxydase sur le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) contenu dans le réactif. La membrane est mise en contact pendant 1 minute avec le mélange du kit Immobion Blot (Millipore) dans les proportions 1:1 (luminol : H_2O_2). Il se forme un composé intermédiaire instable qui, en revenant à l'état stable, émet de la lumière, captée par le système d'acquisition d'images G-Box (Ozyme) via le logiciel associé (Syngene).

La quantification des bandes obtenues en Western Blot ont été réalisées avec le logiciel ImageJ (version 1.46).

4) ImmunoFluorescence Indirecte (IFI)

Les cellules sont ensemencées (150000 cellules par puits) en plaque 24 puits dans lesquelles des lamelles de verre (12 ou 14 mm de diamètre) ont été préalablement déposées. Le lendemain, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde (PFA, 4% en PBS) pendant 30 min, à température ambiante. Ensuite, chaque puits est lavé 3 fois avec du PBS. Une étape de perméabilisation est réalisée si la protéine d'intérêt est intra cellulaire, avec une solution de PBS, BSA 5%, 0,1% triton à température ambiante pendant 20 min. Après 3 lavages avec du PBS les anticorps primaires, dilués en PBS-BSA 5% sont déposés pendant une nuit à 4℃ sous agitation.

Le lendemain, 3 lavages en PBS-Tween20 0,05 % sont effectués et les anticorps secondaires couplés à un Alexa Fluor (Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 595) dilués en PBS, BSA 5% sont déposés dans chaque puits pendant 2 h à température ambiante sous agitation. Après 3 lavages, le marquage des noyaux est réalisé pendant 5 min grâce au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) (62284 ; Fisher Scientific) puis 3 nouveaux lavages au PBS sont réalisés. A la fin des étapes de marquage, les lamelles contenues au fond des puits sont récupérées méticuleusement et montées sur des lames d'observation grace à la solution de montage Aequous Mounting Medium (S3025 ; Dako). Les lames sont conservées à 4°C avant d'être analysées au microscope à épifluorescence (Visiolab 2000) ou confocal (LSM510 Zeiss).

5) Dosage du BDNF dans le surnageant de culture par la méthode ELISA

Le taux de BDNF dans le surnagent de culture cellulaire a été évalué par ELISA. Chaque échantillon a été testé en tripliquette. Le protocole à été suivi selon les instructions du fabricant (Cusabio Biotech CO, CSB-E04501h and CSB-E04689h, Clinisciences, Nanterre, France). Le taux minimal de BDNF détectable correspond à une concentration de 0.08 ng/ml.

6) Greffes hétérotopiques de cellules tumorales sur le modèle murin « nude »

La souris Nude est un modèle d'animal immunodéprimé, déplété en lymphocytes T. Ces souris présentent une altération du gène *FOXN1* (non codant) entrainant une altération du système immunitaire. Ce modèle permet de réaliser des greffes de cellules humaines sans rejet. De plus, étant dépourvues de pelage, ces animaux présentent l'avantage de permettre une très bonne visibilité du point d'injection ainsi qu'un suivi aisé de la croissance tumorale lors de greffes sous-cutanées (Flanagan, 1966; Pantelouris, 1968).

Les souris utilisées lors de ces travaux de thèse proviennent de l'entreprise (Janvier Labs). Nous avons réalisé sur ce modèle des greffes hétérotopiques de cellules tumorales.

Les animaux sont hébergées dans la zone SOPF (Specific and Opportunistic Pathogen Free) de l'animalerie de type A1 + de l'Université de Limoges. Elles sont placées dans des cages filtrées, sur portoirs ventilés, dans des locaux maintenus en surpression atmosphérique et leur alimentation est stérilisée au préalable. L'ensemble des manipulations des animaux s'effectue sous une hotte à flux laminaire.

Greffe sous cutanée

Les souris sont anesthésiées par injection intra péritonéale de 80 µl d'un mélange de Kétamine (10mg/ml ; Imagen 1000 ®) et de Xylazine (Rompun 2%), dilué dans du PBS. Puis, une injection d'une suspension de 2 millions de cellules (dans un volume de 50 µl maximum) est réalisée en sous cutané au niveau de la cuisse arrière droite (greffe hétérotopique).

Suivi et mesure de la croissance tumorale

Le suivi de la progression tumorale est assuré par un examen macroscopique quotidien et minutieux des animaux ainsi que par la mesure au pied à coulisse de la tumeur (2 mesures par semaine).

Pour établir et calculer le volume tumoral, la formule suivante a été utilisée : Volume = $[L \times l\ (L+l)]\pi/12$, où L correspond à la longueur et l à la largeur de la masse tumorale.

Traitements des souris

Lorsque le volume tumoral atteint 300 mm^3 (jour 0), les souris sont divisées en 2 groupes : traités et contrôles, avec 5 animaux par groupe. Chaque traitement est administré par injection intra péritonéale, selon le protocole suivant :

- K252a (SF 2370 ; Alomone) : chaque animal reçoit une injection 3 fois par semaine pendant 21 jours d'une dose correspondant à 0.5mg/kg sous un volume d'injection de 100µL (Kawamura et al., 2010).
- Chloroquine (C6628 ; Sigma) : chaque animal reçoit une injection tous les 2 jours pendant 12 jours d'une dose correspondant à 10mg/kg sous un volume d'injection de 90µL (Lefort et al., 2015; Sasaki et al., 2010a).
- Double inhibition : les animaux de ce groupe sont traités avec les deux molécules en même temps en suivant les protocoles précédents et ce pendant 21 jours.

Sacrifice et prélèvement des tumeurs

Après avoir sacrifié l'animal par dislocation cervicale, le sang est prélevé par ponction intra-cardiaque et, la masse tumorale est prélevée.

Les tumeurs sont divisées en deux parties. La première, conservée à -80°C, est destinée à réaliser des analyses transcriptomiques ou protéiques). La seconde partie de la tumeur est fixée dans du formol 10% pendant une nuit avant l'inclusion en paraffine le lendemain (dans le service d'anatomopathologies du CHRU de Limoges) pour permettre la réalisation ultérieure de coupes.

7) Modèle murin de CCR chimiquement induit sur souris BALB-C

Les souris BALB-c correspondent à un modèle murin albinos utilisé classiquement en laboratoire. Le modèle BALB-c est hébergé dans des cages « classiques » de l'animalerie conventionnelle de l'Université de Limoges. Elles ont été utilisées pour des essais de mise au point d'un modèle chimiquement induit de CCR. Ce type de modèle présente l'avantage de recréer l'environnement tumoral au sein même de l'organe.

Traitements des souris

Les animaux ont été traités par azoxyméthane (AOM) et sel de dextran (DSS). L'AOM a été injecté à J0 (10 ou 12 mg/kg) en intra péritonéal et correspond à l'initiation du protocole. 5 jours après l'injection, les animaux reçoivent le DSS à 2,5% dans l'eau de boisson. 3 cycles de DSS de 5 jours sont réalisés, suivis de 16 jours d'eau selon le protocole décrits par Barderas et ses collaborateurs (Barderas et al., 2013).

Les animaux ont été suivis quotidiennement afin de surveiller leur état de santé ainsi que leur prise alimentaire. Ils sont pesés une fois par semaine.

Sacrifice des souris et prélèvement des tumeurs

Après avoir sacrifié l'animal par dislocation cervicale, les poumons sont insufflés et fixés dans du formol 10%. Le foie est lui aussi récupéré. Enfin, le côlon est prélevé puis mesuré. Il est disposé sur un support « pic » puis fixé dans du formol 4%. Le lendemain, le côlon est récupéré puis enroulé sur lui-même pour être inclus en paraffine dans les cassettes adaptées. L'ensemble des organes prélevé est ensuite fixé en paraffine afin de pouvoir réaliser des coupes qui seront colorées par la technique histologique classique HES.

8) Immunomarquage des coupes de tumeur

Après le bain de formol 10%, un cycle automatique de déshydratation/inclusion en paraffine est réalisé par un automate (Leica, ASP3005) dans le service d'anatomo-pathologie du CHRU de Limoges. L'inclusion définitive dans la paraffine solide est réalisée par nos soins afin de choisir l'orientation du tissu. Lorsque la paraffine est solide des coupes d'une épaisseur de 4 µm sont réalisées et déposées sur des lames de verre (SuperFrost plus, VWR), puis placées une nuit en étuve à 56°C. Une étape de prétraitement est nécessaire afin de pouvoir éliminer la paraffine et réhydrater les tissus : 2 bains de 5 minutes dans du Toluène, 2 bains de 5min dans l'éthanol absolu puis 1 bain dans du PBS jusqu'à utilisation. Les lames sont immergées dans du tampon citrate (pH 7 ; soit 200 µM acide citrique et 9,8 mM citrate de sodium) dans un récipient allant au four à micro-ondes, et subissent 3 cycles de 5 min à 750 W (pour les antigènes cytoplasmiques). Cette dernière étape permet la perméabilisation des membranes et le démasquage des antigènes. Après refroidissement, les lames sont laissées dans du PBS jusqu'à utilisation.

L'étape de révélation faisant intervenir la peroxydase, il est indispensable d'effectuer au préalable une inhibition des peroxydases endogènes. Pour ce faire, les coupes sont immergées durant 10 min dans du méthanol + 5% H2O2 puis, lavées 2 fois 5 min en eau puis en PBS. Afin de limiter les réactions aspécifiques, la saturation des sites antigéniques est réalisée par un bain de 30 min dans du PBS – BSA 3%. L'incubation avec les anticorps primaires (anti Ki67, DakoCytomation, M 7240 ; anti CD31, histonova, DIA-310 ou anti CD45R, abcam, ab64100) dilués au 1/600 ème dans du PBS – BSA 3 % (1 h) est suivie de 2 lavages en PBS. Puis, les coupes sont incubées pendant 30 min avec les anticorps secondaires du système Envision anti-IgG de souris ou de rat (Dakocytomation), lié à un polymère sur lequel sont fixées de nombreuses molécules d'HRP («Horse Radish Peroxydase»). Cette étape est suivie de 2 lavages en PBS. Enfin, l'étape de révélation est réalisée par addition de DAB (DiAminoBenzidine). La HRP catalyse la conversion en un produit chromogène de coloration marron. La réaction est stoppée par lavage intensif des lames à l'eau courante. Afin de mieux distinguer les constituants tissulaires, une étape de contre coloration à l'hématoxyline (coloration des noyaux) est requise, suivie d'un bain dans du carbonate de lithium qui d'accentue le contraste. Les tissus sont ensuite déshydratés par des bains successifs dans l'éthanol absolu puis des bains de toluène, dans lequel les lames peuvent rester jusqu'au montage. Celui-ci s'effectue entre lame et lamelle à l'aide du milieu de montage Eukit (03989, Fluka). Les lames sont ensuite séchées à l'abri de la lumière. La visualisation du marquage a été réalisée à l'aide du microscope Leica.

9) Analyses statistiques

L'ensemble des résultats obtenus ont été statistiquement analysés grâce à l'utilisation du logiciel Statview 5.0 software (Abacus Concepts, Piscataway, USA). La significativité statistique a été déterminée grâce au test ANOVA. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p< 0.001$.

RESULTATS

Dans un travail préalablement conduit par notre équipe, il a été montré que la signalisation neurotrophique, au travers de la voie TrkB/BDNF, constitue une boucle autocrine de survie pour les cellules de CCR (Akil et al, 2011). Dans les modèles cellulaires étudiés, dépourvus d'expression de TrkA et Trkc, le couple TrkB/BDNF est impliqué dans la résistance au stress nutritif, en favorisant notamment la résistance à la mort apoptotique. Pour faire suite à cette étude, nous avons choisi d'inhiber de façon pharmacologique la voie des NTs et d'observer la conséquence sur la survie cellulaire. Cette inhibition est corrélée à une activation de la voie autophagique, laquelle permet également la survie cellulaire. C'est la raison pour laquelle, nous avons choisi, dans un second temps d'inhiber le mécanisme autophagique et d'analyser la répercussion éventuelle sur la réponse neurotrophique. Une fois encore, nous avons observé une potentialisation de la réponse neurotrophique en réponse à l'inhibition (pharmacologique ou génique) de l'autophagie. Ces observations nous ont conduit à réaliser une double inhibition de la signalisation des NTs et de l'autophagie afin d'améliorer l'efficacité des traitements pris isolément. L'ensemble de ces résultats *in vitro* sur deux lignées cellulaires représentatives de deux stades différents de CCR, sont regroupés dans la partie I des résultats.

La partie II est consacrée à l'approche *in vivo* chez le modèle de souris Nude, où nous avons réalisé des greffes orthotopiques de cellules tumorales suivies de traitement (ou non) par les molécules inhibitrices des signalisations neurotrophique et autophagique. Pour compléter cette approche, l'analyse des deux voies de survie dans les tissus de patients atteints de CCR a également été réalisée et est présentée dans cette partie du travail.

Enfin, la partie III est consacrée à un essai concernant la mise au point d'un modèle chimiquement induit de CCR chez la souris Balb-c.

PARTIE I : APPROCHE *IN VITRO* : ETUDE DE L'INHIBITION DES SIGNALISATIONS NEUROTROPHIQUES ET AUTOPHAGIQUES DANS LES LIGNEES CELLULAIRES DE CCR.

I-1- Utilisation du K252a et effet sur les signalisations intracellulaires.

I-1-1 Expression des neurotrophines et de leurs récepteurs en conditions basales.

Sur différentes lignées de CCR, les travaux préalables de H.Akil ont montré une expression de TrkB alors que les deux autres récepteurs Trk sont absents. C'est la raison pour laquelle nous avons recherché l'expression des récepteurs aux NTs dans les lignées SW480 et SW620, utilisées dans cette étude, avant de réaliser les traitements visant à inhiber leur signalisation (figure 26).

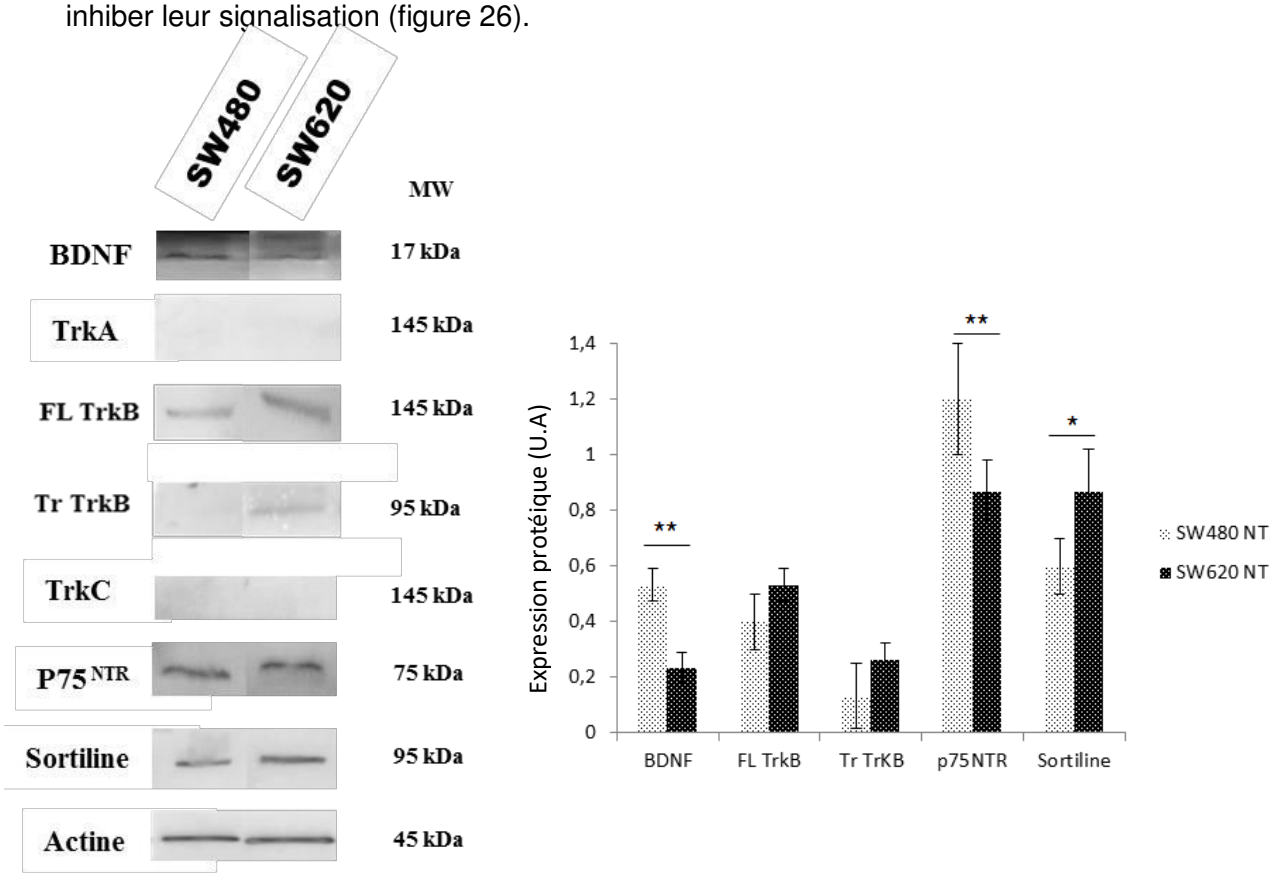


Figure 27 : Expression du BDNF et des récepteurs aux neurotrophines dans les lignées de CCR SW 480 et SW 620 cultivées en condition basale (10% SVF). L'expression protéique de TrkA, TrkB, TrkC, $p75^{NTR}$ et de la sortiline a été évaluée par Western Blot. Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Dans les deux lignées cellulaires, le récepteur TrkA n'est pas exprimé. Par contre, le récepteur TrkB est exprimé sous ses 2 formes tronquée (95kDa) et mature (145 kDa). Nos résultats montrent l'absence de TrkC alors que la présence de ce récepteur a été retrouvée dans les lignées de CCR (Genevois et al., 2013; Sasahira et al., 2013). Cette différence pourrait provenir du modèle cellulaire étudié et/ou des anticorps utilisés pour la révélation. De plus, le récepteur $p75^{NTR}$ ainsi que la sortiline sont exprimés dans les 2 lignées. Ainsi, pour faire suite aux précédents résultats obtenus au sein du laboratoire, nous avons focalisé notre étude sur le TrkB.

I-1-2 Effets du K252a sur les transcrits TrkB/BDNF/$p75^{NTR}$ et sortiline.

Le K252a est une molécule connue pour inhiber la signalisation des récepteurs Trk, par son effet sur leur phosphorylation, étape indispensable à leur activation. Nos premiers résultats ont permis de déterminer les conditions de traitement avec le K252a. Une concentration de 100nM à été retenue et un temps de traitement de 3h dans le but de pouvoir analyser ultérieurement les éventuelles variations de l'autophagie (processus très rapide à se mettre en place).

Pour valider le modèle d'inhibition, nous avons dans un premier temps, recherché l'expression des transcrits codant la forme entière et la forme tronquée de TrkB (seul récepteur Trk mis en évidence dans les lignées SW480 et SW620) et son ligand BDNF ainsi que ceux de $p75^{NTR}$ et de la sortiline, lorsque les cellules sont traitées avec le K252a (figure 27). Cette analyse a été réalisée par Q-RT-PCR.

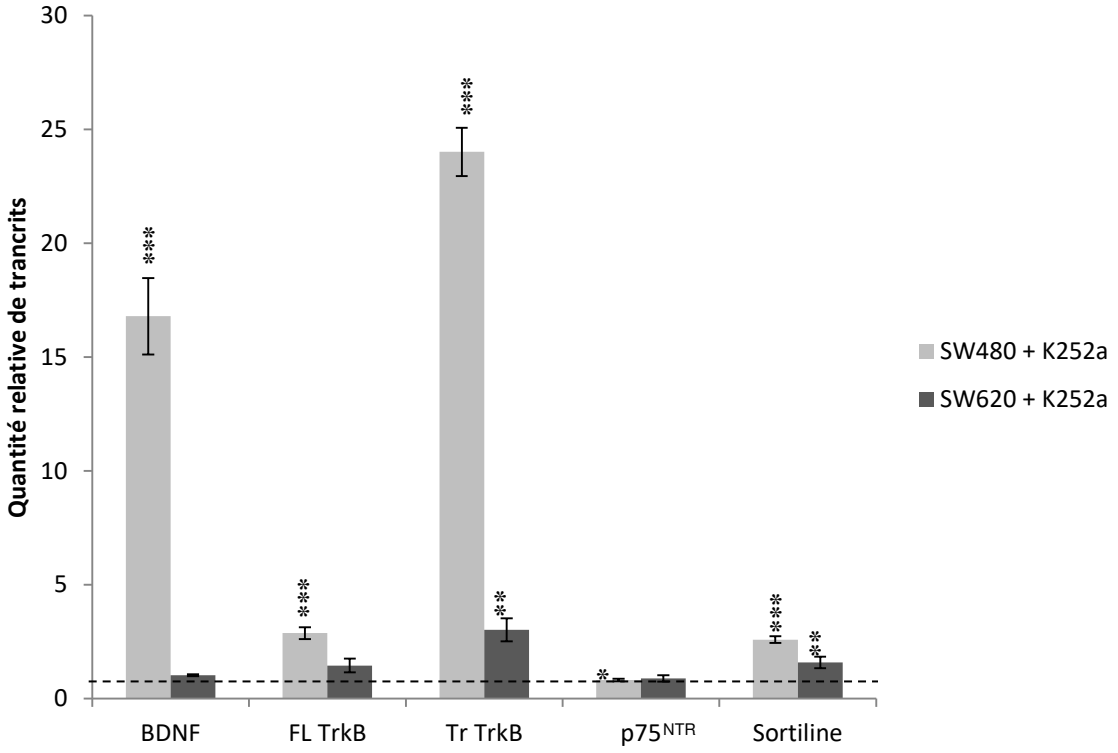


Figure 28 : Effet du K252a sur l'expression des transcrits codant le TrkB, le p75^{NTR}, la sortiline et le BDNF. Les cellules de CCR ont été maintenues en culture en présence ou non de K252a pendant 3h à 100nM puis récupérées comme décrit dans la section « matériels et méthodes ». L'expression des transcrits codant le BDNF, le TrkB145 forme entière (FL), le TrkB95 tronqué (Tr TrkB), le p75^{NTR} et la sortiline a ensuite été évaluée par RT-PCR quantitative. Les histogrammes représentent les quantités relatives en fonction des Ct obtenus. Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview, en les rapportant au contrôle (cellules non traitées, normalisé à 1 et représenté par les pointillés). * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

.

L'inhibition de la signalisation des NTs par le K252a induit dans la lignée SW480 une augmentation significative des transcrits codant le BDNF et les deux formes du TrkB. Au contraire, aucune variation significative n'est détectée dans la lignée SW620 mis à part pour le transcrit de la forme tronquée du TrkB. Le transcrit codant p75^{NTR} est significativement diminué dans la lignée SW480 ($p<0.05$) et montre la même tendance dans la lignée SW620. Enfin, les deux lignées présentent une augmentation importante du transcrit codant la sortiline ($p<0.01$ et $p<0.001$).

I-1-3 K252a et protéines TrkB/BDNF/p75^{NTR} et sortiline : expression et localisation.

Pour compléter les résultats obtenus par Q-RT-PCR, une analyse de l'expression protéique des différentes formes de TrkB (entière, tronquée et phosphorylée) et de BDNF a été réalisée par western blot (figure 28).

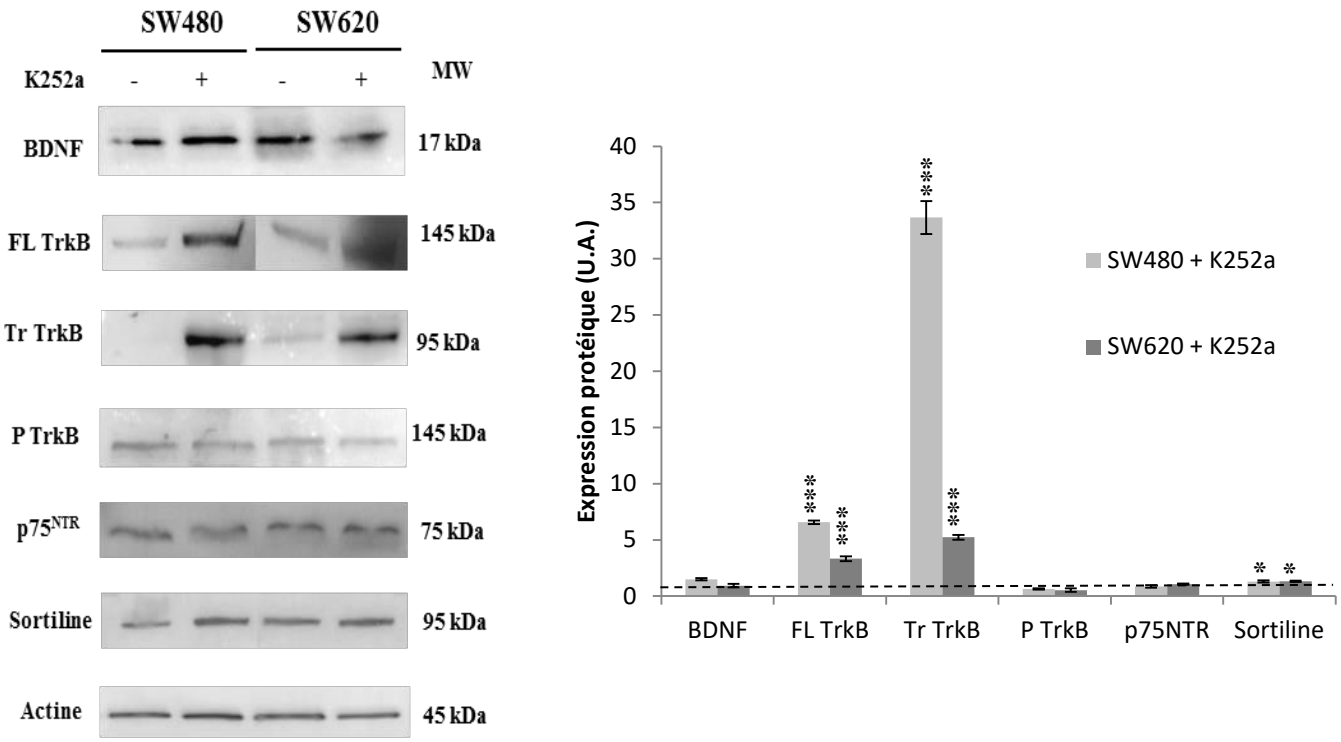


Figure 29 : Effet du traitement par le K252a sur l'expression protéique de la voie neurotrophique. L'expression protéique de BDNF, TrkB (trois formes) de p75 et de la sortiline a été évaluée par Western Blot. La densité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations et sont comparés aux cellules non traitées normalisés à 1 et représenté par les pointillés. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview 5.0. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

L'inhibition de la signalisation des NTs par le K252a ne modifie pas l'expression du BDNF dans les lignées cellulaires. Cependant, l'analyse ne révèle que la part intra-cytoplasmique de la NT. En revanche, l'expression du récepteur TrkB, sous ses deux formes, entière et tronquée, est significativement augmentée dans les deux lignées. Comme décrit dans la littérature (Tapley et al., 1992b), le traitement par le K252a induit une diminution significative de sa forme phosphorylée, ce qui est concordant avec l'inhibition de

la signalisation. De plus, l'analyse a aussi démontré une absence de variations du récepteur $p75^{NTR}$ et une augmentation de la sortiline dans les deux lignées.

Comme les précédents résultats montrent une inactivation du récepteur TrkB (diminution de la phosphorylation) et une absence de variation de l'expression intracellulaire du BDNF, la sécrétion du ligand dans le surnagent de culture a été recherchée par ELISA (figure 29).

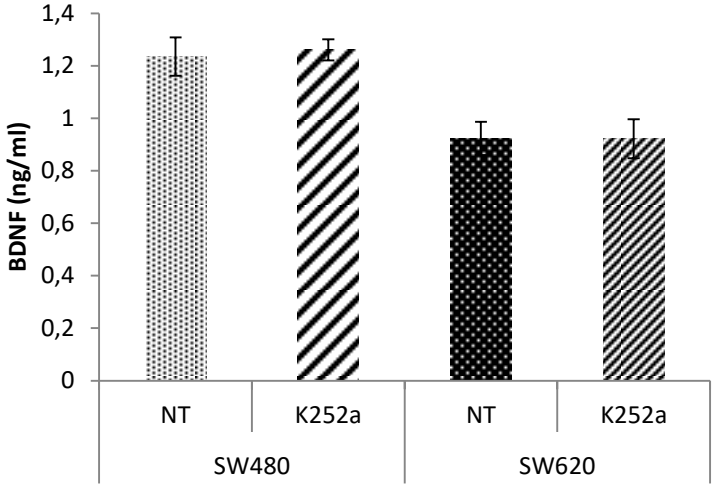


Figure 30 : Dosage du BDNF extracellulaire dans les surnageants de culture traitées ou non par le K252a. Les lignées SW480 et SW620 ont été traitées ou non avec le K252a pendant 3h à 100nM. La sécrétion de BDNF a été évaluée par la méthode ELISA dans le surnageant des cultures. Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview.

Nos résultats montrent que l'utilisation du K252a n'entraîne pas de variation significative du taux de BDNF, ce qui corrobore les données obtenues avec l'analyse des lysats cellulaires (BDNF intracellulaire). Néanmoins, pour compléter cette approche, et comme l'analyse par western blot ne nous permet pas de déterminer l'existence d'une interaction entre BDNF et le récepteur TrkB, nous avons évalué par immunofluorescence indirecte, la fixation du ligand (BDNF) sur son récepteur (TrkB) en présence ou non de l'inhibiteur K252a (figure 30). De façon parallèle, l'analyse des interactions possibles entre TrkB et la sortiline, ainsi que du BDNF et de la sortiline, a aussi été menée par immunofluorescence indirecte en microscopie confocale.

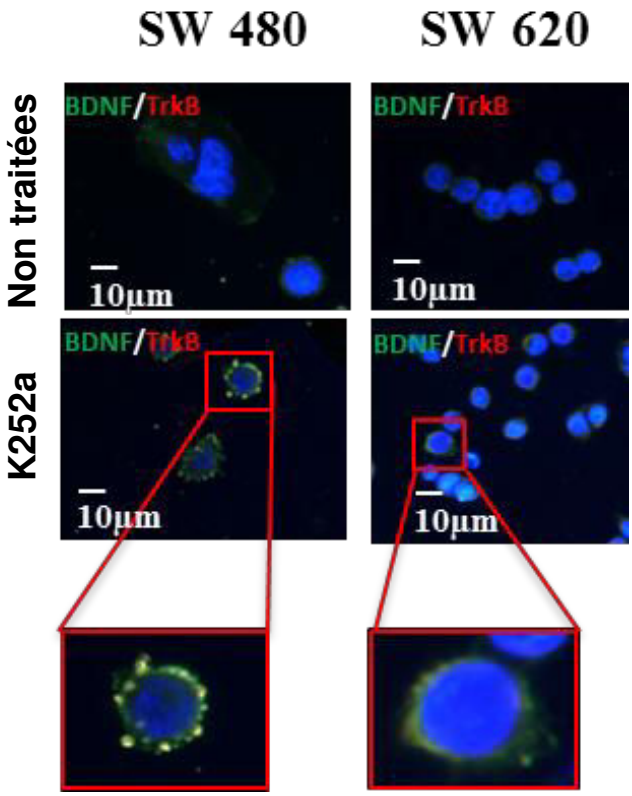


Figure 31 : Effet du K252a sur la localisation de BDNF et de TrkB dans les cellules SW480 et SW620. Les cellules ont été traitées ou non avec du K252a pendant 3h à 100nM. L'immunomarquage a été réalisé comme décrit dans la section « matériels et méthodes ». Le noyau a été coloré au DAPI (bleu). Le BDNF a été marqué à l'aide d'un alexa fluor 488nm (vert) et son récepteur TrkB par un alexa fluor 594nm (rouge).

Le traitement par le K252a induit une relocalisation du BDNF et du TrkB au niveau membranaire où ils sont colocalisés, principalement dans la lignée SW480. Ces résultats suggèrent que le ligand a la capacité de se fixer sur son récepteur afin de déclencher les signalisations en aval, ce qui, une fois de plus suggère une tentative de compensation du défaut de signalisation.

Dans le but d'approfondir les précédents résultats montrant l'augmentation de l'expression de la sortiline (figure 28), nous avons réalisé une étude préliminaire de co-marquage du BDNF et de la sortiline pour étudier le rôle de cette dernière (figure 31).

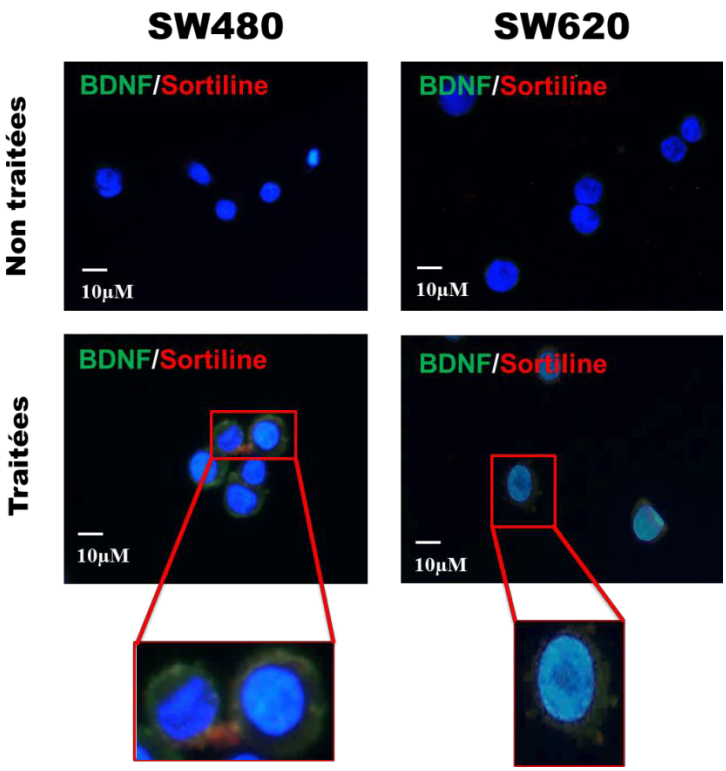


Figure 32. Effet du K252a sur la localisation du BDNF et de la sortiline dans les SW480 et les SW620. Les cellules ont été traitées ou non avec du K252a (3h, 100nM), un immunomarquage a été réalisé comme décrit dans la section « matériels et méthodes ». Le noyau a été coloré au DAPI (fluorescence bleue). Le BDNF a été marqué à l'aide d'un alexa fluor 488nm (fluorescence verte) et la sortiline par un alexa fluor 594nm (fluorescence rouge).

Une légère augmentation d'expression de la sortiline après traitement par le K252a est observée dans la lignée SW480, confirmant les données transcriptomique et protéomique. De même, l'augmentation de l'expression du BDNF est également retrouvée dans les 2 lignées confirmant les résultats précédents (Figures 27 et 28). Cependant, nous n'avons pas vraiment mis en évidence de co-localisation entre ces deux partenaires, qui aurait pu être imputable au rôle de la sortiline comme molécule de co-transport des NTs.

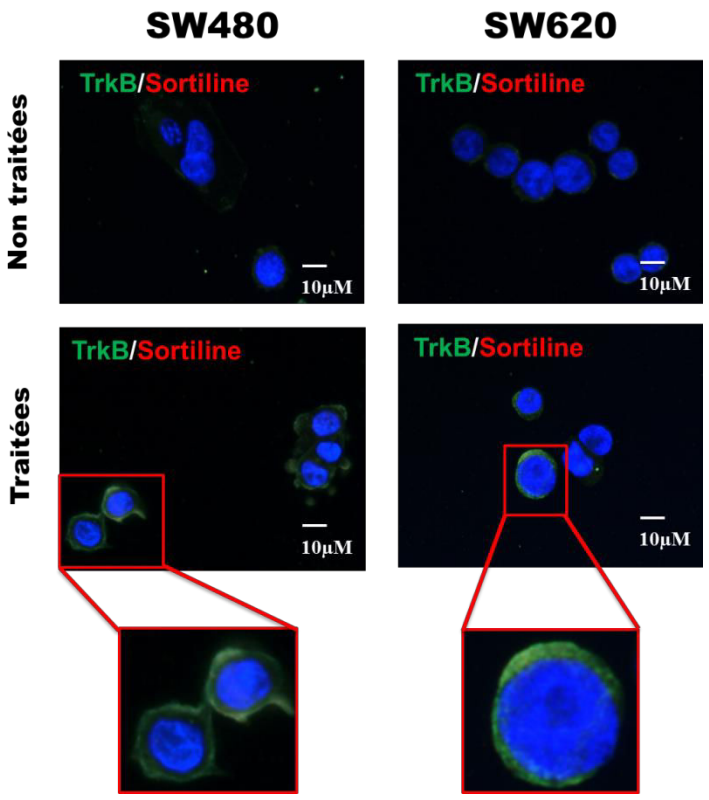


Figure 33 : Effet du K252a sur la localisation de la sortiline et de TrkB dans les SW480 et les SW620. Après avoir traité ou non avec du K252a (3h, 100nM), les cellules ont été fixées puis un immunomarquage a été réalisé comme décrit dans la section « matériels et méthodes ». Le noyau cellulaire a été coloré au DAPI (fluorescence bleue). Le récepteur TrkB a été marqué à l'aide d'un alexa fluor 488nm (fluorescence verte) et la sortiline par un alexa fluor 594nm (fluorescence rouge).

Nous avons pu confirmer que l'inhibition des NTs par le K252a entraîne une augmentation de l'expression du récepteur TrkB alors que ce n'est pas le cas pour la sortiline (Figure 32). Ainsi, l'augmentation d'expression de la sortiline observée au niveau transcriptomique et par analyse protéomique par western blot ne semble pas reposer sur ses fonctions classiques de molécule de co-transport ou de co-recepteur pour les NTs.

Dans la suite de l'étude, nous avons focalisé nos travaux sur le couple BDNF/TrkB et la signalisation en aval.

I-1-4 Effet du K252a sur les signalisations en aval de TrkB : PI3K/AKT/mTOR et Erk

Dans la première partie de nos résultats concernant la réponse cellulaire suite au traitement par le K252a, molécule inhibitrice de la signalisation des NTs, nous avons montré

une augmentation d'expression des deux formes, entière et tronquée, du récepteur TrkB. Celle-ci n'affecte pas l'expression du ligand, le BDNF, mais semble renforcer sa liaison au TrkB. Néanmoins, l'absence de phosphorylation du récepteur est, comme attendu, en faveur d'une inhibition de sa signalisation.

Dans la suite du travail, nous nous sommes intéressés à l'activation de la voie PI3K-AKT et de la voie Erk car ce sont les principales à être activées comme démontré lors des travaux précédents de l'équipe (Akil et al, 2011). Pour cela nous avons évalué par western blot, l'expression des formes totales et phosphorylées des protéines AKT, mTOR et Erk1/2 (figure 33).

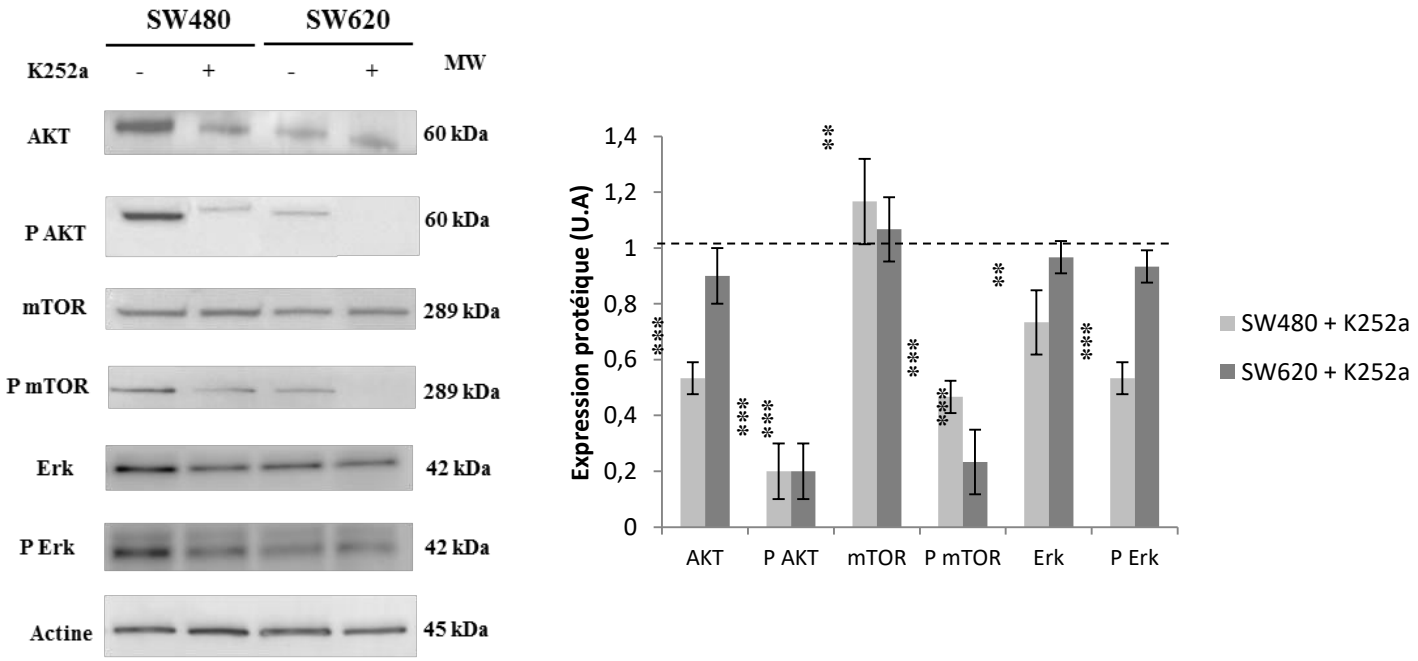


Figure 34 : Effet du K252a sur l'expression et la phosphorylation des protéines de la voie PI3K/AKT/mTOR. L'expression protéique d'AKT, de mTOR et de Erk, ainsi que de leurs formes phosphorylées a été évaluée par Western Blot. La densité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations et sont comparés a ceux des cellules non traitées, normalisé à 1, représenté par les pointillés. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. . * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Comme le montre l'analyse par western blot, l'expression de la forme phosphorylée de la protéine AKT est significativement diminuée, ce qui témoigne de la baisse de son activation. De la même façon, une diminution significative de la forme phosphorylée de la protéine mTOR est observée dans les deux lignées. En revanche, la baisse de phosphorylation de Erk ne se manifeste que légèrement et uniquement dans la lignée SW480. L'utilisation du K252a permet donc de modifier la signalisation de la voie PI3K/AKT

dans les deux lignées et la voie ERK dans la lignée SW480. Ainsi ces données confirment que, en présence d'inhibiteur, même si le BDNF est capable de se fixer sur le récepteur TrkB, il ne peut pas pour autant déclencher la voie de signalisation située en aval.

I-1-5 K252a et devenir cellulaire

Nos précédents résultats ayant démontré que le K252a permet l'inhibition de la signalisation de survie autocrine induite par le couple TrkB/BDNF, nous avons recherché l'impact de cette inhibition sur le devenir cellulaire. Pour cela, nous avons analysé la viabilité cellulaire ainsi que l'activité métabolique des cellules traitées au K252a (figure 34).

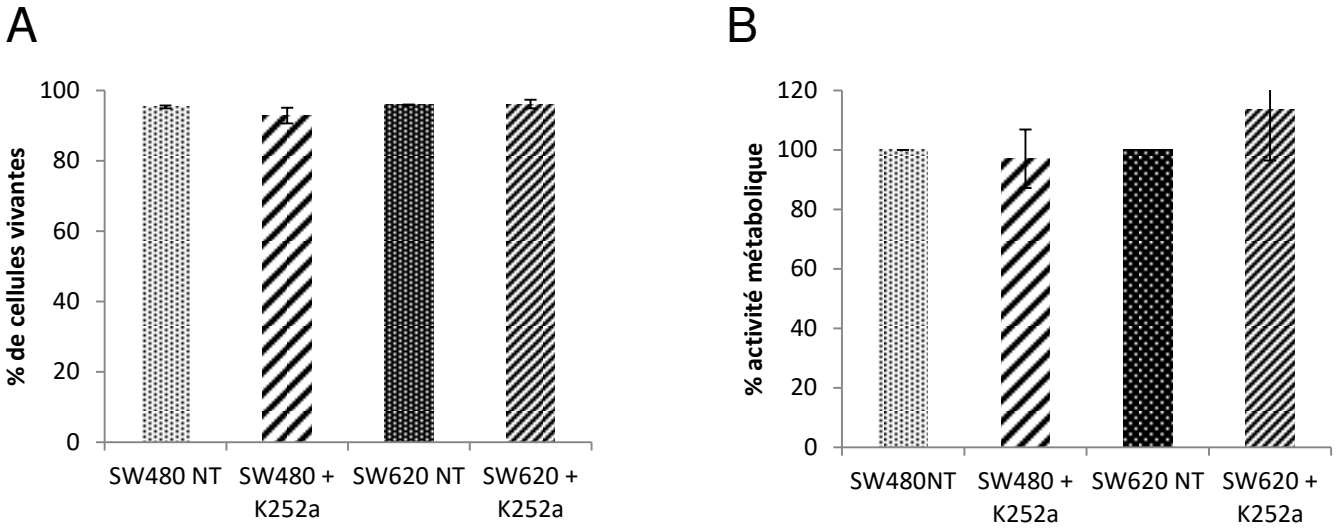


Figure 35 : Effet du K252a sur la viabilité et l'activité métabolique des lignées de CCR. Les cellules de CCR ont été traitées ou non en présence de K252a (3h à 100nM). La viabilité cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux (A). L'activité mitochondriale a été déterminée par le test MTT (B). Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations.

L'inhibition des NTs par le K252a n'entraîne pas de variation de la viabilité cellulaire dans les deux lignées de CCR utilisées après 3h de traitement (Figure 34 A). De la même manière, le K252a n'agit pas sur l'activité métabolique puisqu'aucune variation significative dans les deux lignées n'est observée pandant les 3h de traitement (Figure 34 B). Ces résultats confirment ceux obtenus pour la viabilité. La réponse de la lignée issue de la tumeur primaire (SW480) ne diffère pas de celle de la lignée issue d'un envahissement ganglionnaire (SW620).

Nos résultats ne montrant pas d'atteinte du métabolisme ni de la viabilité cellulaire, il est probable qu'une autre voie de survie soit activée pour contrebalancer l'effet de l'inhibition de la signalisation des NTs.

I-1-6 K252a et induction d'une autophagie fonctionnelle

Suite à l'utilisation du K252a, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de la protéine mTOR, sans perte de viabilité. Cette protéine étant impliquée dans la régulation négative de l'autophagie, nous avons analysé l'effet du K252a sur l'activation de cette voie de survie.

Pour cela, l'expression des protéines Beclin 1, ATG5 et la conversion de LC3I en LC3II ont été évaluées par western blot (figure 35).

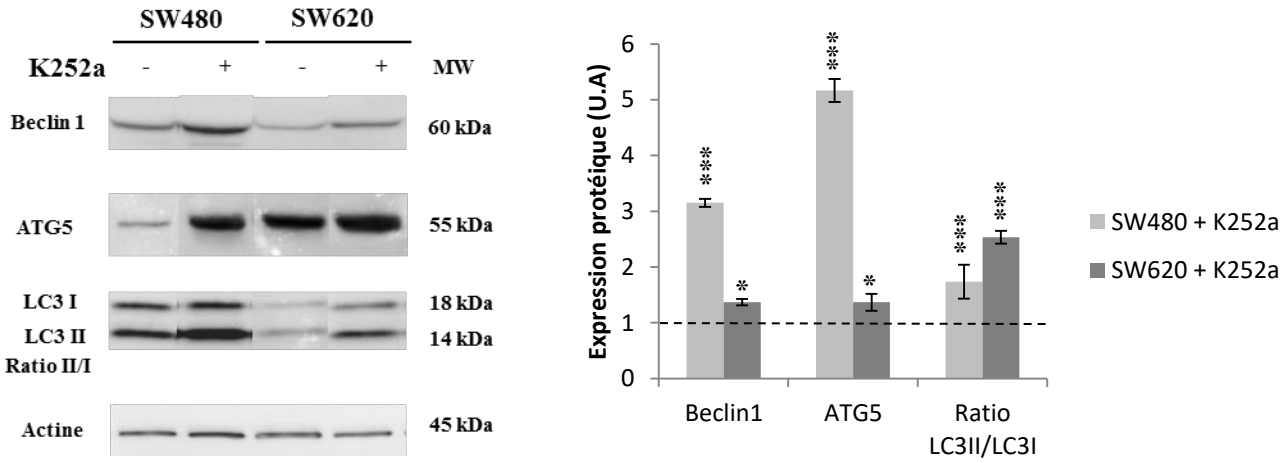


Figure 36 : Effet du K252a sur l'expression protéique d'acteurs autophagiques. L'expression protéique de Beclin1, d'ATG5 et de la LC3 a été évaluée par Western Blot. La densité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont comparés a ceux des cellules non traitées, normalisé à 1, représenté par les pointillés et sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. . * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Une augmentation significative de l'expression de la protéine Beclin1, impliquée dans l'initiation de l'autophagosome, et de l'expression de la protéine ATG5 impliquée dans son élongation a été retrouvée pour les deux lignées. De même, une augmentation du ratio LC3II/LC3I (augmentation significative de la forme LC3-II compléxée à la phosphotydiléthanolamine) démontre l'activation de l'autophagie. Ainsi, le blocage de la signalisation des NTs par le K252a permet l'induction de l'autophagie dans les lignées de CCR. Celle-ci semble être plus importante dans la lignée SW480 (tumeur primaire) que dans

la lignée SW620 (envahissement ganglionnaire), que ce soit au niveau basal ou suite au traitement par le K252a.

La mise en évidence de la forme complexée aux autophagosomes de la protéine LC3 constitue un élément caractéristique de l'activation autophagique. Nous avons donc cherché à confirmer les résultats obtenus par western blot en mettant en évidence par immunofluorescence la présence d'autophagosomes, révélés par la fluorescence de la LC3 endogène, dans les cellules traitées au K252a (figure 36).

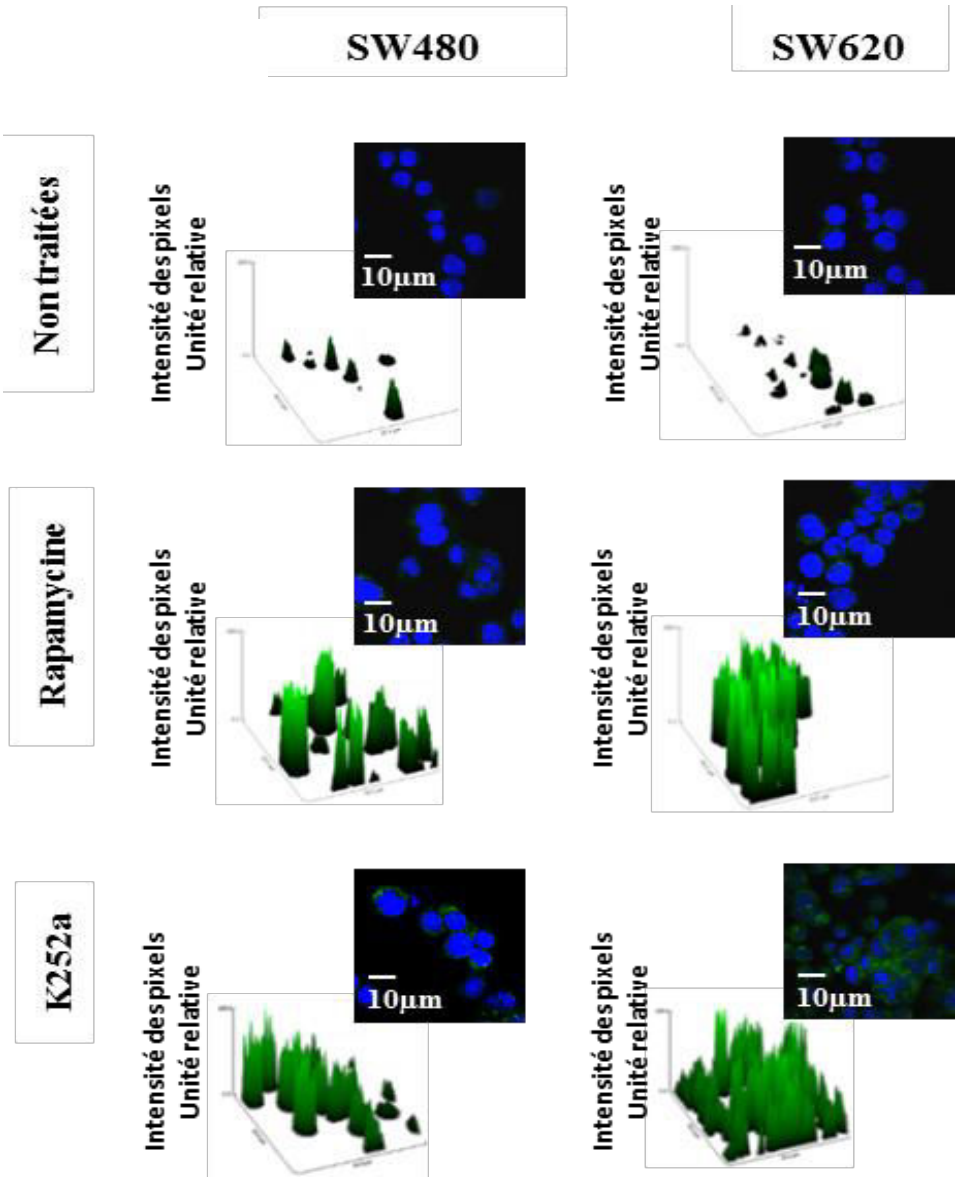


Figure 37 : Effet du K252a sur l'expression de la LC3 endogène. Les cellules ont été traitées ou non avec du K252a (3h, 100nM) ou avec de la rapamycine (3h, 20µM) utilisée comme témoin positif d'induction de l'autophagie. Le marquage de la LC3 endogène a été réalisé à l'aide d'un anticorps couplé à l'alexa fluor 488nm (vert). Les noyaux ont été colorés à l'aide du DAPI (bleu). L'expression relative en 3D de la LC3 est obtenue par « surface plot » réalisée avec le logiciel ImageJ.

Le traitement avec la rapamycine (inducteur de l'autophagie par inhibition de mTOR et utilisé comme témoin positif) induit une forte augmentation de l'expression de la protéine LC3 par rapport à celle observée dans la condition « non traitées » correspondant à l'autophagie basale. Le K252a permet lui aussi d'augmenter nettement cette expression, qui se caractérise par une fluorescence ponctuée, associée aux autophagosomes. Ainsi, l'inhibition de la signalisation des NTs par le K252a permet bien l'induction de l'autophagie.

Pour s'assurer de la fonctionalité du processus autophagique et donc valider notre précédente hypothèse mettant en avant l'activation de l'autophagie, nous avons bloqué le flux en utilisant de la chloroquine. Cette molécule empêche l'activité lysosomale en inhibant l'acidification de ce compartiment. De cette facon, la molécule LC3 II, constituant de l'autophagosome mais également substrat du processus de recyclage, doit être accumulée, ce qui est visible en western blot (figure 37).

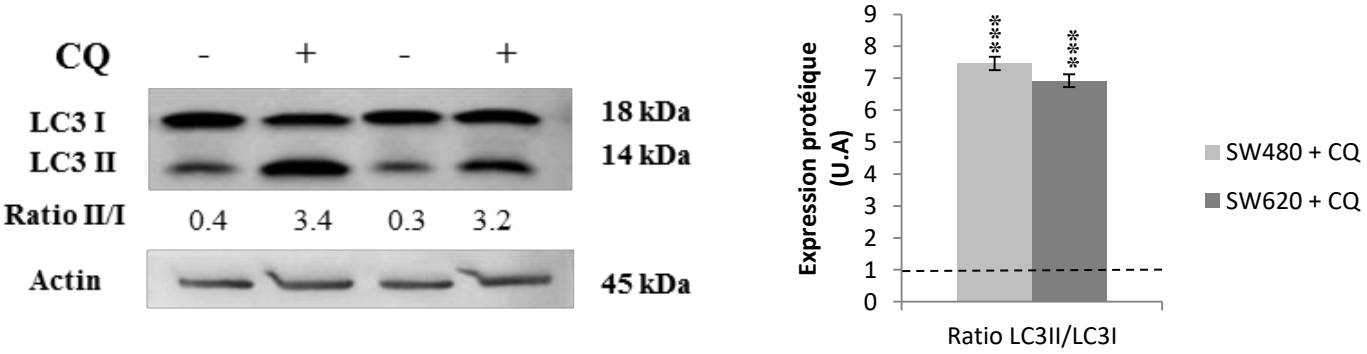


Figure 38 : Effet de la chloroquine sur le flux autophagique des cellules de CCR. L'expression protéique de la LC3 a été évaluée par Western Blot après traitement ou non par la chloroquine (3h, 25µM). La densité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont comparés a ceux des cellules non traitées, normalisé à 1, représenté par les pointillés et sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Le traitement par la chloroquine met en évidence une forte accumulation de la forme LC3II, ce qui permet de s'assurer de la fonctionnalité de l'autophagie dans les 2 lignées.

I-2- Effet de l'inhibition pharmacologique (Chloroquine) et génétique (siRNA ATG5) de l'autophagie dans les lignées de CCR.

Les précédents résultats ont montré que l'inhibition de la signalisation des NTs par l'utilisation du K252a permet d'induire une autophagie fonctionnelle, sans présenter de

modifications du devenir cellulaire. Par conséquent, dans l'objectif de sensibiliser les cellules à la mort, nous avons réalisé une nouvelle approche visant à inhiber l'autophagie pour en observer les conséquences sur la signalisation des NTs et sur le devenir cellulaire.

I-2-1 Validation de l'inhibition de l'autophagie par siRNA ATG5.

La transfection des cellules par siRNA a été réalisée en utilisant l'interférine comme agent transfectant. Nous avons validé notre modèle de siRNA dirigés contre ATG5 par western blot (figure 38).

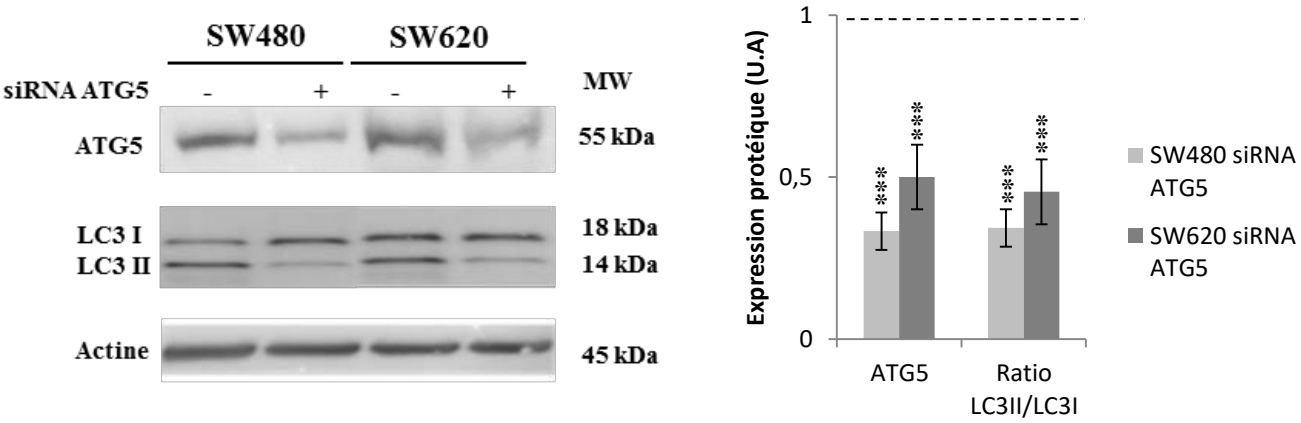


Figure 39 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par siRNA ATG5 sur l'expression protéique d'ATG5 et de LC3. L'expression protéique d'ATG5 et de LC3 a été évaluée par Western Blot après transfection ou non des cellules par siRNA ATG5. La densité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont comparés a ceux des cellules non traitées, normalisé à 1, représenté par les pointillés et sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. . * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

L'inhibition de la protéine ATG5 est effective puisque la transfection provoque une perte d'un facteur 3 pour la lignée SW480 et d'un facteur 2 pour la lignée SW620. De plus, cette inhibition induit une diminution significative dans les deux lignées, du ratio LC3II/LC3I (diminution de la forme LC3II). Ce résultat a été conforté par l'observation au microscope confocal de l'immunomarquage de la protéine LC3 endogène après transfection (figure 39).

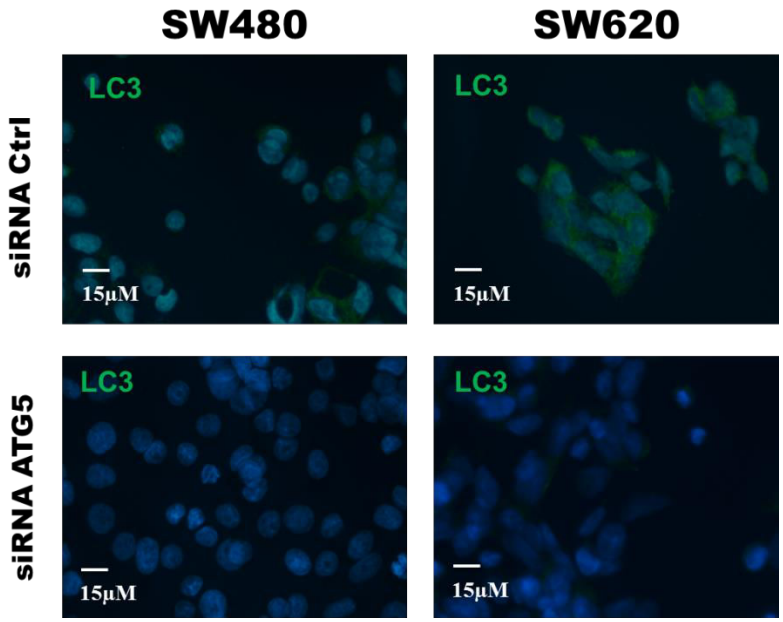


Figure 40 : Détection de la LC3 endogène dans les cellules après transfection par siRNA ATG5. Les cellules ont été transfectées avec des siRNA ATG5 comme décrit dans la section « matériels et méthodes », puis un immunomarquage dirigé contre la LC3 a été réalisé comme décrit précédemment. Le noyau cellulaire a été coloré au DAPI (bleu). La LC3 a été marquée à l'aide d'un anticorps couplé à l'alexa fluor 488nm (vert).

Ainsi, l'utilisation de siRNA ATG5 induit une forte diminution de l'expression de la LC3 endogène dans les lignées de CCR. Par cette double approche, nous avons validé l'utilisation de siRNA ATG5 pour inhiber le processus autophagique.

I-2-2 Inhibition de l'autophagie et devenir cellulaire

Afin de déterminer l'effet sur le devenir cellulaire de l'inhibition de l'autophagie par la CQ ou l'utilisation de siRNA ATG5, nous avons évalué la viabilité et l'activité métabolique des deux lignées cellulaires (figure 40).

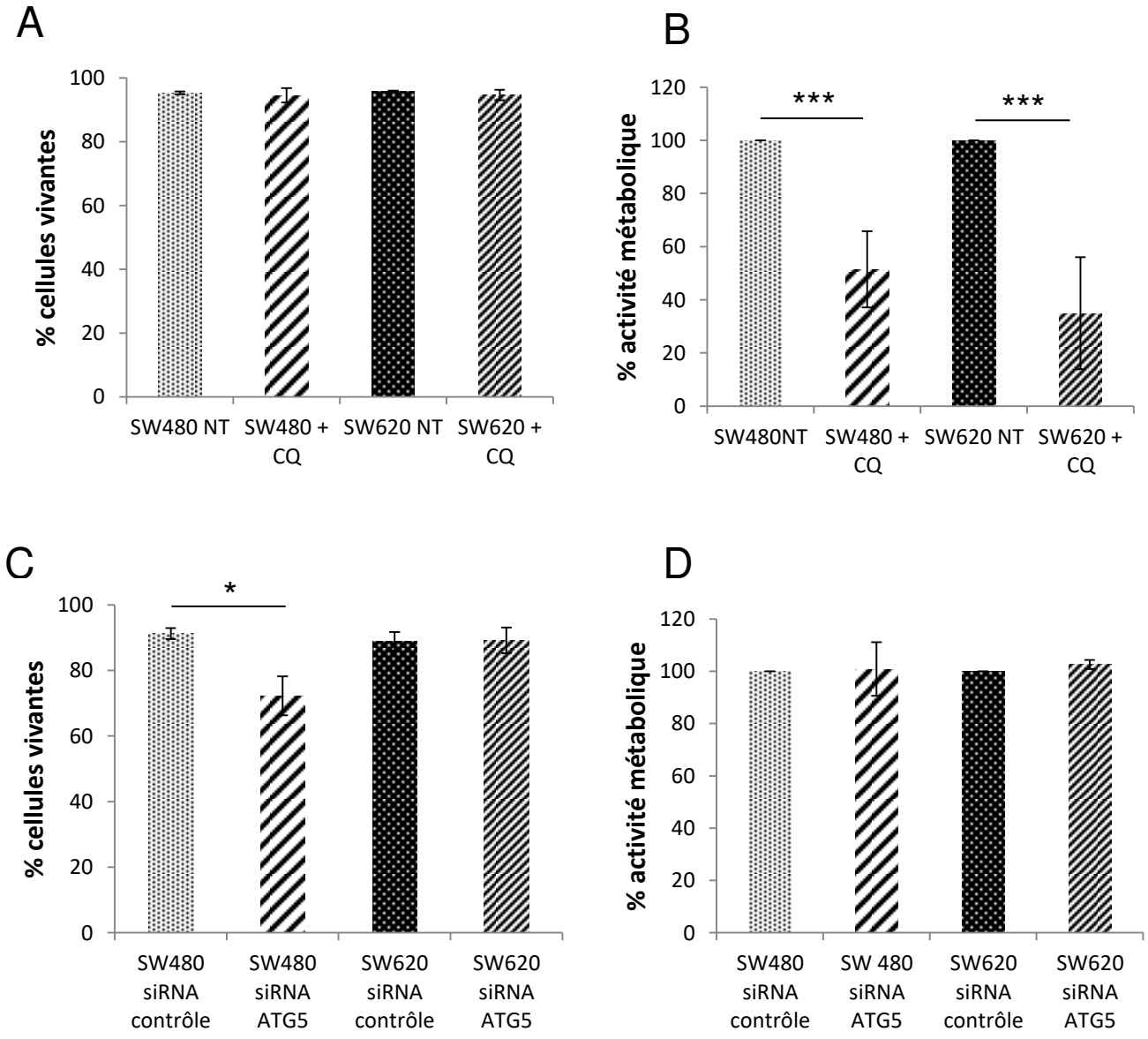


Figure 41 : Effet de la chloroquine et des siRNA ATG5 sur la viabilité et le métabolisme des lignées de CCR. Les cellules de CCR ont été maintenues en culture en présence ou non de CQ (3h , 25µM) (A,B) ou ont été transfectées ou non par siRNA ATG5 (C,D). La viabilité cellulaire (A,C) et l'activité métabolique (B,D) ont été déterminées comme précédemment.

L'inhibition de l'autophagie par la chloroquine pendant 3h à 25µM n'entraîne aucune variation significative de la viabilité cellulaire (figure 40A). Néanmoins, l'activité métabolique

se trouve significativement diminuée : dans les SW480, elle diminue de 50% et de 65% dans les SW620 (figure 40B). Ces résultats montrent donc que la lignée SW620 est plus sensible à la CQ que la lignée originaire de la tumeur primaire en ce qui concerne l'activité métabolique.

La CQ est une molécule connue comme étant toxique pour les lignées cellulaires (Yang et al., 2013). C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé la même analyse en inhibant l'autophagie par siRNA ATG5. Alors que la viabilité cellulaire est altérée au sein de la lignée SW480 (perte de 25% (figure 40 C)), elle n'est pas affectée dans la lignée SW620. D'autre part, l'inhibition de l'autophagie par siRNA ATG5 n'entraîne aucune variation de l'activité métabolique, quelle que soit la lignée considérée (figure 40 D). En conclusion, l'inhibition d'ATG5 rend donc la lignée SW480 plus sensible laissant supposer que l'autophagie est un mécanisme plus important pour la survie des cellules issue de la tumeur primaire.

Ces résultats révèlent une altération importante de l'activité métabolique lorsque les cellules sont traitées avec la CQ. Celle-ci n'est pas retrouvée avec les siRNA, ce qui laisse penser qu'elle n'est pas en lien directe avec l'inhibition de l'autophagie mais plutôt avec l'utilisation de la CQ elle même. De plus, la viabilité cellulaire étant peu diminuée, cela suppose qu'une autre voie de survie pourrait être impliquée dans la survie cellulaire. Nous nous sommes alors intéressés à la signalisation neurotrophique lors de l'inhibition de l'autophagie.

I-2-3 Inhibition de l'autophagie et transcrits TrkB, BDNF, p75^{NTR} et sortiline.

Les précédents résultats ont révélé que la viabilité cellulaire est peu diminuée lorsque l'autophagie est inhibée. Cela suppose qu'une autre voie pourrait être impliquée dans la survie cellulaire. Nous nous sommes alors intéressés à la signalisation neurotrophique lors de l'inhibition de l'autophagie. Pour cela, nous avons analysé par PCR quantitative l'expression des transcrits codant les NTs lorsque les cellules sont traitées par la CQ (figure 41).

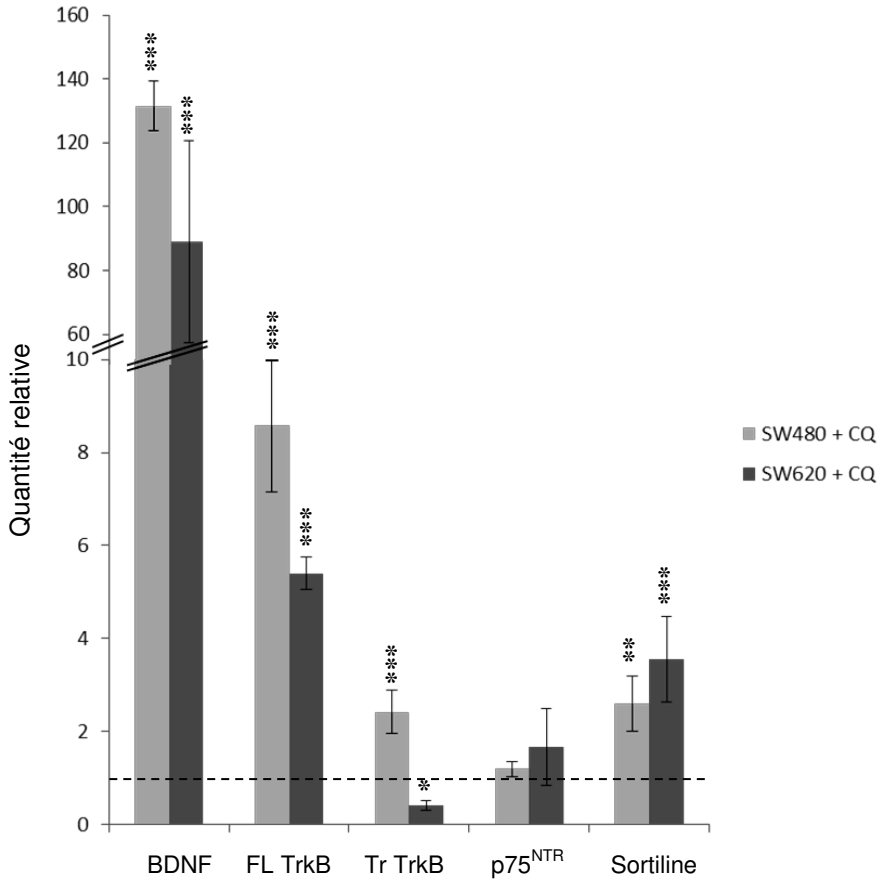


Figure 42 : Effet de la CQ sur l'expression des transcrits codant BDNF, TrkB, p75^{NTR}et de la sortiline. Les cellules de CCR ont été traitées ou non avec la CQ (3h, 25µM) puis récupérées comme décrit dans la section « matériels et méthodes ». L'expression des transcrits codant BDNF, TrkB145 (FL), TrkB95 (Tr), p75^{NTR} et la sortiline a ensuite été évaluée par RT-PCR quantitative et analysée comme précédemment.

Le blocage du flux autophagique par la CQ entraîne de nombreuses variations d'expression des transcrits codant les NTs. Le transcrit codant BDNF est très fortement augmenté dans les deux lignées puisqu'il passe de 1 à 125 unités relatives pour la lignée SW480 et de 1 à 85 unités relatives pour la lignée SW620. Le taux de transcrit codant TrkB145 (forme entière et fonctionnelle notée FL) augmente significativement dans les deux lignées alors que le taux de transcrit codant TrkB95 (forme tronquée notée Tr) varie de façon opposée dans les 2 lignées (augmentation dans les SW480 et diminution dans les SW620). Le transcrit codant le $p75^{NTR}$ ne montre aucune variation alors que, le transcrit codant la sortiline est augmenté significativement dans les deux lignées. Les variations impliquant BDNF et son récepteur fonctionnel (FL TrkB) laissent penser à la mise en place d'une signalisation en aval du couple TrkB/BDNF.

I-2-4 Inhibition de l'autophagie et protéines TrkB, BDNF : expression et localisation.

Nous avons recherché par western blot l'expression des protéines de l'axe TrkB/BDNF lorsque l'autophagie est inhibée par la CQ ou par siRNA ATG5 dans les deux lignées de CCR (figure 42).

A

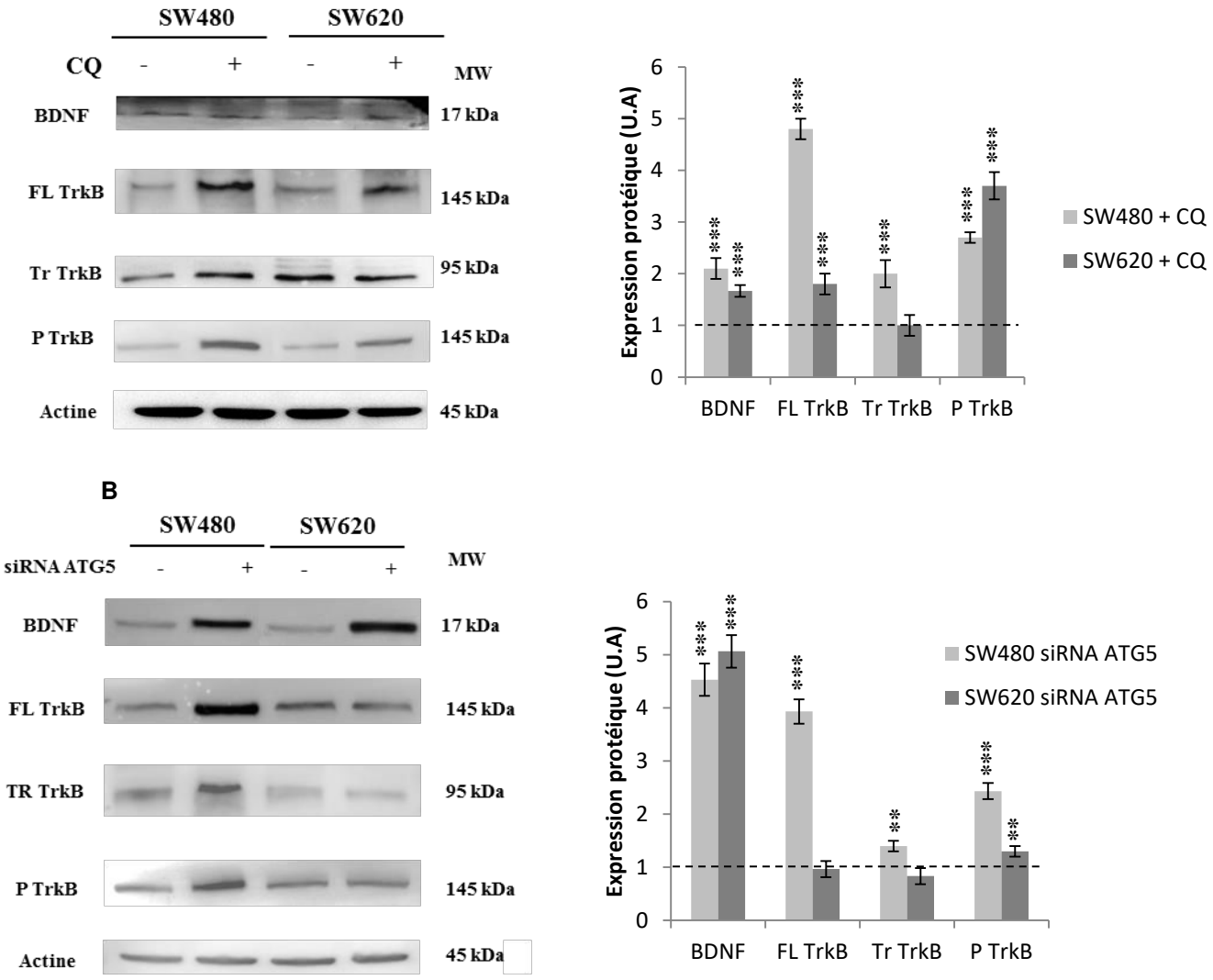


Figure 43 : Effet de l'inhibition de l'autophagie sur l'expression protéique des NTs. Les expressions protéiques de BDNF, TrkB et Phospho-TrkB ont été évaluées par Western Blot soit après avoir traité les cellules à la CQ (A ; 25µM, 3h) soit après avoir transfecté les cellules par le siRNA ATG5 (B). La densité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. Les résultats statistiques sont comparés aux cellules non traitées normalisés à 1 et représenté par les pointillés. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

L'inhibition de l'autophagie que ce soit par la CQ ou le siRNA ATG5 induit une augmentation significative de l'expression de BDNF. Ce résultat est corrélé à l'augmentation d'expression de la forme complète du récepteur TrkB (FL TrkB) dans les deux lignées, alors que la forme tronquée n'augmente de façon significative que dans la lignée SW480. De plus, l'augmentation significative de la forme phosphorylée du récepteur laisse supposer son activation. Ces résultats sont reproduits avec les deux types d'inhibition, ce qui renforce l'idée que le blocage de l'autophagie potentialise l'axe TrkB/BDNF.

Comme le western blot concernant BDNF nous renseigne seulement sur la part intracellulaire de cette NT, un dosage du BDNF dans le milieu de culture a été réalisé par ELISA lorsque les cellules sont cultivées en présence de CQ (figure 43).

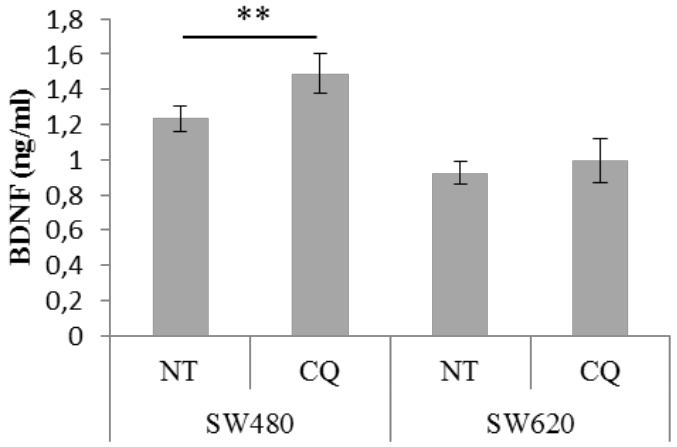


Figure 44 : Sécrétion du BDNF dans les surnageants des cellules traitées à la CQ. La sécrétion de BDNF a été évaluée par la méthode ELISA dans le surnageant de culture des lignées SW480 et SW620 après traitement ou non avec la CQ (3h, 25µM). Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Le traitement par la CQ induit une sécrétion plus importante de BDNF dans la lignée SW480. Ces résultats, associés à ceux montrant l'augmentation de la phosphorylation de TrkB dans la lignée SW480 (figure 42), suggèrent que la fixation du ligand enclenche la signalisation en aval. La lignée SW620 ne présente quant à elle, pas de variation significative de la sécrétion du BDNF extracellulaire, ce qui souligne la différence entre les deux lignées. Nous avons alors évalué par immunomarquage (en microscopie confocale) la fixation de BDNF sur TrkB lorsque l'autophagie est inhibée soit par la CQ soit par siRNA ATG5 (figure 44). Des résultats semblables ont été obtenus dans les deux cas.

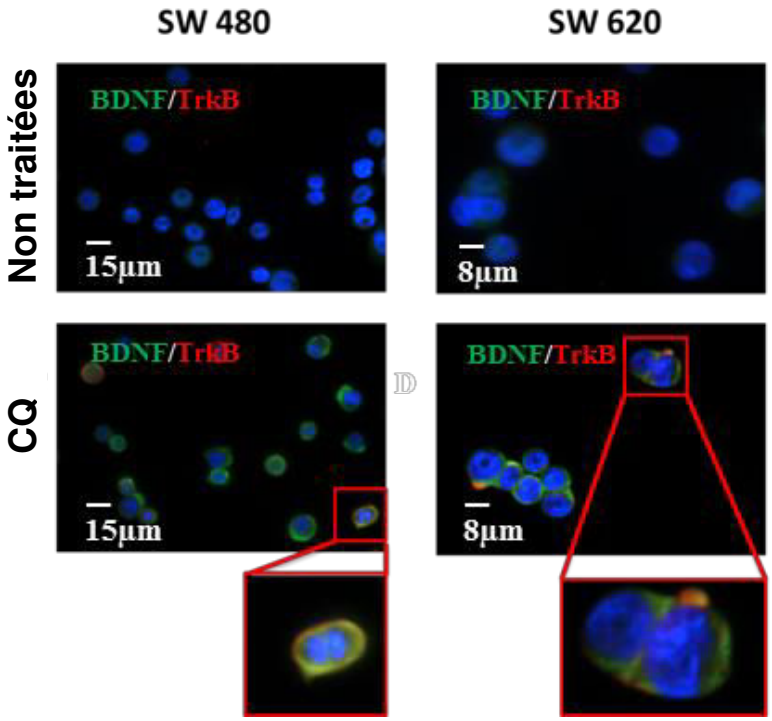


Figure 45 : Effet de la CQ sur la localisation de BDNF et de TrkB dans les SW480 et les SW620. Les cellules ont été traitées ou non avec la CQ pendant 3h à 25µM, puis un immunomarquage a été réalisé comme décrit dans la section « matériel et méthode ». Le noyau cellulaire a été coloré avec du DAPI (bleu). Le BDNF a été marqué à l'aide d'un anticorps couplé à l'alexa fluor 488nm (vert) et son récepteur TrkB par un alexa fluor 594nm (rouge).

L'augmentation de la quantité de BDNF et de TrkB dans les cellules traitées par la CQ confirme les résultats déjà obtenus. De plus, les deux acteurs sont retrouvés au niveau de la membrane plasmique et sont colocalisés, particulièrement dans la lignée SW480. Ainsi, le BDNF se fixe sur son récepteur TrkB et entraîne son activation comme démontré précédemment (figure 42).

Pour conforter cette observation, nous avons réalisé le marquage de la forme phosphorylée du TrkB dans les modèles cellulaires traités avec la chloroquine (figure 45).

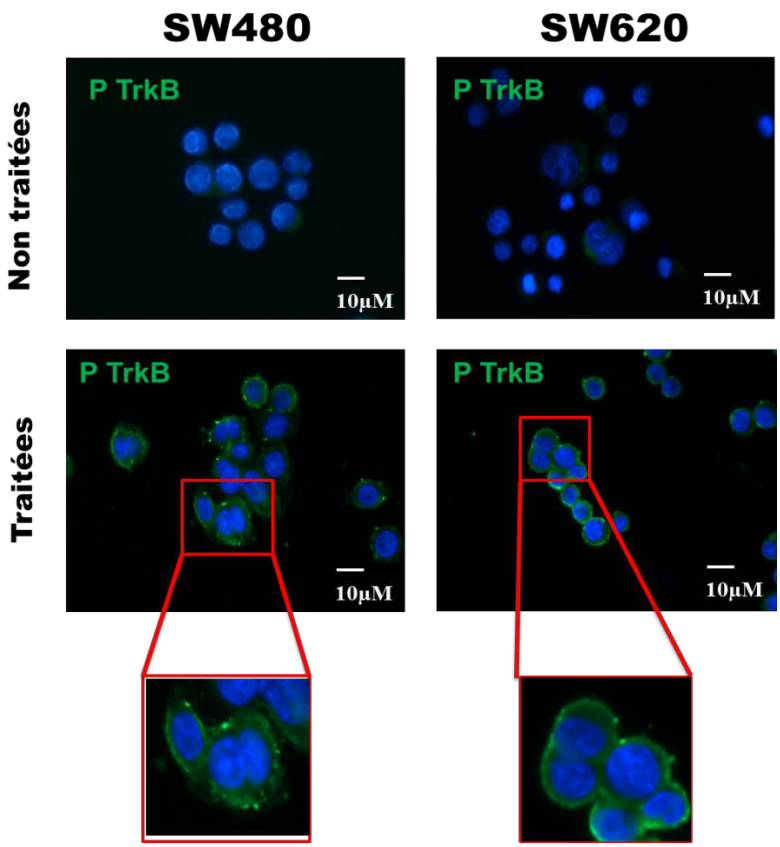


Figure 46 : Effet de la CQ sur la localisation du phospho TrkB après traitement des cellules de CCR à la CQ. Après avoir traité ou non les cellules de CCR avec la CQ (3h, 25µM), un immunomarquage a été réalisé comme décrit dans la section « matériels et méthodes ». L'observation a été réalisée au microscope confocal. Le noyau cellulaire a été coloré au DAPI (bleu). Phospho TrkB a été marqué à l'aide d'un alexa fluor 488nm (vert).

L'expression de la forme phosphorylée de TrkB est effectivement augmentée après traitement dans les deux lignées, comme observé par western blot. De plus, nos résultats montrent que le marquage de phospho TrkB est ponctiforme et qu'il se situe préférentiellement au niveau membranaire laissant supposer qu'il s'agit de la forme fixée au BDNF.

I-2-5 Inhibition de l'autophagie et signalisation PI3K/AKT/mTOR médiée par le couple TrkB/BDNF.

Après avoir analysé et montré les évènements membranaires associés à l'activation de TrkB par BDNF, nous avons recherché par western blot l'état d'activation des protéines liées à la signalisation PI3K/AKT quand l'autophagie est inhibée soit par le CQ, soit par siRNA ATG5 (figure 46).

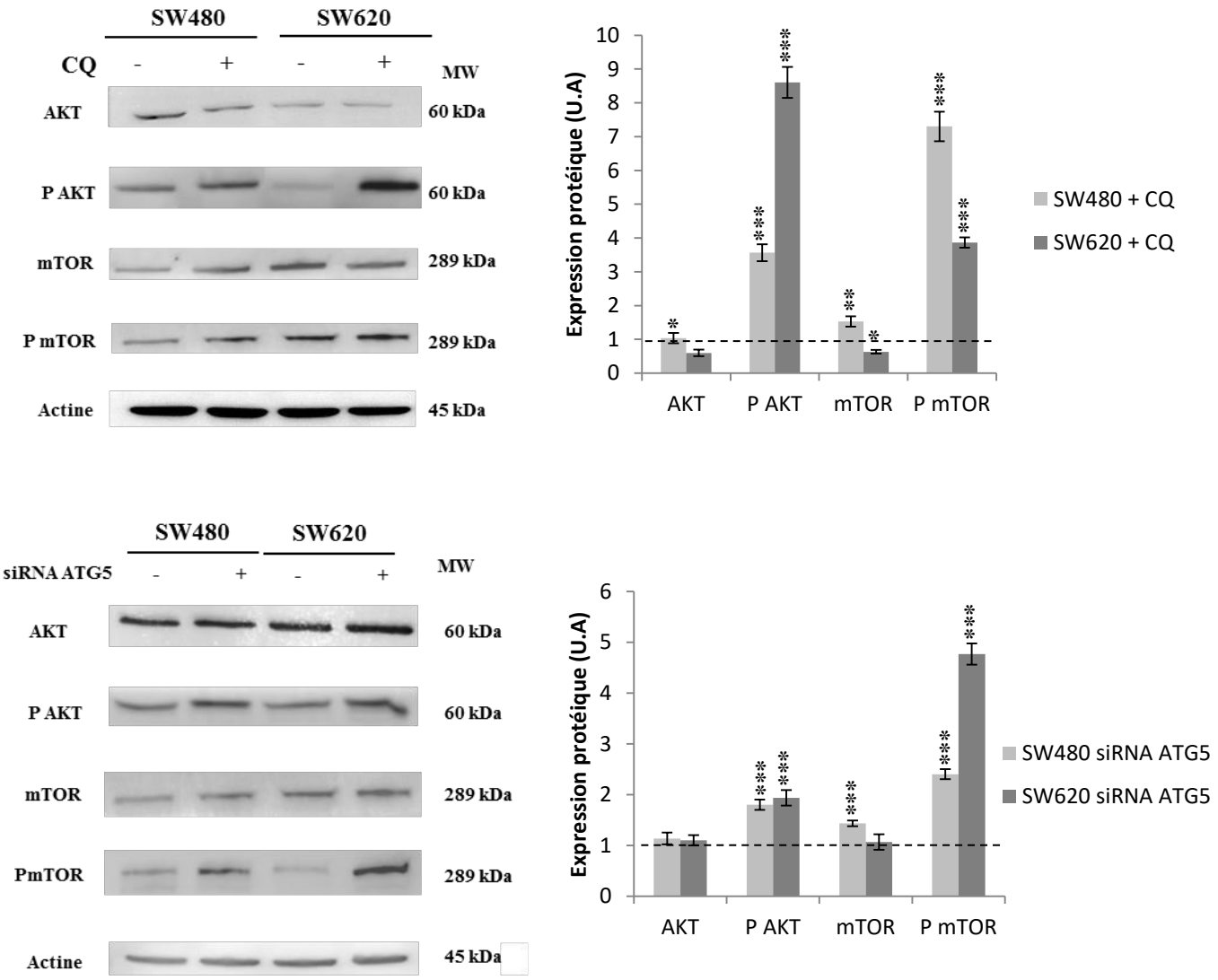


Figure 47 : Effet de l'inhibition de l'autophagie sur l'expression protéique de la voie AKT/mTOR. Les expressions protéiques d'AKT, phospho AKT, mTOR et phospho mTOR ont été évaluées par Western Blot, soit après avoir traité les cellules à la CQ (A ; 25µM, 3h) soit après avoir transfecté les cellules par le siRNA ATG5 (B).. La densité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont comparés a ceux des cellules non traitées, normalisé à 1, représenté par les pointillés et sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Lorsque l'autophagie est inhibée, que ce soit par l'utilisation de la CQ ou par siRNA ATG5, les formes phosphorylées de la protéine AKT et de mTOR sont significativement augmentées dans les deux lignées. Par conséquent, l'inhibition de l'autophagie permet d'activer la voie de signalisation AKT en aval du couple TrkB/BDNF.

I-3- Etude et effets de la double inhibition neurotrophines/autophagie dans les lignées de CCR.

L'ensemble des résultats obtenus a démontré que l'inhibition des NTs permet d'induire l'activation du mécanisme autophagique. L'inverse a aussi été observé. Il existerait donc une relation entre ces deux signalisations, notamment établie par le nœud de signalisation mTOR de sorte à assurer la survie des cellules de CCR. Néanmoins, l'inhibition séparée de ces deux voies a montré l'incapacité à induire la mort cellulaire. Par conséquent, notre étude a été poursuivie par l'analyse des effets d'une inhibition simultanée des NTs et de l'autophagie.

I-3-1 Effet de la double inhibition sur la sécrétion de BDNF

Nous nous sommes interessés à la formation du complexe TrkB/BDNF lors de la double inhibition pharmacologique des deux voies de survie. Pour cela, nous avons évalué la secrétion de BDNF par ELISA dans le milieu de culture (figure 47).

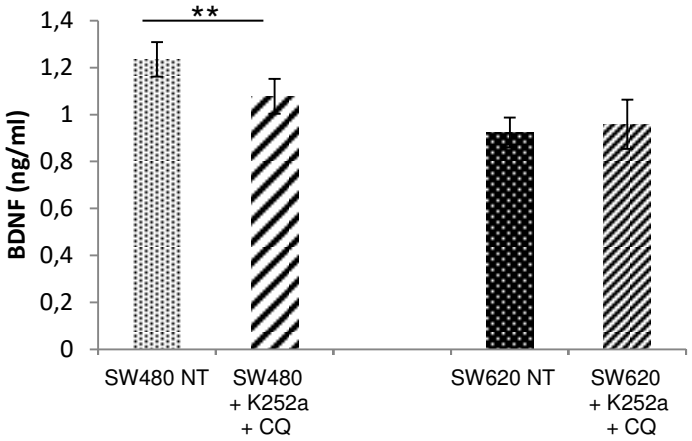


Figure 48 : Effet de la double inhibition sur la sécrétion du BDNF extracellulaire dans les surnageants de culture. La sécrétion de BDNF a été évaluée par la méthode ELISA dans le surnageant de culture des lignées SW480 et SW620 après traitement simultané avec le K252a (100 nM) et la CQ (25 µM) pendant 3h comme précédemment.

Après 3h de traitement, la sécrétion de BDNF diminue de façon significative dans les SW480. L'une des raisons peut être la fixation du ligand sur le récepteur TrkB. En revanche, le taux de BDNF ne varie pas dans le milieu de culture des SW620.

I-3-2 Effet de la double inhibition sur la localisation de BDNF et de TrkB

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons recherché par immunofluorescence indirecte l'expression et la localisation de TrkB et BDNF dans les cellules doublement traitées (figure 48).

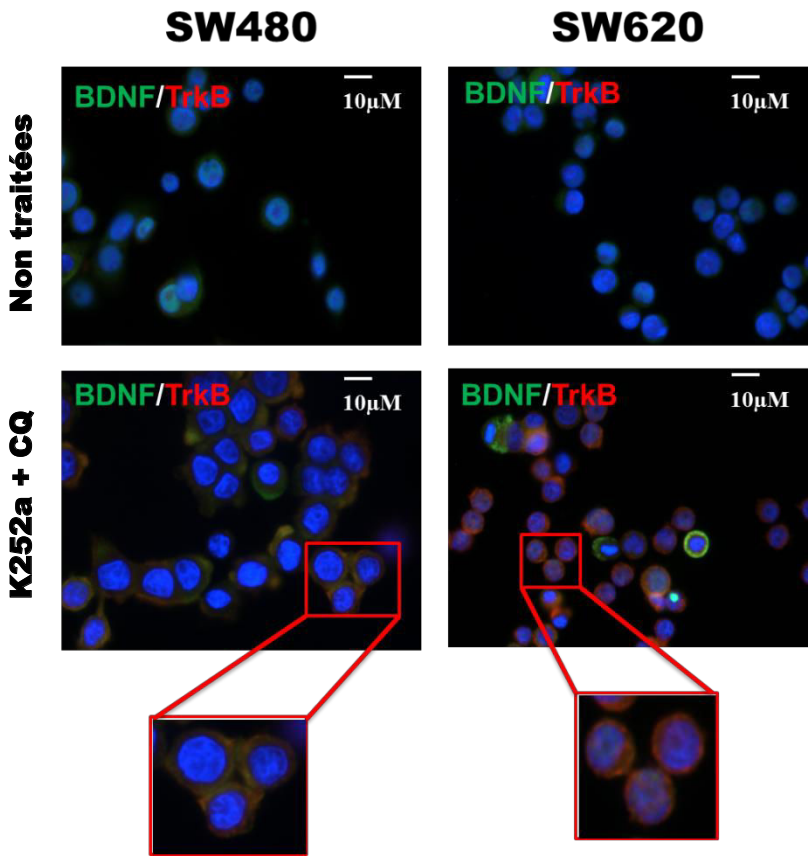


Figure 49 : Effet de la double inhibition (K252a + CQ) sur la localisation du BDNF et du TrkB dans les cellules de CCR. Après traitement simultané ou non des cellules de CCR par le K252 (100nM) et la CQ (25µM) pendant 3h, un immunomarquage a été réalisé comme décrit dans la section « matériels et méthodes ». L'observation a été réalisée au microscope confocal. Le noyau cellulaire a été coloré au DAPI (bleu). Le BDNF a été marqué à l'aide d'un alexa fluor 488nm (vert) et son récepteur TrkB par un alexa fluor 594nm (rouge).

Nous observons une augmentation d'expression de la NT et de son récepteur, comme c'était le cas lors des simples traitements. En revanche, les deux acteurs ne semblent être colocalisés au niveau membranaire que dans la lignée SW480.

I-3-3 Effet de la double inhibition sur le devenir cellulaire

Les données précédentes montrent que les traitements seuls (K252a ou CQ) n'empêchent pas la fixation du BDNF sur TrkB et n'induisent pas de variations importantes du devenir cellulaire. Dans la suite du travail, nous avons recherché les effets de la double inhibition sur la survie des cellules de CCR pour 2 temps de traitements : 3 et 72h (figure 49).

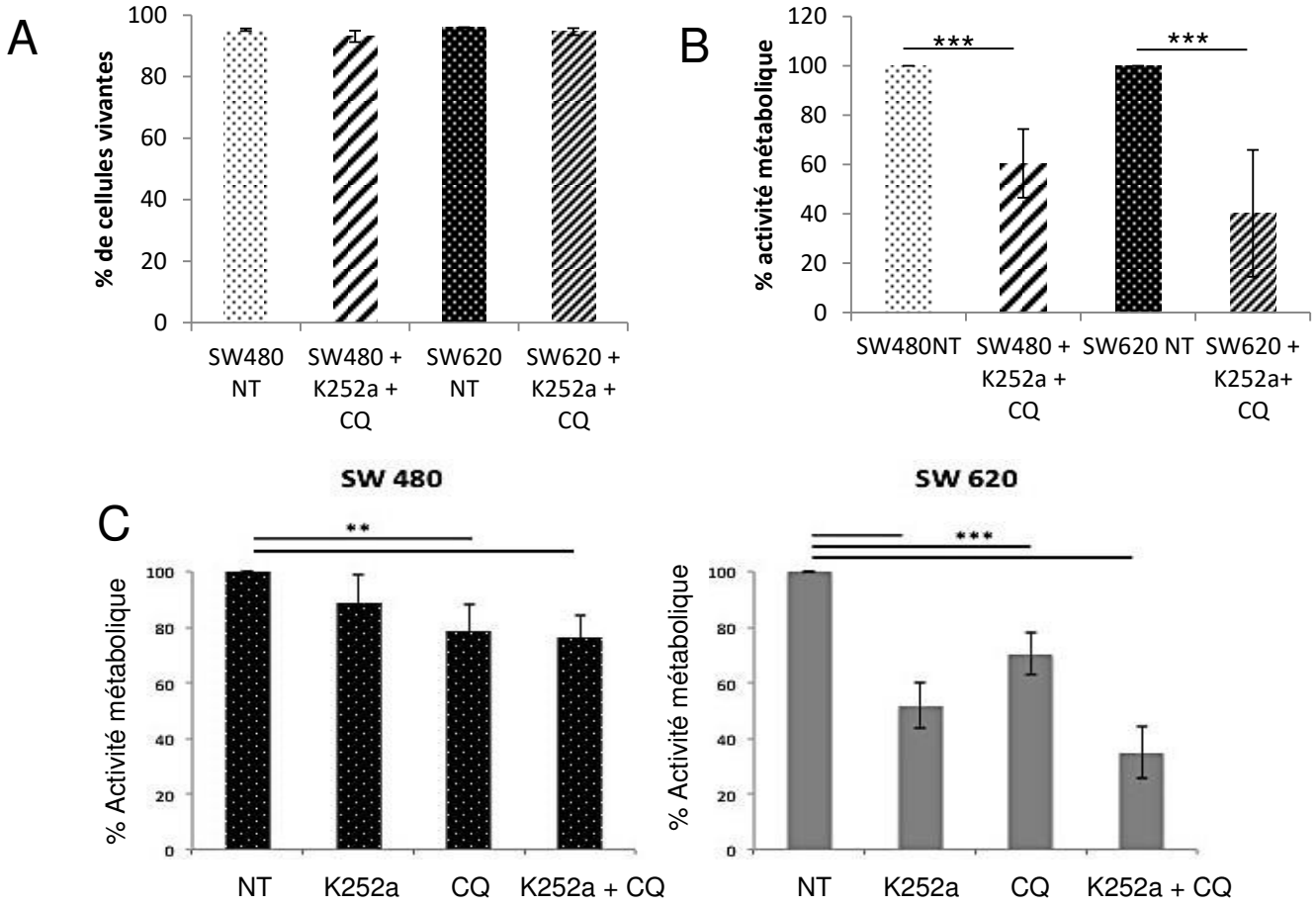


Figure 50 : Effet de la double inhibition des neurotrophines et de l'autophagie sur la viabilité et l'activité métabolique des lignées de CCR après 3h ou 72h de traitement. Les cellules de CCR ont été maintenues en culture en présence ou non de K252a (100nM) et/ou de CQ (25µM). La viabilité cellulaire (A) a été déterminée par incorporation d'iodure de propidium en CMF et l'activité métabolique (B pour 3h ; C pour 72h) par MTT. Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

L'inhibition simultanée des NTs par le K252a et de l'autophagie par la CQ n'entraîne pas de modifications significatives au niveau de la viabilité cellulaire pour un traitement de 3h, quelle que soit la lignée considérée. Cependant, la double inhibition réalisée pendant le même temps modifie de manière significative l'activité métabolique. En effet, celle-ci chute de 40% dans la lignée SW480 et de 60% dans la lignée SW620. Cette variation étant plus importante dans la lignée SW620 laisse supposer que cette dernière est plus sensible au double traitement après seulement 3h de traitement.

Le temps de traitement relativement court pourrait être à l'origine de l'absence d'effet visible sur la viabilité cellulaire alors que l'activité métabolique est, elle, affectée. Nous avons alors répété ces analyses lors d'un double traitement de 72h.

Alors que 72h de traitement au K252a seul ne modifie pas l'activité métabolique dans la lignée SW480, les traitements avec la CQ seule ou avec K252a & CQ la réduisent de manière significative (diminution de 22% et 25% respectivement). Cette dernière est fortement altérée dans la lignée SW620, quel que soit le traitement considéré après 72h pour atteindre une diminution d'environ 70% dans le cas du double traitement. Par conséquent, dans les deux lignées, l'utilisation du double traitement induit une diminution de l'activité métabolique et donc une altération du comportement cellulaire.

I-3-4 Conséquences du renouvellement (24h) des différents traitements sur l'activité métabolique à 72h.

La demi vie du K252a reste aujourd'hui inconnue. Celle de la CQ est de 46h chez l'animal (Moore et al., 2011). In vitro, et du fait de l'absence du métabolisme par les organes, la demi vie de la CQ demeure inconnue. Ces deux molécules, K252a et CQ, pourraient être dégradées lors de la cinétique d'utilisation. Aussi, une évaluation de leurs effets après renouvellement de celles-ci toutes les 24h dans le milieu de culture cellulaire a été recherchée (figure 50).

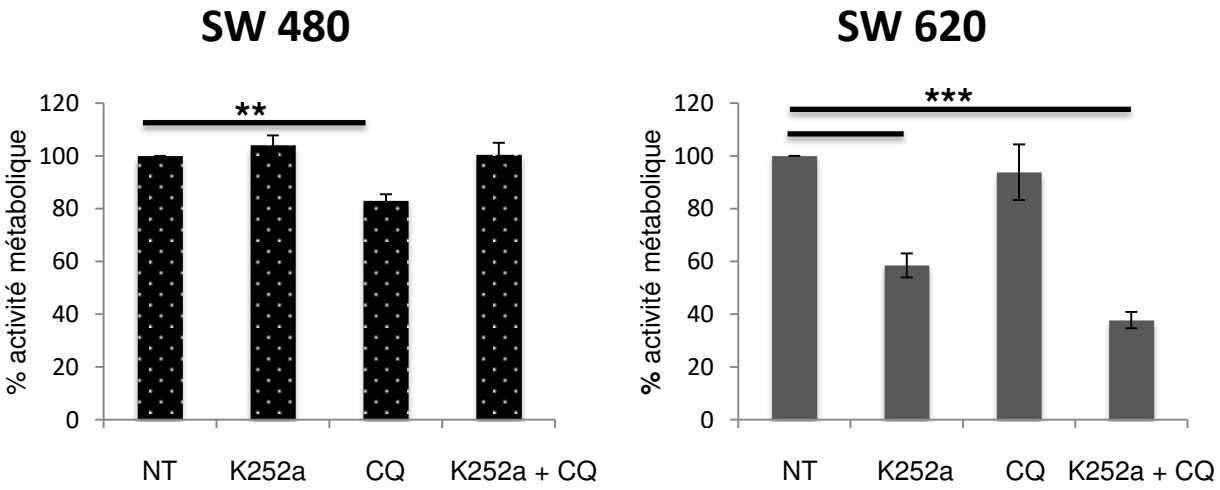


Figure 51 : Effet des traitements à 72h du K252a et/ou de la CQ après renouvellement des molécules toutes les 24h sur l'activité métabolique des cellules de CCR. Les cellules de CCR ont été traitées ou non avec du K252a (100nM) et/ou de la CQ (25µM). Les différents traitements ont été renouvelés quotidiennement. L'activité métabolique a été mesurée par MTT. Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Le renouvellement des différentes molécules de traitement (K252a et CQ) toutes les 24h n'induit pas de variations majeures en terme de métabolisme cellulaire. L'efficacité des molécules est donc la même quelque soit le mode d'administration utilisé. Par conséquent, les expérimentations ultérieures ont été menées après ajout des molécules en une seule fois.

I-3-5 Effet des traitements sur l'apoptose cellulaire

En parallèle, le clivage de la protéine PARP a été recherché par western blot dans les cellules traitées par la double inhibition (figure 51), afin d'évaluer l'effet des traitements pendant 72h sur l'apoptose.

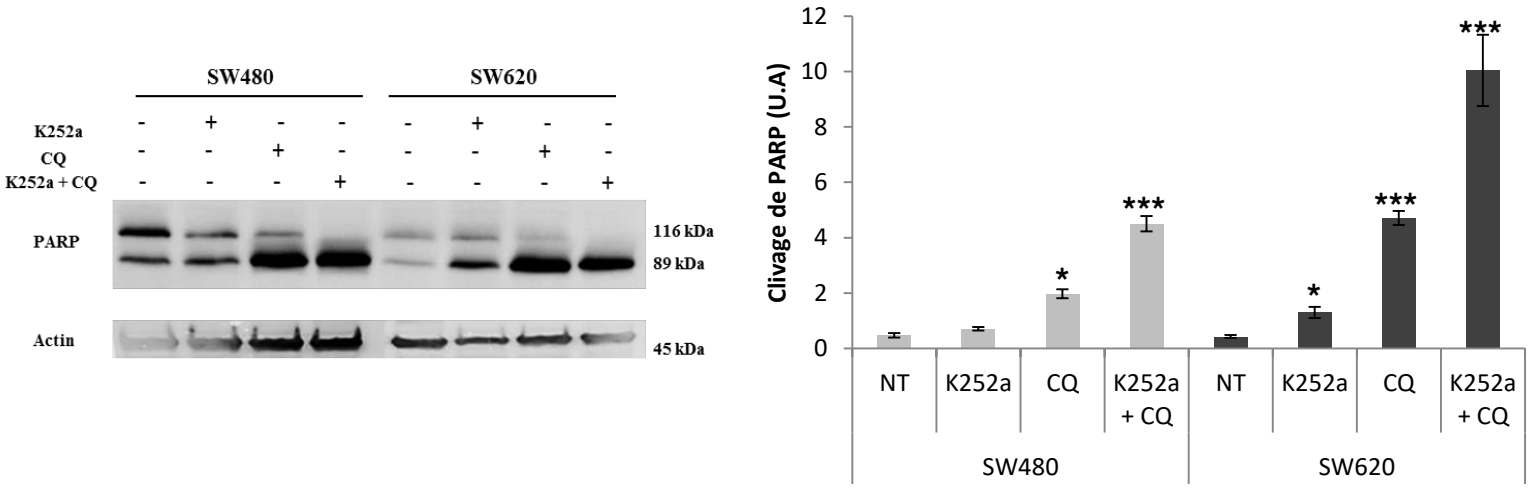


Figure 52 : Effet de l'inhibition simultanée des neurotrophines et de l'autophagie sur le clivage de la PARP, dans les lignées de CCR après 72h de traitement. Les cellules de CCR ont été traitées ou non le K252a, (100nM), ou la CQ (25µM) ou les deux simultanément. Le clivage de la PARP a été évalué par Western Blot. La densité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont comparés à ceux des cellules non traitées et sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. . * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Le clivage de la protéine PARP, servant à évaluer l'induction de l'apoptose, est significativement induit dans les deux lignées après traitement à la CQ. De plus, dans le cas de la double inhibition le clivage de la PARP est aussi augmenté significativement et de manière plus importante (0,5 vs 4,5 pour SW480 et 0.5 vs 10 pour SW620). Ces résultats démontrent que l'utilisation simultanée des deux molécules améliore l'effet observé lors des simples traitements (K252a ou CQ).

Dans le but de confirmer les variations du clivage de la PARP, nous avons réalisé une analyse de l'apoptose et de la nécrose par un test à l'annexine V en présence d'IP, dans les lignées cellulaires traitées (figure 52).

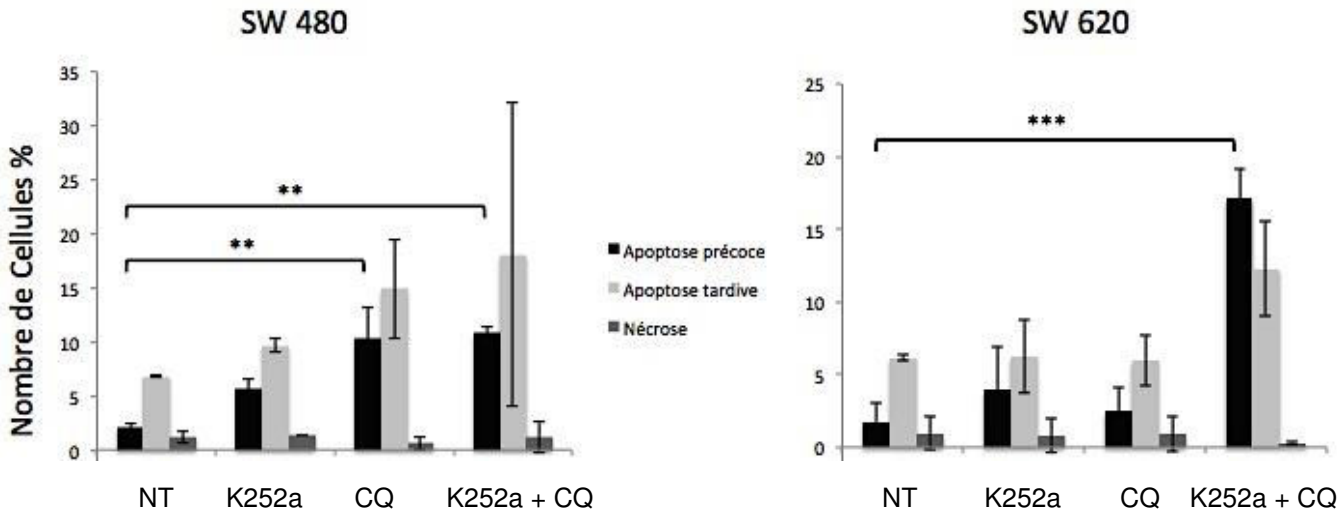


Figure 53 : Effets de l'inhibition de l'autophagie et de la signalisation neurotrophique sur l'apoptose et la nécrose. Les cellules de CCR ont été maintenues en culture en présence ou non de K252a seul (72h, 100nM), de CQ seule (72h, 25µM) ou des deux molécules. L'apoptose précoce et tardive a été mesurée par cytométrie en flux à l'aide du test à l'Annexine V comme décrit dans la partie « matériels et méthodes ». Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Dans la lignée SW480, les traitements avec la CQ et le double traitement K252a+CQ augmentent significativement l'apoptose précoce (augmentation de 4% et 10% respectivement). Dans la lignée SW620, seule l'apoptose précoce est modifiée après le double traitement au K252a+CQ (augmentation de 10%). Ces résultats suggèrent que la réalisation de la double inhibition permet d'induire la mort cellulaire dans les deux lignées et par conséquent démontrent que l'utilisation simultanée des molécules permet de potentialiser leurs effets *in vitro*.

Puisque le traitement simultané avec des deux molécules (K252a et CQ) améliore l'effet de leur utilisation seule, l'étape suivante de cette étude a été d'étudier leurs effets *in vivo*.

PARTIE II : APPROCHE *IN VIVO* DES INHIBITIONS NEUROTROPHIQUE ET AUTOPHAGIQUE. MISE EN EVIDENCE DE CES SIGNALISATIONS CHEZ LES PATIENTS.

I-1- Effet de l'inhibition des neurotrophines et de l'autophagie sur la croissance tumorale dans le modèle murin Nude

I-1-1 Mise en place de greffes sous cutanées dans le modèle murin Nude

Des greffes orthotopiques sous cutanées des deux lignées cellulaires sur le modèle murin Nude ont été réalisées. Pour la mise au point du modèle, nous avons choisi de greffer deux quantités de cellules: 500000 ou 10^6 cellules (figure 53).

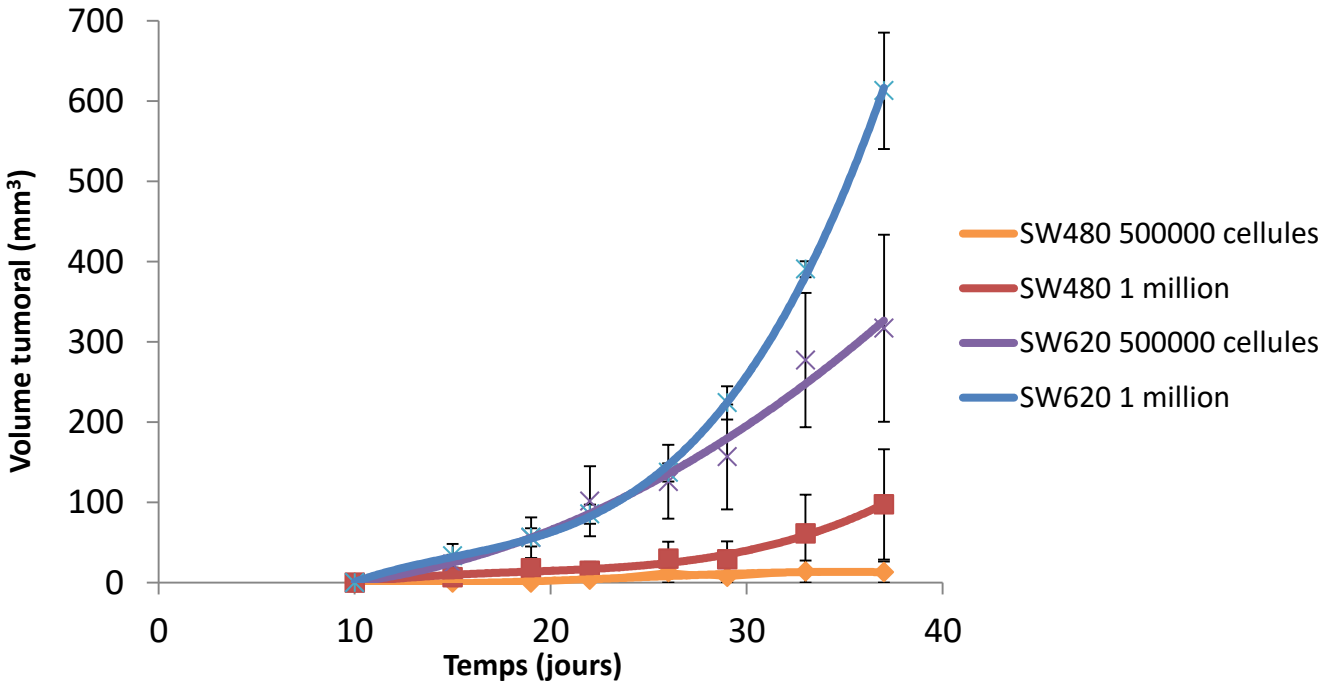


Figure 54 : Analyse de la croissance tumorale sur le modèle murin Nude après réalisation de greffes sous cutanées de cellules de CCR. 500 000 et 1 million de cellules ont été greffées en sous cutané sur le modèle murin Nude. La croissance tumorale a été suivie tous les deux jours et le volume tumoral a été déterminé selon la formule [L×W (L+W)] π/12 où L correspond à la longuieur et W à la largeur des tumeurs. Chaque groupe était constitué de 5 animaux.

Nos résultats mettent en évidence que l'apparition d'une tumeur nécessite un délai compris entre 10 et 15 jours. Quelle que soit la quantité de cellules greffées (500 000 ou 1 million), la lignée SW480 présente un volume plus faible que celui obtenu avec la lignée SW620 (98mm^3 vs 612mm^3 dans la condition 1 million de cellules).

A l'issue des 38 jours de suivi tumoral, les animaux ont été sacrifiés et nous avons réalisé une analyse histologique des tumeurs. En particulier, la recherche de l'antigène Ki67 (marqueur de prolifération) et du CD31 (marqueur des cellules endothéliales) a été effectuée par immunohistochimie (figure 54).

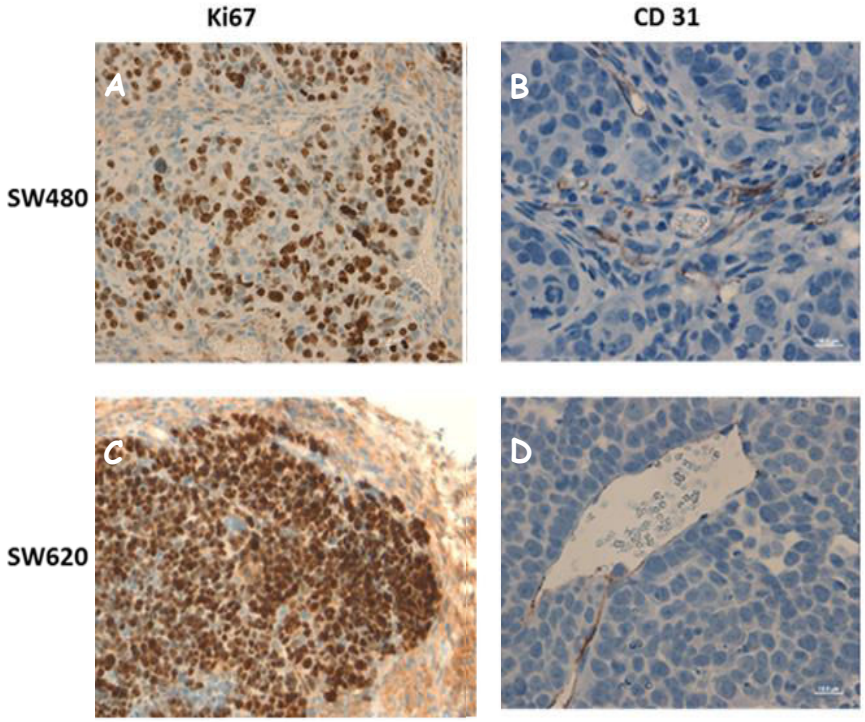


Figure 55 : Etude de la prolifération (Ki67) et de la vascularisation (CD31) dans des tumeurs obtenues après greffe sous-cutanée de cellules de CCR sur souris Nude. Les cellules de CCR ont été greffées en sous cutané sur le modèle murin Nude. La croissance tumorale a été suivie puis les tumeurs ont été analysées par immunohistochimie. Les marquages au Ki67 (A, C) et au CD31 (B, D) ont été effectués.

Le marquage nucléaire du Ki67 est fortement présent dans les deux types de tumeur, mais plus particulièrement dans les tumeurs obtenues par greffe de cellules SW620 (Figure C) par rapport à la lignée SW480 (Figure A). Cette observation corrobore les résultats de l'analyse de la croissance tumorale (Figure 53), puisque la lignée SW480 présente une croissance plus lente.

De plus, la présence du marqueur CD31 au sein des tumeurs dans les deux lignées est également mise en évidence. L'anticorps utilisé est spécifique des cellules endothéliales murines, ce qui permet de confirmer que les vaisseaux proviennent bien de l'hôte. Or, les tumeurs étant composées de cellules cancéreuses humaines, elles sont capables de détourner la circulation sanguine de l'hôte (souris). Ce résultat suggère qu'un traitement administré par circulation sanguine peut être utilisé dans ce modèle.

I-1-2 Effet des différents traitements sur la croissance tumorale

Pour envisager l'incidence des traitements sur la croissance tumorale, nous avons greffé en sous cutané les lignées SW480 et SW620 (1 million) et traité les tumeurs ainsi obtenues avec le K252a et/ou la chloroquine ou le double traitement (figure 55).

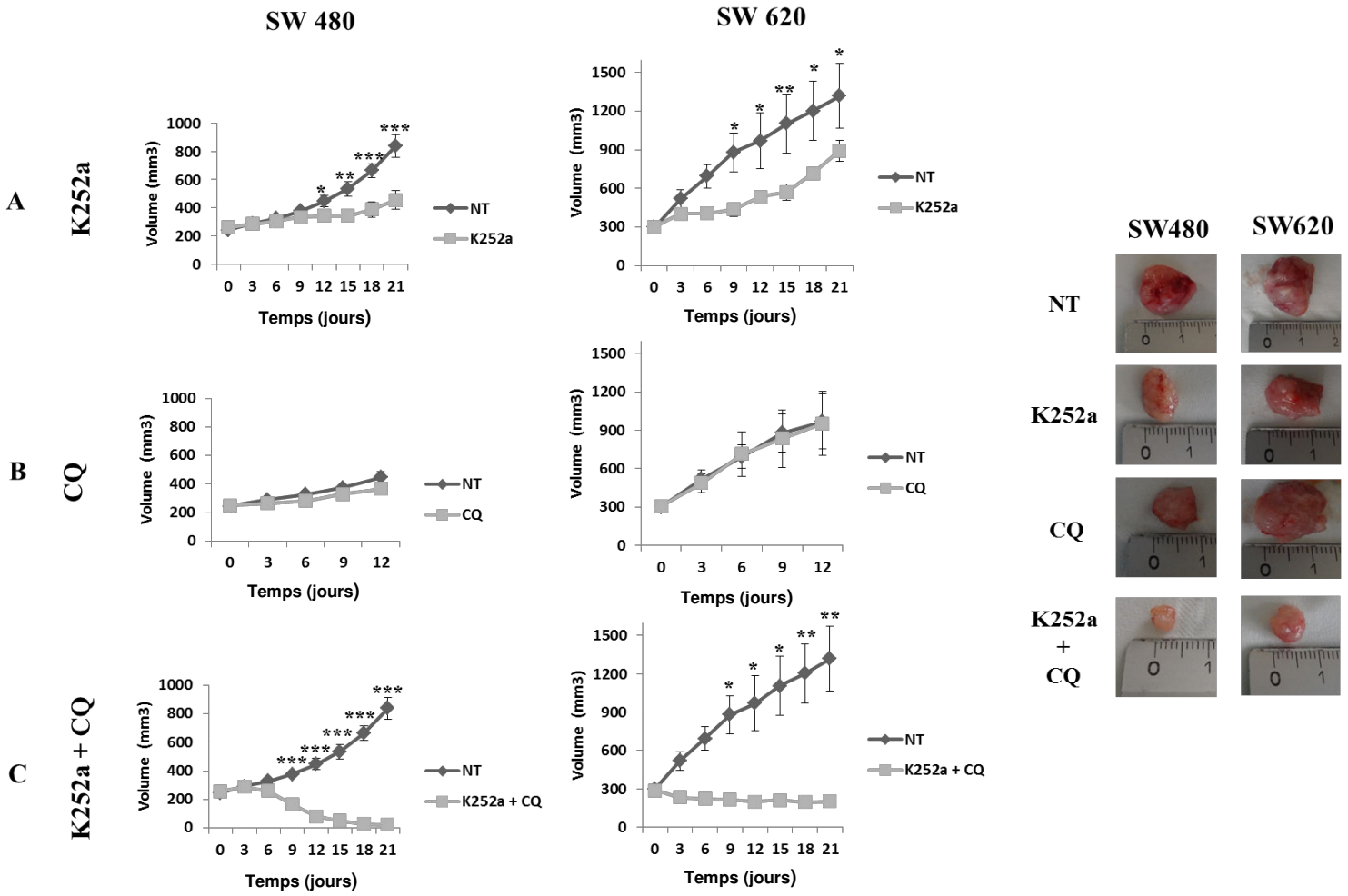


Figure 56 : Effet des différents traitements (K252a, CQ et K252a + CQ) sur la croissance tumorale. 1 million de cellules de CCR ont été greffées en sous cutané sur le modèle murin Nude. Une fois le volume de 300mm3 atteint, des groupes ont été constitués. Le groupe témoin a été traité avec du PBS. Le groupe K252a (A) a été traité tous les 3 jours pendant 21 jours avec une concentration de 0.5mg/kg. Le groupe CQ (B) a reçu une injection tous les 2 jours pendant 12 jours à une dose de 10mg/kg. Le groupe K252a+CQ (C) a reçu les deux traitements conjugués. Chaque groupe était constitué de 5 animaux. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Le traitement par le K252a (inhibiteur de la voie des NTs) permet de diminuer significativement le volume tumoral (ainsi que la vitesse de croissance) dès 12 jours dans la lignée SW480 (340mm^3 vs 380mm^3) et 9 jours dans la lignée SW620 (330mm^3 vs 950mm^3). Le traitement par la CQ (inhibiteur de l'autophagie) n'entraîne quant à lui pas de modifications significatives du volume de la tumeur.

Par contre et de façon inattendue, dans les deux lignées, le double traitement (K252a + CQ) permet une diminution rapide du volume tumoral et ce, dès 9 jours de traitement. Une diminution de 95% dans la lignée SW480 et de 75% pour la lignée SW620 sont obtenues en comparaison aux volumes des tumeurs chez les souris contrôles. L'utilisation de la double inhibition permet donc de potentialiser l'effet des traitements seuls. De manière spectaculaire, la disparition de tumeurs chez certains animaux ayant reçu le traitement K252a+CQ a été constatée pour 40% des tumeurs originaires de la lignée SW480 et pour 25% provenant de la lignée SW620. Nos observations ont ainsi mis en évidence le fait que la lignée SW480 répondait mieux au double traitement que la lignée SW620.

I-2- Présence des signalisations neurotrophique et autophagique dans les tissus de patients présentant un CCR : étude *ex vivo*

Les résultats obtenus démontrant la décroissance tumorale sur le modèle murin sont fortement encourageants en vue du développement de nouveaux traitements dans le cadre du CCR. Nous avons donc vérifié la présence de la signalisation des NTs et la réalité de l'autophagie dans les tissus de patients atteints de CCR (figure 56).

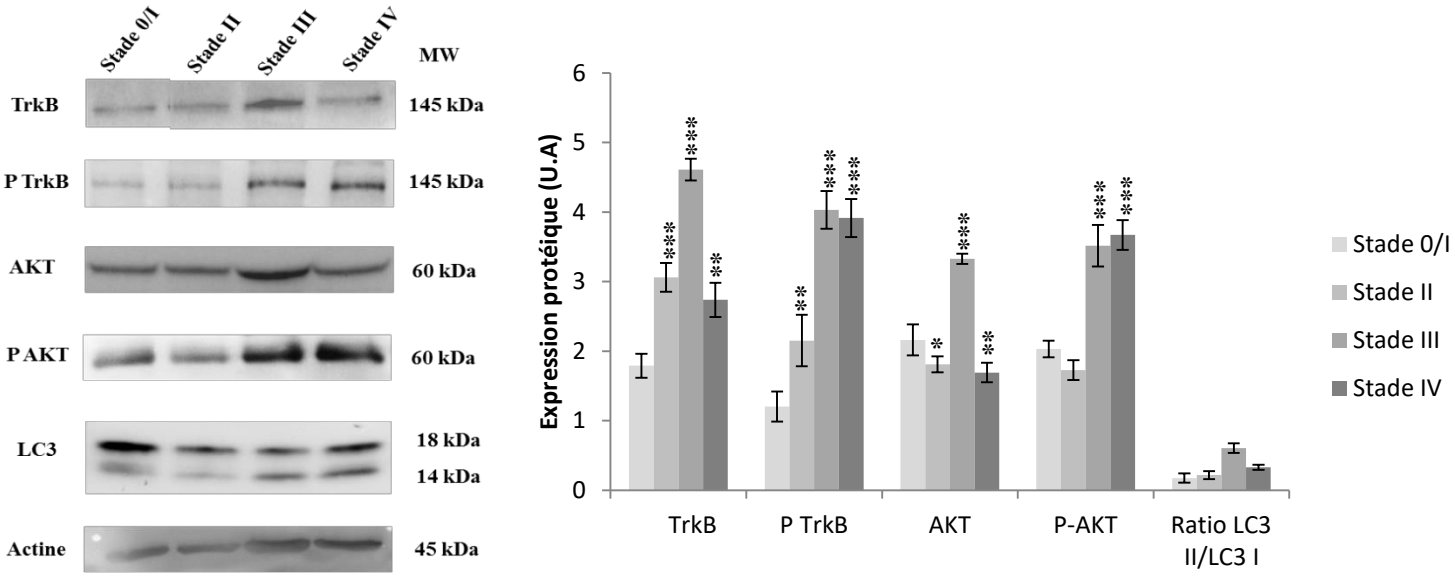


Figure 57 : Détection des acteurs neurotrophiques et autophagique dans les tumeurs issues de patients présentant différents stades de CCR. Des tissus de patients (n=3 pour chaque stade) ont été prélevés (30 µg), broyés et l'extraction protéique a été réalisée comme décrit dans la section « matériels et méthodes ». Les expressions protéiques de TrkB, Phospho-TrkB, AKT, phospho-AKT et LC3 ont été évaluées par Western Blot. La densité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations. Les significativités sont exprimées par rapport au stade 0/I. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Les résultats *ex vivo* ont mis en évidence que dans les tissus de patients atteints de CCR, les deux voies, neurotrophiques et autophagique, sont bien présentes et actives (comme en attestent les formes phosphorylées de TrkB et d'AKT ainsi que l'augmentation du ratio LC3II/LC3I). Une augmentation significative de l'expression du récepteur TrkB ainsi que de sa phosphorylation (activation) est corrélée au stade : plus le stade de la pathologie est avancé, plus la phosphorylation du récepteur TrkB est importante. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés lors de l'étude la protéine AKT appartenant à la voie de signalisation du récepteur TrkB, pour laquelle la phosphorylation est aussi augmentée. L'existence de l'autophagie dans les tissus de patients a aussi été mise en évidence. De manière très intéressante, dans ce cas également, l'augmentation du ratio LC3II/LC3I est fonction du stade de la pathologie. En effet, plus le stade est avancé plus celui-ci est élevé, laissant supposer une activation du mécanisme.Ces résultats renforcent l'implication des deux voies de survie que sont les NTs et l'autophagie dans le CCR et surtout leur co-existence. Ils suggèrent ainsi leur inhibition comme une nouvelle stratégie thérapeutique dans le CCR.

PARTIE III : DEVELOPPEMENT D'UN MODELE MURIN DE CCR CHIMIQUEMENT INDUIT CHEZ LES SOURIS BALB-C.

L'inconvénient majeur des greffes sous cutanées reste l'absence du micro-environnement spécifique du tractus digestif. Afin de palier ce problème, la mise en place d'un modèle permettant le développement d'un CCR au niveau de la paroi colique est souhaitable. Nous avons donc tenté de mettre au point un modèle de CCR chimiquement induit chez des souris Balb/c.

I-1- Analyse des paramètres macroscopiques des côlons chez le modèle murin chimiquement induit.

Dans le cadre des études sur le développement et le traitement des CCR, un modèle murin se rapprochant le plus possible des conditions tumorales retrouvées chez les patients est important. Différentes équipes ont déjà établi des modèles murins de CCR en réalisant des modèles chimiquement induits ou modifiés génétiquement (Barderas et al., 2013; Neufert et al., 2007; Thaker et al., 2012a; Tong et al., 2011). Les résultats les plus prometteurs sont ceux obtenus avec l'utilisation d'azoxyméthane (AOM 10mg/kg), qui induit une fragilité au niveau de la muqueuse intestinale couplé au DSS (qui assure le maintien de l'inflammation) chez la souris BalbC. Nous avons donc tenté de reproduire ce modèle et nous avons réalisé un suivi des paramètres macroscopiques des souris (figure 57).

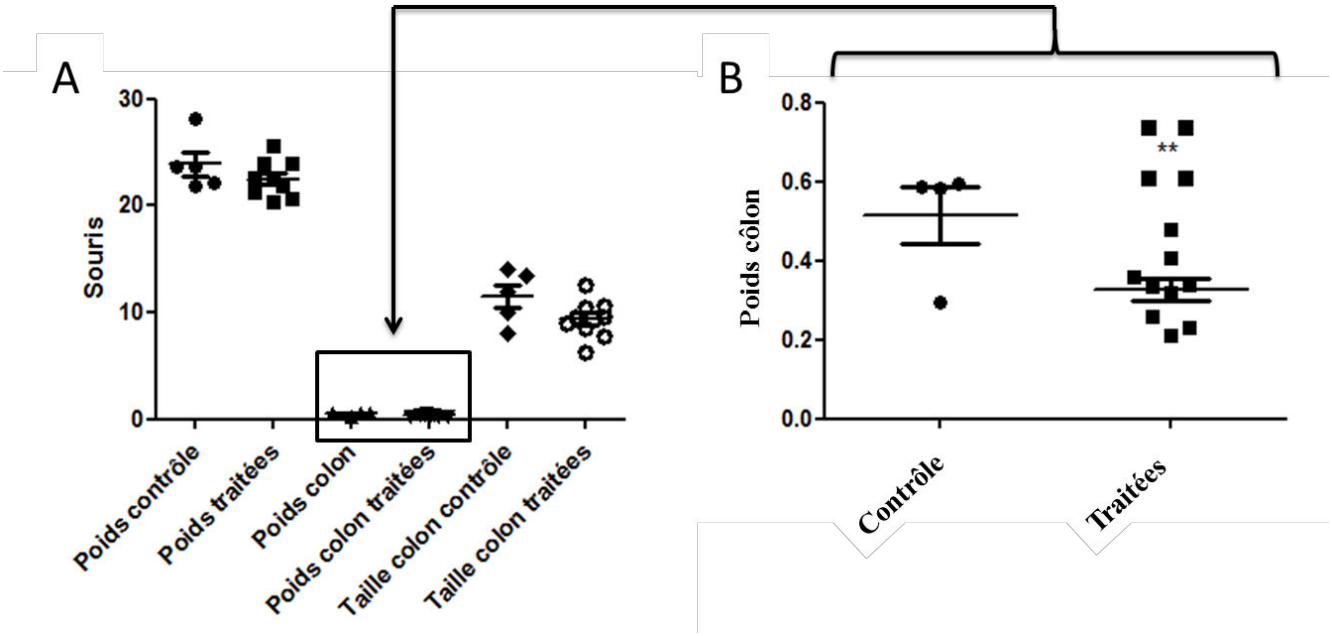


Figure 58 : Analyse de différents paramètres macroscopiques concernant les côlons provenant de modèles de CCR murin chimiquement induit. Des groupes de souris témoins (contrôle) et traitées ont été réalisés comme décrit dans la section « matériels et méthodes ». Après sacrifice des animaux, les côlons ont été prélevés puis analysés (mesure de la longueur et du poids). Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Les résultats préliminaires démontrent qu'aucune variation significative du poids des animaux n'a été constatée, suggérant que le traitement n'agit pas sur leur prise alimentaire. Aucune variation de la longueur des côlons n'a de plus été observée. Par contre, même si la longueur n'est pas significativement modifiée, le poids de l'organe est lui différent entre les animaux contrôles et traités (Figure B). En effet, dans le groupe traité, une diminution significative du poids du côlon a été démontrée (0,5g pour le groupe contrôle et 0,3g pour les animaux traités), suggérant une modification de composition de celui-ci. Cette modification a été recherchée au point de vue histologique.

I-2- Analyse histologique des côlons chez le modèle murin de CCR chimiquement induit

A l'issu du traitement, les animaux ont été sacrifiés et le colon a été prélevé. Nous avons réalisé une étude histologique de l'organe, avec notamment une recherche d'expression de la molécule CD45R (marqueur des cellules immunitaires) afin d'étudier la réponse immunitaire (figure 58).

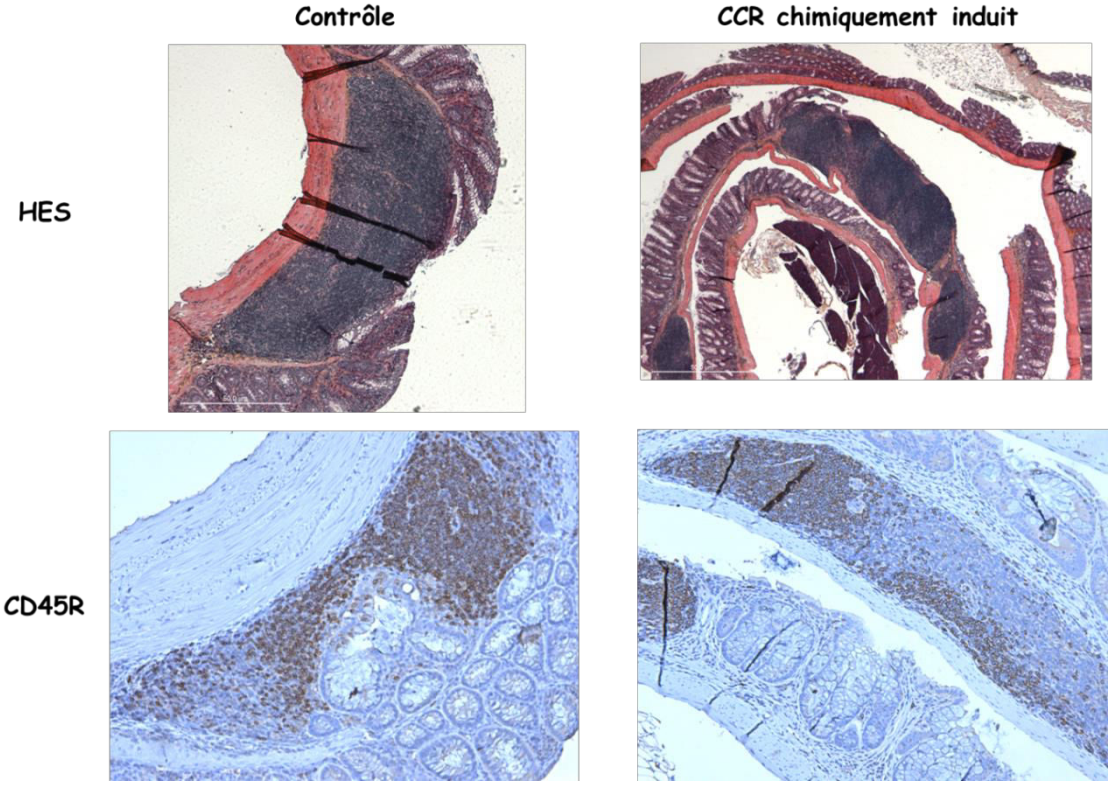


Figure 59 : Analyse histologique (coloration HES) et immunohistochimique (marquage du CD45R) des côlons issus du modèle de CCR chimiquement induit. Des coupes de 4 µm d'épaisseur des côlons provenant des souris ayant subi ou non le traitement d'induction du CCR par l'AOM et le DSS ont été réalisées. Une coloration HES ainsi qu'un marquage immunohistochimique du CD45R ont été faits. Grossissement x100 et x200.

L'analyse HES démontre que les côlons des individus traités présentent un amincissement de la muqueuse colique ainsi qu'une densité cellulaire très développée notamment au niveau des tissus lymphoïdes. De plus, le marquage du CR45R a permis de démontrer la présence plus importante de ces cellules immunitaires. Il est donc le reflet d'une inflammation plus importante. Cette inflammation chronique, induite par le traitement, favorise l'apparition de mutations cellulaires participant par conséquent à la création de cellules cancéreuses. L'ensemble de ces résultats suggère que le traitement par l'AOM/DSS permet donc une inflammation du côlon ainsi qu'une modification ou une altération de la composition de la paroi colique. Cependant, aucune lésion cancéreuse n'a été décelée.

A la vue de ces premiers constats, une nouvelle série d'animaux a été réalisée en modifiant le protocole de traitement. Ainsi, les souris ont été traitées non plus avec 10mg/kg d'AOM mais 12mg/kg.

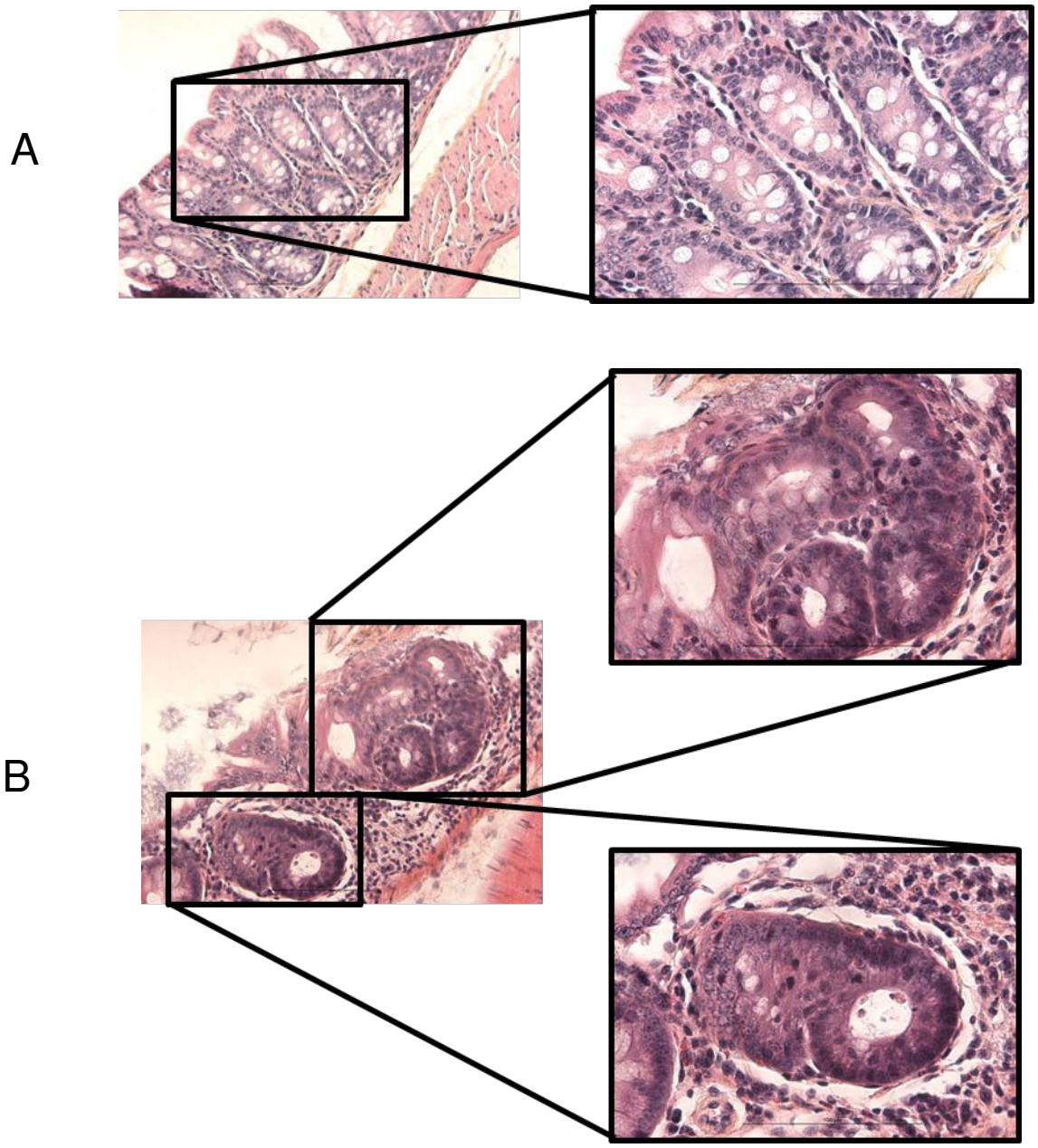


Figure 60 : Analyse histologique (coloration HES) et organisation cellulaire des côlons issus du modèle de CCR chimiquement induit. Des coupes de 4 µm d'épaisseur des côlons provenant des souris contrôle (A) ou ayant subi le traitement d'induction du CCR par l'AOM et le DSS (B) ont été faites. Une coloration HES a été réalisée comme précédemment. Grossissement x200 et x400.

Les nouveaux résultats obtenus ont mis en évidence que le traitement induit une modification de l'organisation cellulaire, plus nette que celle visualisée lors de la première série de traitement (figure 59).

Dans le cas d'un individu non traité (donc sain), la muqueuse colique présente un aspect normal avec une organisation respectant les différentes couches de la paroi colique et des glandes de forme régulière. Les cellules ont un noyau situé au niveau du pôle basal et les vésicules de mucus ont un aspect clair et sont réparties le long de l'axe glandulaire.

Au contraire dans le cas des souris ayant subi le traitement, la muqueuse colique présente un aspect anormal. En effet, une désorganisation des glandes est observée puisque leur membrane basale semble rompue et des glandes semblent être fusionnées. Des micro-foyers de dysplasie cellulaire avec des cellules pour lesquelles les noyaux sont délocalisés au niveau du pôle apical sont visibles. La présence de cellules en mitose est aussi détectée dans l'ensemble des glandes. Ces résultats sont le signe d'une prolifération cellulaire anarchique.

En conséquence, même si des adénocarcinomes coliques n'ont pas été observés comme dans les publications à partir desquelles le protocole a été établi, ces résultats préliminaires restent encourageants et seront poursuivis dans l'avenir.

DISCUSSION

Des travaux antérieurs menés au sein de notre laboratoire ont montré l'existence d'une voie de survie contrôlée par les neurotrophines (NTs) plus particulièrement induite par la signalisation du couple TrkB/BDNF dans le cadre du CCR (Akil et al., 2011). L'activation de cette voie conduit à la mise en place de boucles autocrines et paracrines de survie lors d'un stress cellulaire notamment en cas de privation sérique *in vitro*. La surexpression de TrkB ainsi que celle de BDNF a déjà été retrouvée dans différents types de cancers et est associée à un mauvais pronostic chez le patient (Fan et al., 2014; Li et al., 2014; Okamura et al., 2012; Zhang et al., 2008). Cette observation est corrélée à l'agressivité tumorale comme l'ont montré les travaux de notre équipe ainsi que ceux d'autres chercheurs (Akil et al., 2011; Dubanet et al., 2015; Fauchais et al., 2008; Sclabas et al., 2005; Vanhecke et al., 2011). Récemment, Tanaka et ses collaborateurs ont démontré que la voie de signalisation TrkB/BDNF est impliquée dans la prolifération, la migration et le phénotype invasif des cellules de CCR (Tanaka et al., 2014). Des résultats similaires avaient déjà été démontrés par Yu et ses collaborateurs (Yu et al., 2010) qui ont mis en évidence que l'inhibition de la signalisation induite par ce couple en utilisant le K252a, permet la suppression de métastases. Par conséquent, le couple TrkB/BDNF constitue une cible de choix dans le cadre du CCR (Akil et al., 2016; Roesler et al., 2011).

Le récepteur de forte affinité aux pro-NTs, $p75^{NTR}$, est l'un des acteurs médiateur de la mort cellulaire via son domaine DD. Son expression a déjà été associée au pronostic et donc au développement tumoral chez le patient (Fanburg-Smith and Miettinen, 2001; Rende et al., 2010). La sortiline est un récepteur à la neurotensine pouvant devenir un corécepteur des Trk ou de $p75^{NTR}$. Elle a aussi un rôle dans le transport des NTs (Nykjaer et al., 2005).

Ainsi, une partie des travaux de cette thèse a visé à inhiber la voie des NTs par le K252a. En effet, nous avions aussi réalisé l'inhibition des NTs par l'utilisation de shRNA anti TrkB, cependant cette technique s'est rapidement révélée létale pour les cellules traitées. Par conséquent, le K252a a été utilisée comme inhibiteur spécifique du récepteur TrkB (blocage de l'autophosphorylation du récepteur) (Tapley et al., 1992b) puisque nos premiers résultats avaient montré l'absence des formes TrkA et TrkC dans les deux modèles cellulaires utilisés. Néanmoins, des analyses plus récentes montrent une présence de TrkC en faible quantité (Genevois et al., 2013). Ainsi, l'utilisation du K252a (100 nM) a permis d'inhiber la signalisation des NTs et cela dans les deux lignées cellulaires provenant d'une part de la tumeur primaire (SW480) et d'autre part d'un envahissement ganglionnaire (SW620). Des résultats précédents obtenus avec le K252a ont montré que la molécule inhibe le rôle anti apoptotique médié par la signalisation TrkB/BDNF (Akil et al., 2011) et que, par conséquent, le K252a devient un inducteur d'apoptose (Guo et al., 2011). D'autres

données montrent que l'augmentation de la signalisation TrkB/BDNF intervient dans la résistance face aux chimiothérapies et que l'utilisation de K252a peut améliorer l'effet du cetuximab (inhibiteur de l'EGFR) dans le CCR (de Farias et al., 2012). Grâce à la fixation du K252a, l'activation des voies de signalisation et particulièrement PI3K/AKT/mTOR est inhibée, par blocage de l'autophosphorylation du TrkB. Cette donnée est particulièrement intéressante puisque dans le cas du neuroblastome, la protéine AKT correspond à la protéine signalisatrice clé majeure par laquelle le couple TrkB/BDNF exerce son action de résistance contre la chimiothérapie (Li et al., 2005). Néanmoins, nos travaux ont montré que la transcription des gènes codant le ligand BDNF et son récepteur TrkB mais aussi leur expression protéique sont augmentées après utilisation de K252a. Ces informations sont en accord avec d'autres études ayant montré que l'inhibiteur K252a n'empêche pas la fixation du BDNF sur TrkB mais inhibe bien la signalisation en aval du récepteur (Nye et al., 1992). Nos précédents résultats ont notamment été confirmés par l'observation des colocalisations de BDNF et de TrkB. Les dosages du BDNF exogène réalisés à partir des surnageants de culture n'ont quant à eux pas montré de variations malgré les conditions de culture. Or, le marquage intracellulaire du BDNF est augmenté. Comme la sécretion du BDNF dans les surnageants ne varie pas, cela peut être dû à une augmentation de la fixation du ligand sur son récepteur. Cette hypothèse sous-tend l'idée que lors de l'inhibition des NTs par le K252a, les cellules de CCR essaient de réactiver la voie pour favoriser leur survie ainsi que leur prolifération. De plus, la diminution de la signalisation du récepteur aux NTs, TrkB, n'induit pas de modification de la viabilité cellulaire, particulièrement dans la lignée SW480.

En parallèle des NTs, les cellules de CCR peuvent solliciter l'autophagie comme autre moyen de survie. En effet, ce mécanisme est fortement incriminé dans ce cancer, notamment en favorisant la survie tumorale mais aussi la résistance aux différentes thérapies (Burada et al., 2015; Sakitani et al., 2015; Sato et al., 2007; Yang et al., 2013). Dans notre étude, l'inhibition des NTs par le K252a active la voie autophagique. Cela a été démontré par l'augmentation de l'expression de Beclin1 et de l'ATG5. De plus, l'augmentation du ratio LC3II/LC3I et l'apparition de sa forme liée aux autophagosomes ainsi que la diminution de la phosphorylation de mTOR (levée d'inhibition) ont aussi confirmé ce résultat. Ces données suggèrent un relais rapide de l'autophagie quand la signalisation des NTs est défaillante, hypothèse absente de la littérature dans le cadre du CCR. Des résultats similaires ont été démontré au sein de notre laboratoire dans des lignées de glioblastome où l'autophagie a été identifiée comme mécanisme de survie en condition hypoxique lors de l'inactivation du récepteur TrkC (Jawhari et al ; 2016 ; en révision). D'autres études ont

montré que l'autophagie, en tant que mécanisme compensatoire, permet la protection cellulaire (survie) quand l'EGFR est inhibé avec l'erlotinib dans le cas du cancer du poumon (Li et al., 2013). Des résultats similaires ont aussi été réalisé dans le cas de l'anti-EGFR dans le CCR (Chen et al., 2016). Ces résultats sont en faveur du lien entre la voie des NTs et l'autophagie, probablement en partie via un des acteurs clé, commun à ces deux processus : la protéine mTOR.

Par la suite, pour cerner davantage cette relation compensatrice éventuelle nous avons inhibé l'autophagie et analysé la répercussion sur la voie de signalisation des NTs ; l'utilisation de la chloroquine (CQ) a été choisie dans une première approche. Il s'agit d'un inhibiteur classique du flux autophagique (Yang et al., 2013). Dans une seconde approche, l'inhibition de l'autophagie par siRNA dirigés contre la protéine ATG5 a été développée. Cette seconde méthode a permis de faire abstraction de l'effet toxique de la CQ (Janku et al., 2011). La partie de cette étude portant sur l'utilisation de siRNA dirigés contre ATG5 a démontré des résultats identiques à ceux obtenus avec la CQ (augmentation des transcrits de TrkB et BDNF et de la signalisation en aval). Par conséquent, les résultats obtenus avec l'utilisation de la CQ ne sont pas dus à la toxicité de la molécule mais bien à l'activité d'inhibition du processus autophagique. Comme précédemment avec le K252a, une augmentation des transcrits des acteurs de la voie des NTs ainsi que des protéines associées a été mise en évidence. De plus, l'augmentation de l'activation des voies en aval de TrkB, et particulièrement celle de la voie PI3K/AKT/mTOR, a été démontrée (augmentation des formes phosphorylées des protéines AKT, cible de la PI3K, et mTOR, régulateur principale de l'autophagie). De manière tout à fait intéressante, la quantité de BDNF est significativement augmentée après utilisation de la CQ dans la lignée SW480 alors que la lignée SW620 ne présente qu'une tendance à l'augmentation. Par conséquent, ces résultats suggèrent que la lignée provenant de la tumeur primaire répond plus fortement à l'inhibition de l'autophagie et qu'elle y est par conséquent plus sensible. Cette observation est en accord avec le fait que la lignée SW480 présente une autophagie de base plus importante que la lignée en provenance de l'envahissement ganglionnaire (Isozaki et al., 2016; Sato et al., 2007). Ces éléments confirment une nouvelle fois que les cellules de CCR utilisent particulièrement la voie BDNF/TrkB pour assurer leur survie et que celle-ci est potentialisée en absence d'autophagie fonctionnelle.

Cependant, l'inactivation de l'autophagie (quelle que soit la méthode utilisée) n'entraîne pas une mort cellulaire importante puisqu'elle n'est pas supérieure à 20%.

Les résultats obtenus lors de l'inhibition des NTs et de l'autophagie ont mis en évidence une surexpression transcriptionnelle et protéique de la sortiline. Les données de la littérature montrent que cette protéine assure le transport du ligand (BDNF) au sein de la cellule, ce qui ne semble pas être le cas dans notre modèle, puisque aucune colocalisation entre les 2 protéines n'a été mise en évidence. D'autre part, la sortiline peut servir de corécepteur au $p75^{NTR}$ et participer à la mort cellulaire induite par le domaine DD du $p75^{NTR}$ (Fauchais et al., 2008; Teng et al., 2005). Or, les cellules CCR survivent malgré la présence de K252a et dans nos modèles il n'y a pas de modification d'expression de p75. Une étude récente a montré que dans le cas du cancer du sein, la sortiline est impliquée dans l'agressivité cellulaire (Roselli et al., 2015). Elle peut donc contribuer ainsi au processus invasif retrouvé dans le cas de métastases. De plus, dans le cas du cancer du poumon, notre équipe a montré que la sortiline a la capacité de se lier au récepteur TrkB mais aussi à l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), formant le complexe TES (TrkB/EGFR/Sortiline) qui peut être intégré dans des exosomes et potentialiser l'angiogenèse (Wilson et al., 2014). Le lien entre sortiline et autophagie n'est quant à lui que très peu documenté. Néanmoins, une étude rapporte que cette protéine a la capacité de se lier au TGFβ (Transforming Growth Factor) afin d'améliorer la dégradation lysosomale (Kwon and Christian, 2011). Par conséquent, des variations de l'expression de la sortiline suite à l'inhibition des NTs pourraient modifier le processus autophagique.

Actuellement, la fonction de la sortiline, renforçant l'agressivité tumorale, est privilégiée, comme démontrée dans une étude récente où l'inhibition de l'expression de la sortiline par siRNA entraine une augmentation de l'apoptose d'environ 30% et une inhibition de la prolifération de l'ordre de 40% (Ghaemimanesh et al., 2014). Même si nos résultats laissent présager ce genre de fonction, ils sont bien entendu beaucoup trop préliminaires et nécessiteront des études approfondies.

Ainsi, les résultats obtenus démontrent que l'inhibition d'une des deux voies de survie déclenche la mise en place de l'autre. Afin de sensibiliser les cellules à la mort, l'inhibition simultanée des deux voies a été étudiée. La réalisation du double traitement K252a/CQ a montré une baisse de la viabilité et de l'activité métabolique, accompagné d'une augmentation du clivage de la PARP. Ces observations ont été confirmées par l'étude *in vivo* sur le modèle de souris Nude montrant une diminution du volume tumoral. Néanmoins, les souris ayant reçu le traitement avec le K252a présentent aussi une croissance tumorale plus faible comparée aux individus contrôles. Cette donnée est concordante avec d'autres études menées dans le cas du cancer pancréatique ou encore du choriocarcinome et montrant que

l'inhibition des récepteurs Trk réduit la prolifération, induit l'apoptose et améliore la survie du modèle (Weeraratna et al., 2001, Kawamura et al., 2010). Nos résultats mettent de plus en avant que la lignée SW480 semble plus particulièrement sensible à cette double inhibition (*in vitro* et *in vivo*). Lors de ce travail, nous avons observé qu'après un traitement de 3h avec le K252a, cette fois ci associé avec la CQ, l'activité mitochondriale (reflet de l'activité cellulaire) était plus fortement diminuée que dans l'analyse à 72h pour la lignée SW480 (diminution de 40% à 3h contre 20% à 72h). Cependant, lors de l'étude de la viabilité à ces deux temps de traitement, aucun effet significatif du traitement n'a été relevé dans la lignée originaire de la tumeur primaire. On peut supposer que cette lignée n'a pas répondu aussitôt au traitement puisque l'activité métabolique remonte par la suite. Ce retard de réponse pourrait être dû à la stimulation plus importante des NTs dans cette lignée contrairement à la lignée SW620 qui ne montre pas de réaugmentation de l'activité métabolique à 72h. Cette observation souligne une nouvelle fois la différence de comportement entre les deux lignées cellulaires.

L'importance de cibler l'autophagie dans les cancers (Rebecca and Amaravadi, 2016; Reyjal et al., 2014; Wu and Yan, 2011) ainsi que le rôle « nocif » de la suractivation des NTs (Akil et al., 2011; Huang et al., 2010; Ricci et al., 2001) ont déjà été décrites. Dans le cas du glioblastome, l'inhibition du VEGFR (VEGF receptor) et de l'angiopoeitine 2 entraîne une diminution de la croissance tumorale chez la souris (Peterson et al., 2016). De plus, l'utilisation du VS-5584 (inhibiteur de PI3K et de mTOR) inhibe la croissance des cellules de mélanome, *in vitro* et *in vivo* (Shao et al., 2015). Enfin, très récemment, dans le cas du CCR, l'inhibition de Bcl-2 (impliquée dans l'induction de l'apoptose), et de mTOR ont démontré un effet antiprolifératif sur les cellules en conditions hypoxiques (Risberg et al., 2016). Les nouvelles recherches scientifiques utilisant le principe de la double inhibition sont particulièrement prometteuses.

Des études cliniques ciblant l'autophagie sont également menées dans le cadre du CCR (Penn's Abramson Cancer Center). De nombreuses études ont montrés l'importance du blocage de la signalisation autophagique et notamment de son flux, en association avec les traitements chimio thérapeutiques (Cui et al., 2014; Fan et al., 2015; O'Donovan et al., 2015), avec une efficacité *in vitro* et *in vivo*. Par conséquent, l'utilisation de la CQ pourrait donc être considérée comme un adjuvant chimio thérapeutique non négligeable (Pascolo, 2016). En effet, de nombreuses observations montrent que l'inhibition de l'autophagie induit la mort cellulaire en particulier par activation de l'apoptose ou même en ciblant la voie PI3K/AKT/mTOR dans le CCR (García-Mauriño et al., 2012). Toujours dans le cas de ce cancer, des résultats récents montrent l'intérêt de l'inhibition de l'autophagie comme

traitement complémentaire à l'oxaliplatine (YANG et al., 2016). De manière très intéressante, des résultats similaires alliant le ciblage de l'autophagie et l'utilisation de chimiothérapie ont été obtenus dans le cas du cancer du poumon (Wang et al., 2016b) mais aussi dans le cancer du sein (Chittaranjan et al., 2014) mettant en avant le rôle majeur du mécanisme.

Finalement, les résultats obtenus à partir des échantillons de tissus de patients atteints de CCR mettent en évidence l'importance des deux voies de survie que sont les NTs et l'autophagie. En effet, le récepteur TrkB est surexprimée dans les stades avancés de la pathologie et associé à un mauvais pronostic (Fujikawa et al., 2012). De plus, sa forme phosphorylée, c'est-à-dire activée, est fortement augmentée. En parallèle, une augmentation de l'expression du BDNF dans les stades avancés de CCR a déjà été décrite (Akil et al., 2011; Tanaka et al., 2014). Ce constat est associé a une augmentation de la mobilité cellulaire et par conséquent l'apparition de métastases (Huang et al., 2015; Tanaka et al., 2014). Ces résultats concernant les NTs sont à mettre en parallèle avec l'augmentation retrouvée pour le ratio LC3II/LC3I et donc une autophagie exacerbée. Une étude récente montre d'ailleurs l'intérêt d'utiliser la mesure de l'expression de marqueurs autophagiques comme Beclin1, LC3, ULK1 ou p62 comme marqueur pronostic du CCR (Schmitz et al., 2016). De plus, ce travail démontre que l'expression de la protéine LC3 augmente dans les stades avancés de CCR. Finalement, l'augmentation de l'activité des deux mécanismes (autophagie (Schmitz et al., 2016) et BDNF/TrkB (Zhang et al., 2008)) a été identifiée comme marqueurs de mauvais pronostic chez les patients. En effet, une autophagie excessive est associée à l'apparition de métastases et l'augmentation de l'expression de TrkB favorise la prolifération, la migration et l'inhibition de l'anoïkis dans les cellules de CCR (Fujikawa et al., 2012; Giatromanolaki et al., 2010).

L'ensemble de ces travaux de thèse ont permis de montrer l'existence d'une « relation compensatrice » entre le mécanisme d'autophagie et la voie des NTs pour assurer la survie des cellules tumorales. Ces données ont été approfondies à l'aide d'un modèle *in vivo*. Les deux lignées possèdent un taux de prolifération *in vitro* différent puisque la lignée provenant de la tumeur primaire (SW480) prolifère beaucoup moins rapidement (facteur 3 environ) que la lignée provenant de l'envahissement ganglionnaire (SW620). Ce résultat a été confirmé par la réalisation du marquage au Ki67 mais aussi par le suivi des greffes et de la croissance tumorale sur les modèles murins. En 2000, Hewitt et ses collaborateurs ont mis en évidence le fait que les lignées SW480 et SW620 présentent une morphologie différente,

une prolifération et une susceptibilité à l'apoptose disparate (Hewitt et al., 2000). Même si les deux lignées proviennent d'un même patient (d'après les données du fournisseur ATCC, American Type Culture Collection), la lignée SW480 provient de la tumeur primaire alors que la lignée SW620 provient d'un envahissement ganglionnaire régional. Nos résultats ont montré que la lignée SW480 présente un taux basal d'autophagie plus important que celui retrouvé dans la lignée SW620. De la même manière, la lignée originaire de la tumeur primaire présente une activation des NTs plus importante. Ces résultats suggèrent que les deux voies sont plus fortement sollicitées par la lignée originaire de la tumeur primaire. Par conséquent, cette lignée possède une plus forte sensibilité au double traitement. De plus, en conditions *in vivo*, la lignée SW480 engendre la formation d'une masse tumorale plus importante que celle provoquée par la lignée SW620. Par conséquent, l'apport nutritif (nutriments et oxygène) est différent dans les deux lignées et diminué suite à un défaut de vascularisation dans la tumeur primaire (Diaz-Cano, 2012). Ce genre de stress cellulaire est connu comme inducteur de l'autophagie (Hayat, 2013) et peut expliquer la plus grande sensibilité de la lignée SW480 à l'inhibition de l'autophagie. Puisque la lignée SW480 répond de manière plus importante à l'inhibition de l'autophagie par l'activation des NTs, il parait donc particulièrement intéressant de cibler les deux voies de signalisation simultanément dans les tumeurs primaires. Cette observation est en accord avec celle réalisée *in vivo* ayant montré l'effet plus important de la double inhibition dans le cas de la lignée SW480. Ces résultats démontrent aussi une plus grande résistance des SW620, cellules originaires de l'envahissement ganglionnaire, ce qui est concordant avec leur caractère plus agressif, métastasique. Cela suggèrent l'activation d'autres voies de survies pour permettre la résistance observée dans cette lignée (Mehlen and Puisieux, 2006). De plus, la lignée provenant de l'envahissement ganglionnaire résiste beaucoup plus fortement à l'induction de l'apoptose par l'utilisation de cisplatine (Huerta et al., 2003). Par conséquent, il est clair que la lignée SW620 est capable d'utiliser d'autres voies de survie que la lignée SW480 et accentue ainsi sa résistance face aux conditions stressantes.

Même si notre étude a permis d'obtenir des résultats encourageants *in vitro* mais aussi *in vivo*, nos modèles d'étude demeurent relativement éloignés de la réalité. En effet, nous avons travaillé *in vitro* sur des cellules humaines de CCR et utilisé des greffes sous cutanées de cellules humaines chez la souris Nude. Dans ce modèle, nous nous sommes affranchi du microenvironnement original des tumeurs de CCR. Or celui-ci possède un rôle non négligeable dans la cancérogénèse colique. Des travaux ont démontrés que l'analyse de l'infiltrat immunitaire au sein de la cellule pourrait constituer un outil pronostic (Galon et al., 2006, 2007) et que l'immunoscore (réponse immunitaire) en résultant devrait faire parti de

l'analyse clinique (Galon et al., 2014). En effet, les cellules immunitaires infiltrées au sein même de la tumeur ne sont pas les mêmes en fonction du stade considéré (Bindea et al., 2013). De plus, la quantité d'une même population cellulaire varie en fonction du stade de la pathologie, comme par exemple pour les lymphocytes T ou B (Bindea et al., 2013). Néanmoins, le microenvironnement tumoral ne se résume pas uniquement au système immunitaire. Il est composé de cellules variées appartenant soit au tissu considéré ou à son environnement direct (fibroblastes, cellules vasculaires, cellules dendritiques, cellules immunitaires) (Hanahan and Weinberg, 2011). Ce microenvironnement cellulaire baigne dans la matrice extracellulaire qui leur permet de se déplacer. L'ensemble des cellules peut sécréter des facteurs solubles modulant l'activité des cellules environnantes (Peddareddigari et al., 2010). Si l'équilibre de cet environnement est modifié, des mutations cellulaires peuvent avoir lieu et des cellules cancéreuses apparaissent. Elles sont capables de détourner le rôle du microenvironnement dans leur propre intérêt (survie, croissance…) (Hanahan and Weinberg, 2011). L'une des modifications majeure réside dans la modification d'activité des fibroblastes. Ceux-ci sont fortement activés conduisant à une augmentation de leur prolifération et donc à une sécrétion exacerbée de protéines de la matrice extracellulaire (collagène et fibronectine). On parle alors de fibroblastes associés au cancer (CAF) (Peddareddigari et al., 2010). Par conséquent, le microenvironnement tumoral prend alors une place de choix dans l'étude des processus cancéreux.

Dans le cas des souris Nude greffées en sous cutané, les cellules demeurent loin de leur environnement d'origine (paroi du côlon). Par conséquent, un modèle murin de développement chimique d'un CCR se rapprochant davantage des conditions originales de la tumeur a été expérimenté. D'autres études montrent l'établissement de différents modèles de cancérogénèse colorectale bien que ces modèles présentent des limites (Young et al., 2013). Comme énnoncé dans l'introduction de ce mémoire, les mutations du gène APC sont retrouvées dans 90% des CCR sporadiques. Par conséquent le modèle murin muté pour le gène *APC* pourrait constituer un choix intéressant (Karim and Huso, 2013; Lévy et al., 2015).

Parmi l'ensemble des modèles possibles, c'est celui du CCR chimiquement induit par l'injection d'azoxyméthane (AOM) et l'absorption de sel de dextran (DSS) (Tanaka et al., 2003; Thaker et al., 2012b) qui a été choisi. Le traitement AOM/DSS constitue un modèle intéressant quant à la modification des cryptes intestinales (lésions primitives) (Karim and Huso, 2013). De plus, il présente l'avantage d'un faible coût de mise en place et demeure pratique, même si le suivi de la croissance tumorale reste compliqué. Nos résultats ne sont que préliminaires mais demeurent néanmoins encourageants. Ils démontrent une différence significative du poids du côlon après traitement, mais aussi une modification de la

composition de la paroi colique avec la présence d'une forte inflammation. Or cette dernière est étroitement associée à la cancérogénèse (Clevers, 2004b). Ces résultats sont donc de bon augure puisqu'ils ont déjà été retrouvé dans des modèles de CCR (Karim and Huso, 2013; Thaker et al., 2012b). Néanmoins, ils demandent à être approfondis pour être utilisés ultérieurement. Ce modèle murin chimiquement induit permettrait aussi de restituer le microenvironnement immunaitaire de la tumeur. Celui-ci est en étroite communication avec les cellules tumorales et est capable de synthétiser de nombreuses molécules parmi lesquelles sont retrouvées les NTs (Vega et al., 2003). L'expression des Nts est fortement dépendante de l'activation des cellules immunitaires (Moalem et al., 2000). Les lymphocytes T et B sont capables d'exprimer les récepteurs de la famille Trk ainsi que leurs ligands (Besser and Wank, 1999). Les monocytes sont eux aussi capables de sécréter les NTs et leur récepteurs (Besser and Wank, 1999; Caroleo et al., 2001). De plus, Bayas et collaborateurs ont démontrés que les NTs (notamment le BDNF) étaient capables de moduler la production de molécules comme le TGFβ, impliqué dans la réponse des CAF aux cellules cancéreuses (Bayas et al., 2003). Il est donc clair que dans le cas de notre étude le microenvironnement tumoral tient une place importante dans la réponse aux différents traitements. En effet, l'utilisation d'une molécule comme le K252a ne cible pas spécifiquement les cellules de CCR et modifie donc certainement la réponse des cellules immunitaires. De plus, l'autophagie est elle aussi retrouvée dans celles-ci (Mintern and Harris, 2015). Par conséquent, cette seconde voie peut elle aussi être modifiée par les traitements utilisés au cours de ces travaux. Il est donc évident que l'utilisation d'un modèle murin permettant de restituer l'environnement cellulaire des cellules de CCR sera fortement interessant dans la poursuite de cette étude.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de ce travail a mis en évidence que les neurotrophines (TrkB/BDNF) et l'autophagie sont deux mécanismes impliqués dans la survie des cellules de CCR. Ce travail est le premier à s'interesser à l'existence d'une relation entre les NTs et l'autophagie dans ce type de tumeur. Ces deux mécanismes pourraient être identifiés comme cibles thérapeutiques. L'ensemble de nos résultats montre que la sortiline est surexprimée après les différents traitements. Cela suppose un rôle important de cet acteur. Une approche et des analyses plus poussées sont nécessaires pour élucider son importance et son mécanisme d'action en réponse aux traitements dans le CCR. Nos résultats *in vivo* sont encourageants, montrant une décroissance tumorale, signe d'une induction de la mort cellulaire dont il reste à déterminer le mécanisme.

Notre étude a aussi mis en évidence le fait que la double inhibition NTs/autophagie entraîne une diminution de la croissance tumorale chez le modèle murin immunodéprimé Nude. Néanmoins, ces résultats n'ont été obtenus que sur un temps de traitement relativement court. Il serait intéressant d'approfondir cet axe de recherche en étudiant le devenir tumoral à plus long terme afin de voir notamment si des échappements thérapeutiques se produisent.

Un modèle murin plus proche de la réalité serait nécessaire pour confirmer les résultats obtenus. En effet, même si les résultats acquis lors de l'établissement du modèle de CCR chimiquement induit sont favorables, il sera par la suite nécessaire de finaliser cette mise au point. Aujourd'hui, sur le modèle développé, les premiers signes d'induction de CCR (notamment inflammation et désorganisation de la paroi colique) sont présents mais aucune tumeur n'a été répertoriée. A moyen terme, l'établissement de ce modèle permettrait de valider l'utilisation des NTs et de l'autophagie comme nouvelles cibles thérapeutiques dans le cadre du CCR.

Enfin, nous avons mis en évidence la présence de l'activation des deux voies d'intérêt dans les différents stades tumoraux chez les patients atteint de CCR. Cela justifie la pertinence des travaux visant à terme à inhiber simultanément les deux voies de signalisation. Ces travaux de thèse sont renforcés par l'existence de 2 essais cliniques actuellement en cours ciblant l'autophagie dans le CCR, en association avec la chimiothérapie classique : étude NTC01206530, analysant l'efficacité et l'inocuité de

l'association FOLFOX/bevacizumab/hydroxychloroquine, et l'étude NCT02316340 comparant l'association vorinostat/hydrochloroquine vs regorafenib (ClinicalTrials.gov). Une partie des futurs travaux pourrait donc consister à utiliser des cultures primaires de cellules de patients traités ou non avec des traitements anti-cancéreux et à analyser la réponse cellulaire aux différentes inhibitions (NTs ou autophagie). Ce travail fait actuellement l'objet d'un projet de collaboration avec ONCOMEDICS, société spécialisée dans le traitement personnalisé du cancer.

Nos travaux ont permis une meilleure compréhension du CCR et surtout des mécanismes liés aux NTs et à l'autophagie quant à la survie cellulaire. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives en termes de stratégie thérapeutique et pourrait ainsi contribuer à une meilleure prise en charge des patients atteints d'un CCR.

ANNEXES

ANNEXE 1

L'ensemble de ce travail de thèse fait actuellement l'objet d'un article soumis à Journal of Cellular and Molecular Medicine.

Dual inhibition of BDNF/TrkB and autophagy: a promising therapeutic approach for colorectal cancer

Clément Mazouffre[1], Aurélie Perraud[1,2], Sophie Geyl[1], Sabrina Blondy[1], Marie-Odile Jauberteau[1], Muriel Mathonnet[1,2†] and Mireille Verdier[1†*].

Key words: colorectal cancer, neurotrophins, autophagy, survival

Dual inhibition of BDNF/TrkB and autophagy: a promising therapeutic approach for colorectal cancer

Clément Mazouffre[1], Aurélie Perraud[1.2], Sophie Geyl[1], Sabrina Blondy[1], Marie-Odile Jauberteau[1], Muriel Mathonnet[1.2†] and Mireille Verdier[1†*].

1: Université de Limoges, Laboratoire EA 3842, Homéostasie cellulaire et Pathologies, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges cedex, France.

2: CHU de Limoges, Service de chirurgie digestive générale et endocrinienne, 2 rue Martin Luther King, 87042 Limoges cedex, France.

† Equal contribution

* To whom correspondence should be addressed: mireille.verdier@unilim.fr

Mireille VERDIER
EA 3842 Faculté de Médecine,
2, rue du Docteur Marcland 87025 LIMOGES cedex, France
Tel: +33 555 43 58 49 ; Fax : +33 555 43 59 83

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the most common digestive cancer in the Western world. Despite effective therapies, resistance and/or recurrence frequently occur. The present study investigated the impact of two survival pathways— neurotrophic factors (TrkB/BDNF) and autophagy—on cell fate and tumor evolution. *In vitro* studies were performed on two CRC cell lines, SW480 (primary tumor) and SW620 (lymph node invasion), which were also used for subcutaneous xenografts on a nude mouse model. In addition, the presence of neurotrophic factors (NTs) and autophagy markers were assessed in tissue samples representative of different stages. On the basis of our previous study (which demonstrated that TrkB overexpression is associated with prosurvival signaling in CRC cells), we pharmacologically inhibited NTs pathways with K252a. As expected, an inactivation of the PI3K/AKT pathway was observed and CRC cells initiated autophagy. Conversely, blocking the autophagic flux with chloroquine or with ATG5-siRNA overactivated TrkB/BDNF signaling. *In vitro*, dual inhibition improved the effictiveness of single treatment by significantly reducing metabolic activity and enhancing PARP cleavage. These findings were accentuated *in vivo,* in which dual inhibition induced a spectacular reduction in tumor volume following long-term treatment (21 days for K252a and 12 days for CQ). Finally, significant amounts of phospho-TrkB and LC3II were found in the patients' tissues, highlighting their relevance in CRC tumor biology. Taken together, our results show that targeting NTs and autophagy pathways potentially constitutes a new therapeutic approach for CRC.

Keywords: colorectal cancer, neurotrophins, autophagy, therapy

Introduction

Colorectal cancer (CRC) represents the second cause of cancer-related mortality in developed countries (Jemal et al., 2011). In accordance with the UICC TNM classification (Obrocea et al., 2011), CRC is categorized into 5 stages (0 to IV), which expand into several subdivisions according to the degree of severity and metastasis. Whereas surgery and chemotherapy are more efficient on low-grade stages, there is no curative treatment for patients with advanced-stage CRC, and mortality remains very high because of the resistance of cancer cells, resulting in treatment avoidance (Housman et al., 2014). This aggressiveness could rely on uncontrolled growth factors pathway activation. Among them, neurotrophins (NTs) i.e. NGF, BDNF, NT3, NT 4/5, initially characterized in the nervous system (Levi-Montalcini and Cohen, 1956), fixes a specific high-affinity, receptor—called Trk (tropomyosin receptor kinase) type A, B, and C respectively. Each subtype occurs as full-length (145 kDa) or truncated (95 kDa) forms. NTs primarily promote cell survival and differentiation (Patapoutian and Reichardt, 2001) by activating either the PI3K/AKT (phosphatidylinositide 3 kinase/Akt) and/or MAPK (mitogenic activated protein kinase) and/or the PLC-γ (phospholipase C gamma) pathway (Friedman and Greene, 1999b). TrkB expression and activation have been described for several types of cancers such as lymphomas, breast, lung cancers *etc…,* as reported by our team and others (Akil et al., 2011; Au et al., 2009; Bai et al., 2015; Dubanet et al., 2015; Jia et al., 2015; Kim et al., 2015; Sclabas et al., 2005; Zhang et al., 2016). For CRC, we previously identified the BDNF/TrkB axis as a prosurvival pathway (Akil et al., 2011). Given its description as a potential target for anticancer therapy (Akil et al., 2016; Roesler et al., 2011), the use of the Trk inhibitor K252a (Tapley et al., 1992b) might result in the inactivation of TrkB signaling and induce a cellular response including cell death (Dubanet et al., 2015). However, its effectiveness could be

reduced by other cell survival mechanisms. Among these mechanisms, autophagy should be considered because it shares a common actor with TrkB signaling, the mTOR protein, downstream of the PI3K/AKT pathway.

Autophagy is a self-recycling process occurring in eukaryotic cells in order to maintain homeostasis under basal conditions which is greatly enhanced under stress (Mizushima, 2005). It allows the degradation of altered cellular components via sequestration in autophagosomes, which merge with lysosomes to form the autophagolysosome (Han et al., 2015; Kroemer et al., 2010). Several specific autophagic genes called *ATG* (AuTophagy-related Genes) are involved in the active process. The most important are *ATG6* (called Beclin1 in mammals), *ATG5,* and *ATG8*, called microtubule-associated protein light chain 3 or LC3 in mammals (Lorin et al., 2008). When LC3-I (cytosolic) combines with the autophagosome membrane, it is converted into the phosphatidylethanolamine-linked (PE) autophagosomal form - LC3II -, which is a commonly used autophagic marker (Kabeya et al., 2000; Klionsky et al., 2016). Although the precise role of autophagy in cancer remains ambiguous, it is considered as a prosurvival process, allowing cell retention under stress conditions (metabolic or oxidative) especially in late stages. (Galluzzi et al., 2015). Furthermore, autophagy could be responsible for the resistance of cancer cells to therapy, as already reported for CRC [26]–[28]. Therefore, its inhibition could assist in promoting cancer cell death (Burada et al., 2015; Sakitani et al., 2015; Wang et al., 2016a) and represent a major challenge for the improvement of existing treatments (Sasaki et al., 2010a). Indeed, a recent study show that inhibition of autophagy prevent the development and progression of colorectal cancer in patients (Lévy et al., 2015).

The present study investigated the dual role of NTs and autophagy pathways in two CRC cell lines representative of different stages. The therapeutic potential of twin inhibition

evidenced *in vitro* was checked and magnified *in vivo* on grafted animal. On the basis of our preliminary results, which confirmed the activation of both pathways in patients, this double therapeutic inhibition could be of considerable interest in the treatment of CRC.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

K252a (Alomone Labs, Jerusalem, Israel), chloroquine (CQ, Sigma, St. Quentin Fallavier, France), and rapamycin (Sigma) were used for NT, autophagy, and mTOR inhibition, respectively. The primary antibodies used for Pan-AKT (#2920), phospho-AKT (#4060), mTOR (#2972), phospho-mTOR (#2971), Beclin-1 (#3738), ATG5 (#2630), and LC3 (#2763) were obtained from Cell Signaling Technology (Saint Quentin Yvelines, France). Other primary antibodies were TrkB (610101, BD Biosciences), phospho-TrkB (ABN1381, Millipore, Fontenay-Sous-Bois, France), BDNF (sc-546, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), PARP (sc-8007, Santa Cruz), and actin (A5441, Sigma).

Secondary antibodies were goat HRP conjugated with anti-rabbit IgG (DAKO, Les Ulis, France) or with anti-mouse IgG (DAKO). Others were dyed with Alexa Fluor 594 nm conjugated with anti-rabbit IgG (Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA) or with Alexa Fluor 488 nm conjugated with anti-mouse IgG. DAPI was purchased from Sigma.

Cell culture, transfection, and treatments

SW480 and SW620 were obtained from American Type Cell Collection (ATCC/LGC promochem, Molsheim, France), authenticated by the seller and cultured as previously described (Akil et al., 2011) in RPMI 1640 medium (Gibco Life Technologies, Paisley, UK). SW480 was a primary CRC-derived cell line (i.e., stage II), whereas SW620 was derived from the lymph node (i.e., stage III) of the same patient. Cells were used when they reached 80% subconfluence. Cell cultures were used for a maximum of 10 passages.

INTERFERIN transfection reagent (Polyplus, Cell Signaling Technology) was used for siRNA transfection. In total, 200,000 cells per well were transfected in 6-well plates with either 20 nM of negative control or ATG5 siRNA (Cell Signaling Technology). After 72 h with fresh medium, the cells were washed and recovered as described before. Silencing was confirmed by western blotting.

Metabolic activity analysis

Metabolic activity was determined with the MTT assay (CellTiter 96 Aqueous One solution Cell Proliferation Assay, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) following supplier instructions.

Western blot analysis

After appropriate treatments, cells were collected, incubated for 15 min at 4°C with RIPA lysis buffer, sonicated and centrifuged for 20 min at 14,000 × *g* at 4°C. Supernatants were collected, and the protein concentration was determined with the Bradford assay (Sigma). Western blot analysis was conducted as described before (Akil et al., 2011). Band intensities were determined by densitometry using ImageJ software (NIH Bethesda, MD, USA).

Indirect immunofluorescence

The experiments were realized as described previously (Akil et al., 2011) and analyzed using confocal microscopy (LSM 510 META, Zeiss). Images were processed with the ZEN software application, and surface plots of the fluorescence data were generated with the image processing program ImageJ.

Quantitative RT-PCR

RNA extraction was performed with the RNeasy mini kit according to manufacturer recommendations (Qiagen, Courtaboeuf, France). A high-capacity cDNA reverse transcription kit (Thermofisher) was used and PCR reactions were realized with TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Thermofisher) with appropriate primers and probes as described previously (Akil et al., 2011). Results were obtained with the StepOnePlus Real Time PCR System (Thermofisher). All cycle thresholds (Ct) were normalized to *HPRT1* transcripts, and the relative quantities were calculated (untreated cells vs. treated cells).

Mice xenografts and treatments

All animal studies were conducted in accordance with the guidelines established by the regional Institutional Animal Care and Use Committee (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin n°87-005). Seven-week-old female NMRI-nude mice (Janvier Labs, St Berthevin, France) were subcutaneously injected with 1×10^6 cells. Weekly length (L) and width (W) measurements were taken to track tumor growth, and the tumor volume was determined with the following formula: volume = $[L \times W (L+W)] \pi/12$.

Once the tumor volume reached 300 mm^3 (day 0), mice were divided into groups (control, K252a, CQ, and K252a+CQ), with n > 3 mice per group. A physiological saline solution of K252a (0.5 mg/kg) was administered intraperitoneally every 3 days for 21 days as described in [30]. CQ was administered intraperitoneally (10 mg/kg) every 2 days for 12 days, following a modified version of the protocol used in (Lefort et al., 2015; Sasaki et al., 2010b). Non-treated mice received a PBS injection every 3 days. At the end of the treatment, the animals were sacrificed and the tumors were recovered.

Patient samples

A total of 12 patients (men from 70 to 88 years old), who underwent CRC resection at Limoges University Hospital (France) between March 2011 and April 2014, were enrolled in this retrospective study, according to the Declaration of Helsinki. Exclusion criteria were applied as described before [33]. Tissue collection was approved by the local ethics committee ('Comité de Protection des Personnes, Sud Ouest Outre Mer'; CPP SOOM4; number DC-2008-604). 30 mg of tumoral tissue were homogenized with ceramic bead in RIPA buffer, using Precellys mixer (MK 14 Precellys, Bertin Technology, Toulouse, France; 5,500 rotations/second) and then centrifuged. The protein-containing supernatants were recovered and stored at −80°C until western blot analysis.

Statistics

All analyses were performed with Statview 5.0 software (Abacus Concepts, Piscataway, USA) and the ANOVA test. A *p*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

1- Inhibition of BDNF/TrkB signaling induced autophagy in CRC cell lines

Since we previously demonstrated that CRC cells activate survival and proliferative loop through BDNF/TrkB signaling [8], we investigated here the consequences of NT inhibition in SW480 and SW620 cells cultured for 3 h with 100 nM K252a. Compared with control cells, a significant increase in the expression of BDNF transcripts (x16.8, $p < 0.001$), TrkB transcripts encoding the full length (145 kDa, x2.9, $p < 0.001$) and the truncated form (95 kDa, x24, $p < 0.001$) were observed in SW480 (i.e., stage II) treated with K252a (**Fig. 1A**). For SW620 (i.e., stage III), a similar significant enhancement was only observed for the truncated TrkB (x3, $p < 0.01$). Protein levels confirmed the qPCR results for both TrkB forms, in both cell lines (full length, x6 in SW480 and x3 in SW620, $p < 0.001$; truncated, x35 for SW480 and x5 for SW620, $p < 0.001$; **Fig. 1B**). The elevated transcription rate for BDNF observed for SW480 cell line was slightly confirmed by western blot analysis (**Fig. 1B**). Since, both technics evaluated intracellular BDNF, we assessed the secreted form and its ability to bind TrkB. BDNF quantification in the culture medium failed to exhibit significant variations between treated and control conditions in the two cell lines (**data not shown**). However, colocalization of BDNF with TrkB was increased after K252a treatment, especially in SW480 cells, (**Fig. 1C**), suggesting that BDNF was able to interact with TrkB, even in the presence of K252a. Nevertheless, this enhanced receptor expression as well as the BDNF/TrkB membrane colocalisation failed to activate the downstair pathway, as evidenced by the decrease in phospho-TrkB, phospho-AKT and phospho-mTOR ($p < 0.001$ for both cell lines and for the 3 proteins, **Fig.1B**), highlighting the survival inhibition of this pathway, which we expected to occur with K252a.

As we previously reported for glioblastoma (Jawhari et al., 2016; manuscript in revision),

autophagy can substitute to NTs signaling in a short time (less than 24 h). Here, a decrease in mTOR phosphorylation during K252a treatment (**Fig. 1B**) was compatible with autophagy activation. This result was accompanied by an increase in Beclin1 (x3, $p < 0.001$ for SW480; x1.3 $p < 0.05$ for SW620) and ATG5 expression (x5, $p < 0.001$ for SW480; x1.2, $p < 0.05$ for SW620; **Fig. 1D**). In addition, we demonstrated the conversion of cytosolic LC3 I into PE-linked LC3 II, one of the most widely used autophagic markers (LC3-II/LC3-I, x2 for both cell lines, $p < 0.001$; **Fig. 1D**). These results were confirmed through punctate localization of endogenous LC3 to autophagosomes with K252a treatment (**Fig. 1E**). By using an inhibitor of autophagic flow, chloroquine (CQ), we evidenced that autophagy was a functional process, as confirmed by an increased LC3II/LC3I ratio ($p < 0.001$ for both cell lines; **Fig. 1D**). In conclusion, during TrkB/BDNF inhibition, a functional autophagic process was activated. SW480 cells seemed to be more likely to undergo autophagy than SW620 cells. Because the inhibition of NTs signaling potentiated autophagy, we investigated whether the reverse was true and we verified the TrkB/BDNF activation when autophagy was inhibited.

2- Inhibition of autophagy induced BDNF/TrkB pathway activation in CRC cell lines

Autophagy was inhibited either pharmacologically with CQ or genetically with ATG5-siRNA. The use of CQ increased significatively BDNF and full-length TrkB transcripts regardless of the cell line (**Fig. 2A**), which was confirmed at the protein level for both proteins and cell lines ($p < 0.001$; **Fig. 2B**). Evaluation of secreted BDNF detected only slight enhancement in SW480 (**data not shown**), consistent with the ability of BDNF to bind to TrkB that we observed in both cell lines (**Fig. 2C**). The suggested downstream activation of the NTs signaling was confirmed by the increase of phosphorylated form of TrkB (x2.5 for SW480 and x3.5 for SW620; $p < 0.001$), AKT (x4 for SW480 and x9 for SW620; $p < 0.001$)

and mTOR (x7 for SW480 and x4 for SW620; $p < 0.001$; **Fig. 2B**).

To avoid the potential side effects of CQ, autophagy was also inhibited using ATG5-siRNA. The efficiency of siRNA was assessed by the decrease in ATG5 expression and LC3-II/LC3-I ratio (**Fig. 3A:** loss of almost 60% for SW480 and 50% for SW620; $p < 0.001$). As observed with CQ, the genetic autophagy downregulation resulted in increased expression of BDNF (x5 for SW480 and SW620; $p < 0.001$), phospho-TrkB (x2.4 for SW480; $p < 0.001$ and x1.2 for SW620; $p < 0.01$), and the downstream effectors phospho-AKT (around x2 for SW480 and SW620; $p < 0.001$) and phospho-mTOR (x2.5 for SW480 and x4.5 for SW620; $p < 0.001$; **Fig. 3B**). These results emphasize that NTs signaling was activated when autophagy was blocked, thereby ensuring survival. Moreover, this relay seemed to be more loaded in primary CRC-derived cell lines (i.e., SW480) because of the special expression enhancement of FL TrkB and phopspho-TrkB ($p < 0.001$).

3- Targeting both the TrkB/BDNF and the autophagy pathways jeopardized CRC cell line survival

Because CRC cells used both the NTs and the autophagy to ensure their survival, dual inhibition was implemented to potentially sensitize cells to death. Although we failed to detect any change after 3 h of treatment (**data not shown**), significant modifications were identified after 72 h (**Fig. 4A**). Even if the separate inhibition affected metabolic activity, it decreased more importantly with dual treatment (loss of 30% for SW480, $p < 0.01$, and loss of 65 % for SW620, $p < 0.001$). To link this cytotoxicity to apoptotic cell death, we evaluated PARP cleavage under the same conditions (**Fig. 4B**) and showed a greater PARP cleavage when cells were treated with K252a + CQ ($p < 0.01$).

4- Dual inhibition of TrkB/BDNF and autophagy induced a spectacular decrease in tumor growth

Because the *in vitro* results indicated that dual inhibition was more effective than single inhibition, we checked the effectiveness of this dual treatment on *in vivo* tumors developed in nude mice. The K252a significantly decreased tumor volume compared with control xenografts in both cell lines after 21 days of treatment (loss of 50%, $p < 0.001$ for SW480 and loss of 45%, $p < 0.05$ for SW620; **Fig. 5A and 5B**). On another hand, the CQ did not induce a significant decrease in tumor volumes even after 12 days of treatment. At the opposite, the dual inhibition induced a significant reduction in tumor volume compared with control after 21 days of treatment (decrease of 95% for SW480, $p < 0.001$, and of 75% for SW620, $p < 0.01$). More surprisingly, 40% of the tumors in the case of SW480 and of 25% of the tumors in the case of SW620 totally disappeared. Finally, tumors from SW480 xenografts were more sensitive to dual treatment than those from SW620 xenografts.

5- Relevance of neurotrophins and autophagy as potential targets in CRC patients

To extend these results to CRC patients, NTs and autophagy markers expression was evaluated in tissue samples obtained from different stage tumors (3 patients per stage). An increase in phospho-TrkB and phospho-AKT was observed, highlighting the activation of these pathways. Moreover, the phosphorylation rate seemed dependent on the stage of the CRC, with an increase observed for advanced stages, especially in stage III and stage IV ($p < 0.001$) compared to stage 0/I. In addition, the LC3II/LC3I ratio also varied depending on stage, exhibiting increases in advanced stages (**Fig. 6**). These data emphasize the specific high level of TrkB expression and activation as well as the occurrence of autophagy in tumoral cells and corroborate the potential role of these signaling pathways in CRC aggressiveness.

Discussion

Because CRC stays a world problem, new therapeutic targets are largely needed. This study focuses on inhibition of NTs (TrkB/BDNF) and/or autophagy, which are two survival-signaling pathways and shows the efficiency of the twin treatment, which largely contribute to reduce tumor growth **(Figure 7)**.

Overexpression of TrkB and BDNF constitute poor prognostic factors of tumor aggressiveness in various cancers (Akil et al., 2011; Dubanet et al., 2015; Fauchais et al., 2008; Sclabas et al., 2005; Vanhecke et al., 2011). This axis is also associated with the proliferation, migration, and invasion in the case of peritoneal carcinomatosis [36] and constitutes an autocrine and paracrine loop survival in stress response, as we previously demonstrated in CRC (Akil et al., 2011). In the present work, we used the pan-Trk inhibitor (K252a), in the primary CRC-derived cell line (SW480) and in the lymph-node-derived cell line (SW620). We observed the transcriptional and protein overexpression of TrkB and BDNF, which, even when binding together, failed to activate the AKT/mTOR pathway. This enhancement of both NT and receptor probably took place to try to restore this pathway. These results are consistent with previous reports, suggesting that K252a, although unable to block BDNF and TrkB interaction, is able to block downstream signaling (Nye et al., 1992). Nevertheless, this reduced signaling failed to induce a significant cytotoxicity, especially in SW480, suggesting the involvement of a different cell survival process.

Among them, autophagy implication in CRC survival and in therapy resistance has already been shown (Burada et al., 2015; Sakitani et al., 2015; Sato et al., 2007; Yang et al., 2013). Here, we showed that inhibition of NTs with K252a resulted in activation of autophagy to ensure cell survival. A similar protective effect of autophagy has also been reported when the EGFR pathway is inhibited with erlotinib in non-small-cell lung cancer (Li et al., 2013) or

with anti-EGFR in CRC (Chen et al., 2016). Moreover, we described a similar compensatory effect of autophagy in response to hypoxia when TrkC signaling was reduced in glioblastoma (Jawhari et al., 2016, manuscript in revision). These results underscore the interplay between growth factors signaling (NTs) and autophagy.

Subsequently, we used either chloroquine (CQ), a classical autophagic flux-blocking molecule (Yang et al., 2013), or siRNA ATG5 (to counteract the well-known toxicity of CQ (Janku et al., 2011)) to test the reciprocal effect of autophagy inhibition on TrkB/BDNF signaling. Both approaches increased NTs transcripts and proteins expression as well as subsequent AKT/mTOR signaling, demonstrating the activation of this pathway. Therefore, autophagy inactivation induced the activation of the TrkB/BDNF survival pathway.

The dual inhibition of NTs and autophagy potentiated the effects of the single molecules *in vitro*, especially to induce apoptosis but also, in a spectacular way, *in vivo* on tumor growth. Similar positive effects of dual targetting efficiency have been described *in vitro* and *in vivo* (Cui et al., 2014; Fan et al., 2015; O'Donovan et al., 2015). Ongoing clinical trials already began in CRC, with the FOLFOX/bevacizumab/hydroxychloroquine study (clinical trial NCT01206530) for example. Recently, the use of CQ was considered as an adjunct to chemotherapy (Pascolo, 2016) and inhibition of autophagy is one last option to over come the RTK resistance (Aveic and Tonini, 2016) reinforcing the use of dual inhibition to fight cancer.

Our study also revealed a difference between SW480 and SW620, already described in term of morphology, BrdU labeling index, and apoptosis susceptibility (Hewitt et al., 2000). SW480 presents a more important autophagy basal rate, probably due to their capacity to resist to a lower nutritional supply, due to defective vascularization frequently observed in primary tumor from which they come from (Diaz-Cano, 2012). This hypothesis is in

accordance with their higher sensitivity to the inhibition of autophagy, which induces NTs activation. So, targetting both autophagy and NTs in CRC primary tumors will be more effective, as observed *in vivo*. Moreover, an increased resistance of SW620 against treatments also suggests that other signaling pathways might be activated, in accordance with their capacity to adapt their behavior to different environment (i.e., lymph node area).

Finally, the presence of phospho-TrkB and LC3II proteins was confirmed and increased with the stages of CRC in patient tissues. Because an excessive autophagic response was linked to metastasis and poor prognosis (Giatromanolaki et al., 2010) and an increased TrkB expression enhanced the malignant potential in terms of proliferation, migration, invasion, and anoikis inhibition in CRC cells (Fujikawa et al., 2012), these two pathways constitute potential therapeutic targets.

Acknowledgments

C. Mazouffre received a fellowship from the Conseil Régional du Limousin and S. Geyl received a fellowship from the Agence Régionale de Santé Limousin (ARS). Additional financial support was provided by La Ligue Contre le Cancer (Comité du Limousin) and by Le Comité d'Orientation de la Recherche sur le Cancer (CORC) en Limousin. The funding institutions had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

CM, AP, SG and SB performed the research; MOJ, MM and MV designed the research study; MM and MV analyzed the data; CM, AP and MV wrote the paper.

Conflict of interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

Ahmed, D., Eide, P.W., Eilertsen, I.A., Danielsen, S.A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G.E., and Lothe, R.A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. Oncogenesis *2*, e71.

Aita, V.M., Liang, X.H., Murty, V.V., Pincus, D.L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., Gilliam, T.C., and Levine, B. (1999). Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. Genomics *59*, 59–65.

Akil, H., Perraud, A., Mélin, C., Jauberteau, M.-O., and Mathonnet, M. (2011). Fine-Tuning Roles of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor, TrkB and Sortilin in Colorectal Cancer Cell Survival. PLOS ONE *6*, e25097.

Akil, H., Perraud, A., Jauberteau, M.-O., and Mathonnet, M. (2016). Tropomyosin-related kinase B/brain derived-neurotrophic factor signaling pathway as a potential therapeutic target for colorectal cancer. World J. Gastroenterol. *22*, 490–500.

Albaugh, P., Fan, Y., Mi, Y., Sun, F., Adrian, F., Li, N., Jia, Y., Sarkisova, Y., Kreusch, A., Hood, T., et al. (2012). Discovery of GNF-5837, a Selective TRK Inhibitor with Efficacy in Rodent Cancer Tumor Models. ACS Med. Chem. Lett. *3*, 140–145.

Alderson, R.F., Curtis, R., Alterman, A.L., Lindsay, R.M., and DiStefano, P.S. (2000). Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro. Brain Res. *871*, 210–222.

Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., et al. (2005). Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. Dev. Camb. Engl. *132*, 1443–1451.

Anitei, M.-G., Zeitoun, G., Mlecnik, B., Marliot, F., Haicheur, N., Todosi, A.-M., Kirilovsky, A., Lagorce, C., Bindea, G., Ferariu, D., et al. (2014). Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *20*, 1891–1899.

Ardini, E., Menichincheri, M., Banfi, P., Bosotti, R., De Ponti, C., Pulci, R., Ballinari, D., Ciomei, M., Texido, G., Degrassi, A., et al. (2016). Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications. Mol. Cancer Ther. *15*, 628–639.

Arévalo, J.C., and Wu, S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! Cell. Mol. Life Sci. CMLS *63*, 1523–1537.

Armaghany, T., Wilson, J.D., Chu, Q., and Mills, G. (2012). Genetic Alterations in Colorectal Cancer. Gastrointest. Cancer Res. GCR *5*, 19–27.

Arora, A., and Scholar, E.M. (2005). Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. J. Pharmacol. Exp. Ther. *315*, 971–979.

Au, C.W.H., Siu, M.K.Y., Liao, X., Wong, E.S.Y., Ngan, H.Y.S., Tam, K.F., Chan, D.C.W., Chan, Q.K.Y., and Cheung, A.N.Y. (2009). Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in ovarian cancers - Effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome. Cancer Lett. *281*, 151–161.

Ávalos, Y., Canales, J., Bravo-Sagua, R., Criollo, A., Lavandero, S., and Quest, A.F.G. (2014). Tumor suppression and promotion by autophagy. BioMed Res. Int. *2014*, 603980.

Aveic, S., and Tonini, G.P. (2016). Resistance to receptor tyrosine kinase inhibitors in solid tumors: can we improve the cancer fighting strategy by blocking autophagy? Cancer Cell Int. *16*, 62.

Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. J. Cell Biol. *182*, 685–701.

Bai, H., Li, H., Li, W., Gui, T., Yang, J., Cao, D., and Shen, K. (2015). The PI3K/AKT/mTOR pathway is a potential predictor of distinct invasive and migratory capacities in human ovarian cancer cell lines. Oncotarget *6*, 25520–25532.

Barbacid, M. (1995). Neurotrophic factors and their receptors. Curr. Opin. Cell Biol. *7*, 148–155.

Barde, Y.A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. EMBO J. *1*, 549–553.

Barderas, R., Villar-Vázquez, R., Fernández-Aceñero, M.J., Babel, I., Peláez-García, A., Torres, S., and Casal, J.I. (2013). Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis. Sci. Rep. *3*.

Bayas, A., Kruse, N., Moriabadi, N.F., Weber, F., Hummel, V., Wohleben, G., Gold, R., Toyka, K.V., and Rieckmann, P. (2003). Modulation of cytokine mRNA expression by brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells. Neurosci. Lett. *335*, 155–158.

Beck, B., and Blanpain, C. (2013). Unravelling cancer stem cell potential. Nat. Rev. Cancer *13*, 727–738.

Bellanger, C., Dubanet, L., Lise, M.-C., Fauchais, A.-L., Bordessoule, D., Jauberteau, M.-O., and Troutaud, D. (2011). Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. PloS One *6*, e27213.

Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N.C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. Cell *126*, 107–120.

Bensaad, K., Cheung, E.C., and Vousden, K.H. (2009). Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. EMBO J. *28*, 3015–3026.

Besser, M., and Wank, R. (1999). Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *162*, 6303–6306.

Biffo, S., Offenhäuser, N., Carter, B.D., and Barde, Y.A. (1995). Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. Dev. Camb. Engl. *121*, 2461–2470.

Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., et al. (2013). Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. Immunity *39*, 782–795.

Blum, R., and Konnerth, A. (2005). Neurotrophin-Mediated Rapid Signaling in the Central Nervous System: Mechanisms and Functions. Physiology *20*, 70–78.

Boman, B.M., and Huang, E. (2008). Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *26*, 2828–2838.

Bouvier, A.-M., Latournerie, M., Jooste, V., Lepage, C., Cottet, V., and Faivre, J. (2008). The lifelong risk of metachronous colorectal cancer justifies long-term colonoscopic follow-up. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 *44*, 522–527.

Bracho-Valdés, I., Moreno-Alvarez, P., Valencia-Martínez, I., Robles-Molina, E., Chávez-Vargas, L., and Vázquez-Prado, J. (2011). mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. IUBMB Life *63*, 896–914.

Brech, A., Ahlquist, T., Lothe, R.A., and Stenmark, H. (2009). Autophagy in tumour suppression and promotion. Mol. Oncol. *3*, 366–375.

Brodeur, G.M., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Iyer, R., Varela, C.R., Light, J.E., Kolla, V., and Evans, A.E. (2009). Trk Receptor Expression and Inhibition in Neuroblastomas. Clin. Cancer Res. *15*, 3244–3250.

Buczacki, S., Davies, R.J., and Winton, D.J. (2011). Stem cells, quiescence and rectal carcinoma: an unexplored relationship and potential therapeutic target. Br. J. Cancer *105*, 1253–1259.

Burada, F., Nicoli, E.R., Ciurea, M.E., Uscatu, D.C., Ioana, M., and Gheonea, D.I. (2015). Autophagy in colorectal cancer: An important switch from physiology to pathology. World J. Gastrointest. Oncol. *7*, 271–284.

Caroleo, M.C., Costa, N., Bracci-Laudiero, L., and Aloe, L. (2001). Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. J. Neuroimmunol. *113*, 193–201.

Cazorla, M., Prémont, J., Mann, A., Girard, N., Kellendonk, C., and Rognan, D. (2011). Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. J. Clin. Invest. *121*, 1846–1857.

Chao, M.V. (2003). Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. Nat. Rev. Neurosci. *4*, 299–309.

Chen, A. (2013). Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. Mol. Med. Rep.

Chen, N., and Karantza, V. (2011). Autophagy as a therapeutic target in cancer. Cancer Biol. Ther. *11*, 157–168.

Chen, Y., Zeng, J., Cen, L., Chen, Y., Wang, X., Yao, G., Wang, W., Qi, W., and Kong, K. (2009). Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system. J. Int. Med. Res. *37*, 281–288.

Chen, Z., Gao, S., Wang, D., Song, D., and Feng, Y. (2016). Colorectal cancer cells are resistant to anti-EGFR monoclonal antibody through adapted autophagy. Am. J. Transl. Res. *8*, 1190–1196.

Chiacchiera, F., and Simone, C. (2009). Inhibition of p38alpha unveils an AMPK-FoxO3A axis linking autophagy to cancer-specific metabolism. Autophagy *5*, 1030–1033.

Chittaranjan, S. [b1] (analytic), Bortnik, S. [b1 b4] (analytic), Dragowska, W.H. [b2] (analytic), JING XU [b1 b8] (analytic), Abeysundara, N. [b1] (analytic), Leung, A. [b1] (analytic), Go, N.E. [b1 b8] (analytic), Devorkin, L. [b1 b8] (analytic), Weppler, S.A. [b2] (analytic), Gelmon, K. [b2 b3 b5] (analytic), et al. (2014). Autophagy Inhibition Augments the Anticancer Effects of Epirubicin Treatment in Anthracycline-Sensitive and -Resistant Triple-Negative Breast Cancer (English). Clin Cancer Res Print *20*, 3159–3173.

Church, D.N., Midgley, R., and Kerr, D.J. (2013). Stage II colon cancer. Chin. Clin. Oncol. *2*, 16.

Clevers, H. (2004a). Wnt breakers in colon cancer. Cancer Cell *5*, 5–6.

Clevers, H. (2004b). At the crossroads of inflammation and cancer. Cell *118*, 671–674.

Clevers, H. (2006). Wnt/β-Catenin Signaling in Development and Disease. Cell *127*, 469–480.

Clevers, H., and Batlle, E. (2006). EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. Cancer Res. *66*, 2–5.

Codogno, P., and Meijer, A.J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. Cell Death Differ. *12 Suppl 2*, 1509–1518.

Coissieux, M.-M., Tomsic, J., Castets, M., Hampel, H., Tuupanen, S., Andrieu, N., Comeras, I., Drouet, Y., Lasset, C., Liyanarachchi, S., et al. (2011). Variants in the netrin-1 receptor UNC5C prevent apoptosis and increase risk of familial colorectal cancer. Gastroenterology *141*, 2039–2046.

Corradetti, M.N., and Guan, K.-L. (2006). Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? Oncogene *25*, 6347–6360.

Crighton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K.M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. Cell *126*, 121–134.

de la Cruz-Morcillo, M.A., García-Cano, J., Arias-González, L., García-Gil, E., Artacho-Cordón, F., Ríos-Arrabal, S., Valero, M.L., Cimas, F.J., Serrano-Oviedo, L., Villas, M.V., et al. (2013). Abrogation of the p38 MAPK α signaling pathway does not promote radioresistance but its activity is required for 5-Fluorouracil-associated radiosensitivity. Cancer Lett. *335*, 66–74.

Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000). Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. J. Cell Sci. *113 Pt 24*, 4441–4450.

Cuervo, A.M., and Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. Cell Res. *24*, 92–104.

Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., and Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. Science *305*, 1292–1295.

Cui, J., Hu, Y.-F., Feng, X.-M., Tian, T., Guo, Y.-H., Ma, J.-W., Nan, K.-J., and Zhang, H.-Y. (2014). EGFR inhibitors and autophagy in cancer treatment. Tumor Biol. *35*, 11701–11709.

Day, F.L., Jorissen, R.N., Lipton, L., Mouradov, D., Sakthianandeswaren, A., Christie, M., Li, S., Tsui, C., Tie, J., Desai, J., et al. (2013). PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *19*, 3285–3296.

De la Cruz-Morcillo, M.A., Berger, J., Sánchez-Prieto, R., Saada, S., Naves, T., Guillaudeau, A., Perraud, A., Sindou, P., Lacroix, A., Descazeaud, A., et al. (2016). p75 neurotrophin receptor and pro-BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma. Oncotarget *7*, 34480–34497.

De Roock, W., Claes, B., Bernasconi, D., De Schutter, J., Biesmans, B., Fountzilas, G., Kalogeras, K.T., Kotoula, V., Papamichael, D., Laurent-Puig, P., et al. (2010). Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. *11*, 753–762.

De Roock, W., De Vriendt, V., Normanno, N., Ciardiello, F., and Tejpar, S. (2011). KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol. *12*, 594–603.

Dechant, G., and Barde, Y.A. (1997). Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. Curr. Opin. Neurobiol. *7*, 413–418.

Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., et al. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. Cancer Cell *10*, 51–64.

Degirolamo, C., Modica, S., Palasciano, G., and Moschetta, A. (2011). Bile acids and colon cancer: Solving the puzzle with nuclear receptors. Trends Mol. Med. *17*, 564–572.

Deinhardt, K., and Jeanneteau, F. (2012). More Than Just an OFF-Switch: The Essential Role of Protein Dephosphorylation in the Modulation of BDNF Signaling Events. In Protein Phosphorylation in Human Health, C. Huang, ed. (InTech), p.

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

Diaz-Cano, S.J. (2012). Tumor Heterogeneity: Mechanisms and Bases for a Reliable Application of Molecular Marker Design. Int. J. Mol. Sci. *13*, 1951–2011.

Douillard, J.-Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., et al. (2013). Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. N. Engl. J. Med. *369*, 1023–1034.

Douma, S., van Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., van Garderen, E., and Peeper, D.S. (2004). Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. Nature *430*, 1034–1039.

Dubanet, L., Bentayeb, H., Petit, B., Olivrie, A., Saada, S., de la Cruz-Morcillo, M.A., Lalloué, F., Gourin, M.-P., Bordessoule, D., Faumont, N., et al. (2015). Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. Br. J. Cancer *113*, 934–944.

Duffy, A., Le, J., Sausville, E., and Emadi, A. (2015). Autophagy modulation: a target for cancer treatment development. Cancer Chemother. Pharmacol. *75*, 439–447.

Dunn, W.A. (1990). Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. J. Cell Biol. *110*, 1923–1933.

Dupont, J., Renou, J.P., Shani, M., Hennighausen, L., and LeRoith, D. (2002). PTEN overexpression suppresses proliferation and differentiation and enhances apoptosis of the mouse mammary epithelium. J. Clin. Invest. *110*, 815–825.

Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. Science *331*, 456–461.

Eide, F.F., Vining, E.R., Eide, B.L., Zang, K., Wang, X.Y., and Reichardt, L.F. (1996). Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *16*, 3123–3129.

English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., and Cobb, M.H. (1999). New insights into the control of MAP kinase pathways. Exp. Cell Res. *253*, 255–270.

Fan, M., Sun, J., Wang, W., Fan, J., Wang, L., Zhang, X., Yang, A., Wang, W., Zhang, R., and Li, J. (2014). Tropomyosin-related kinase B promotes distant metastasis of colorectal cancer through protein kinase B-mediated anoikis suppression and correlates with poor prognosis. Apoptosis Int. J. Program. Cell Death *19*, 860–870.

Fan, T.-F., Bu, L.-L., Wang, W.-M., Ma, S.-R., Liu, J.-F., Deng, W.-W., Mao, L., Yu, G.-T., Huang, C.-F., Liu, B., et al. (2015). Tumor growth suppression by inhibiting both autophagy and STAT3 signaling in HNSCC. Oncotarget *6*, 43581–43593.

Fanburg-Smith, J.C., and Miettinen, M. (2001). Low-affinity nerve growth factor receptor (p75) in dermatofibrosarcoma protuberans and other nonneural tumors: a study of 1,150 tumors and fetal and adult normal tissues. Hum. Pathol. *32*, 976–983.

de Farias, C.B., Heinen, T.E., dos Santos, R.P., Abujamra, A.L., Schwartsmann, G., and Roesler, R. (2012). BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. Biochem. Biophys. Res. Commun. *425*, 328–332.

Fauchais, A.-L., Lalloué, F., Lise, M.-C., Boumediene, A., Preud'homme, J.-L., Vidal, E., and Jauberteau, M.-O. (2008). Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 3027–3038.

Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. Annu. Rev. Pathol. *6*, 479–507.

Fearon, E.R., and Pierceall, W.E. (1995). The deleted in colorectal cancer (DCC) gene: a candidate tumour suppressor gene encoding a cell surface protein with similarity to neural cell adhesion molecules. Cancer Surv. *24*, 3–17.

Ferrara, N., Hillan, K.J., and Novotny, W. (2005). Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. Biochem. Biophys. Res. Commun. *333*, 328–335.

Flanagan, S.P. (1966). "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. Genet. Res. *8*, 295–309.

Florez-McClure, M.L., Linseman, D.A., Chu, C.T., Barker, P.A., Bouchard, R.J., Le, S.S., Laessig, T.A., and Heidenreich, K.A. (2004). The p75 neurotrophin receptor can induce autophagy and death of cerebellar Purkinje neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 4498–4509.

Frattini, M., Saletti, P., Romagnani, E., Martin, V., Molinari, F., Ghisletta, M., Camponovo, A., Etienne, L.L., Cavalli, F., and Mazzucchelli, L. (2007). PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. Br. J. Cancer *97*, 1139–1145.

Friedman, W.J., and Greene, L.A. (1999a). Neurotrophin signaling via Trks and p75. Exp. Cell Res. *253*, 131–142.

Friedman, W.J., and Greene, L.A. (1999b). Neurotrophin signaling via Trks and p75. Exp. Cell Res. *253*, 131–142.

Fujikawa, H., Tanaka, K., Toiyama, Y., Saigusa, S., Inoue, Y., Uchida, K., and Kusunoki, M. (2012). High TrkB expression levels are associated with poor prognosis and EMT induction in colorectal cancer cells. J. Gastroenterol. *47*, 775–784.

Furuta, S., Hidaka, E., Ogata, A., Yokota, S., and Kamata, T. (2004). Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. Oncogene *23*, 3898–3904.

Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J.M., Amaravadi, R.K., Baehrecke, E.H., Cecconi, F., Codogno, P., Debnath, J., Gewirtz, D.A., Karantza, V., et al. (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. EMBO J. *34*, 856–880.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science *313*, 1960–1964.

Galon, J., Fridman, W.-H., and Pagès, F. (2007). The Adaptive Immunologic Microenvironment in Colorectal Cancer: A Novel Perspective. Cancer Res. *67*, 1883–1886.

Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H.K., Berger, A., Lagorce, C., Lugli, A., Zlobec, I., Hartmann, A., Bifulco, C., et al. (2014). Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. J. Pathol. *232*, 199–209.

García-Mauriño, S., Alcaide, A., and Domínguez, C. (2012). Pharmacological control of autophagy: therapeutic perspectives in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. Curr. Pharm. Des. *18*, 3853–3873.

Gelino, S., and Hansen, M. (2012). Autophagy - An Emerging Anti-Aging Mechanism. J. Clin. Exp. Pathol. *Suppl 4*.

Genevois, A.-L., Ichim, G., Coissieux, M.-M., Lambert, M.-P., Lavial, F., Goldschneider, D., Jarrosson-Wuilleme, L., Lepinasse, F., Gouysse, G., Herceg, Z., et al. (2013). Dependence receptor TrkC is a putative colon cancer tumor suppressor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 3017–3022.

Ghaemimanesh, F., Ahmadian, G., Talebi, S., Zarnani, A.-H., Behmanesh, M., Hemmati, S., Hadavi, R., Jeddi-Tehrani, M., Farzi, M., Akhondi, M.M., et al. (2014). The effect of sortilin silencing on ovarian carcinoma cells. Avicenna J. Med. Biotechnol. *6*, 169–177.

Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Harris, A.L., Polychronidis, A., Gatter, K.C., and Sivridis, E. (2010). Prognostic relevance of light chain 3 (LC3A) autophagy patterns in colorectal adenocarcinomas. J. Clin. Pathol. *63*, 867–872.

González-Polo, R.-A., Boya, P., Pauleau, A.-L., Jalil, A., Larochette, N., Souquère, S., Eskelinen, E.-L., Pierron, G., Saftig, P., and Kroemer, G. (2005). The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. J. Cell Sci. *118*, 3091–3102.

Gotink, K.J., and Verheul, H.M.W. (2010). Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? Angiogenesis *13*, 1–14.

Gozuacik, D., and Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene *23*, 2891–2906.

Green, J.E., and Hudson, T. (2005). The promise of genetically engineered mice for cancer prevention studies. Nat. Rev. Cancer *5*, 184–198.

Groulx, J.-F., Khalfaoui, T., Benoit, Y.D., Bernatchez, G., Carrier, J.C., Basora, N., and Beaulieu, J.-F. (2012). Autophagy is active in normal colon mucosa. Autophagy *8*, 893–902.

Guo, D., Hou, X., Zhang, H., Sun, W., Zhu, L., Liang, J., and Jiang, X. (2011). More expressions of BDNF and TrkB in multiple hepatocellular carcinoma and anti-BDNF or K252a induced apoptosis, supressed invasion of HepG2 and HCCLM3 cells. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR *30*, 97.

Guo, J.Y., Xia, B., and White, E. (2013). Autophagy-Mediated Tumor Promotion. Cell *155*, 1216–1219.

Hallböök, F., Ibáñez, C.F., and Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary. Neuron *6*, 845–858.

Hammond, W.A., Swaika, A., and Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. Ther. Adv. Med. Oncol. *8*, 57–84.

Han, K., Kim, J., and Choi, M. (2015). Autophagy mediates phase transitions from cell death to life. Heliyon *1*, e00027.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Harel, L., Costa, B., and Fainzilber, M. (2010). On the death Trk. Dev. Neurobiol. *70*, 298–303.

Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev. *18*, 1926–1945.

Hayat, M.A. (2011). Stem Cells and Cancer Stem Cells, Volume 1: Stem Cells and Cancer Stem Cells, Therapeutic Applications in Disease and Injury: (Springer Science & Business Media).

Hayat, M.A. (2013). Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging: Volume 1 - Molecular Mechanisms (Academic Press).

Herrup, K., and Shooter, E.M. (1975). Properties of the beta-nerve growth factor receptor in development. J. Cell Biol. *67*, 118–125.

Hewitt, R.E., McMarlin, A., Kleiner, D., Wersto, R., Martin, P., Tsokos, M., Stamp, G.W., Stetler-Stevenson, W.G., and Tsoskas, M. (2000). Validation of a model of colon cancer progression. J. Pathol. *192*, 446–454.

Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., and Barde, Y.A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. Nature *344*, 339–341.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. Mol. Biol. Cell *20*, 1981–1991.

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., and Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. Cancers *6*, 1769–1792.

Høyer-Hansen, M., and Jäättelä, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. Cell Death Differ. *14*, 1576–1582.

Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., et al. (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. Mol. Cell *25*, 193–205.

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

Huang, S.-M., Lin, C., Lin, H.-Y., Chiu, C.-M., Fang, C.-W., Liao, K.-F., Chen, D.-R., and Yeh, W.-L. (2015). Brain-derived neurotrophic factor regulates cell motility in human colon cancer. Endocr. Relat. Cancer *22*, 455–464.

Huang, Y.T., Lai, P.C., Wu, C.C., Hsu, S.H., Cheng, C.C., Lan, Y.F., and Chiu, T.H. (2010). BDNF mediated TrkB activation is a survival signal for transitional cell carcinoma cells. Int. J. Oncol. *36*, 1469–1476.

Huerta, S., Harris, D.M., Jazirehi, A., Bonavida, B., Elashoff, D., Livingston, E.H., and Heber, D. (2003). Gene expression profile of metastatic colon cancer cells resistant to cisplatin-induced apoptosis. Int. J. Oncol. *22*, 663–670.

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell *115*, 577–590.

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

ISOZAKI, T., FUJITA, M., YAMADA, S., IMADOME, K., SHOJI, Y., YASUDA, T., NAKAYAMA, F., IMAI, T., and MATSUBARA, H. (2016). Effects of carbon ion irradiation and X-ray irradiation on the ubiquitylated protein accumulation. Int. J. Oncol. *49*, 144–152.

Janku, F., McConkey, D.J., Hong, D.S., and Kurzrock, R. (2011). Autophagy as a target for anticancer therapy. Nat. Rev. Clin. Oncol. *8*, 528–539.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. CA. Cancer J. Clin. *61*, 69–90.

Jia, S., Wang, W., Hu, Z., Shan, C., Wang, L., Wu, B., Yang, Z., Yang, X., and Lei, D. (2015). BDNF mediated TrkB activation contributes to the EMT progression and the poor prognosis in human salivary adenoid cystic carcinoma. Oral Oncol. *51*, 64–70.

Jiang, H., Cheng, D., Liu, W., Peng, J., and Feng, J. (2010). Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3. Biochem. Biophys. Res. Commun. *395*, 471–476.

Juhasz, G., and Neufeld, T.P. (2006). Autophagy: A Forty-Year Search for a Missing Membrane Source. PLOS Biol *4*, e36.

Jung, B., Smith, E.J., Doctolero, R.T., Gervaz, P., Alonso, J.C., Miyai, K., Keku, T., Sandler, R.S., and Carethers, J.M. (2006). Influence of target gene mutations on survival, stage and histology in sporadic microsatellite unstable colon cancers. Int. J. Cancer *118*, 2509–2513.

Jung, B., Gomez, J., Chau, E., Cabral, J., Lee, J.K., Anselm, A., Slowik, P., Ream-Robinson, D., Messer, K., Sporn, J., et al. (2009). Activin Signaling in Microsatellite Stable Colon Cancers Is Disrupted by a Combination of Genetic and Epigenetic Mechanisms. PLOS ONE *4*, e8308.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J. *19*, 5720–5728.

Kaplan, D.R., Martin-Zanca, D., and Parada, L.F. (1991a). Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. Nature *350*, 158–160.

Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V., and Parada, L.F. (1991b). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. Science *252*, 554–558.

Karanasios, E., Stapleton, E., Manifava, M., Kaizuka, T., Mizushima, N., Walker, S.A., and Ktistakis, N.T. (2013). Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. J. Cell Sci. *126*, 5224–5238.

Karim, B.O., and Huso, D.L. (2013). Mouse models for colorectal cancer. Am. J. Cancer Res. *3*, 240–250.

Karin, M. (1995). The Regulation of AP-1 Activity by Mitogen-activated Protein Kinases. J. Biol. Chem. *270*, 16483–16486.

Kawamura, N., Kawamura, K., Manabe, M., and Tanaka, T. (2010). Inhibition of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling suppresses choriocarcinoma cell growth. Endocrinology *151*, 3006–3014.

Kayali, A.G., Austin, D.A., and Webster, N.J. (2000). Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. Diabetes *49*, 1783–1793.

Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in Saccharomyces cerevisiae. J. Cell Biol. *152*, 519–530.

Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. Arch. Biochem. Biophys. *462*, 245–253.

Kim, J., Huang, W.-P., Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J. (2002). Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. J. Biol. Chem. *277*, 763–773.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat. Cell Biol. *13*, 132–141.

Kim, M.S., Lee, W.S., Jeong, J., Kim, S.-J., and Jin, W. (2015). Induction of metastatic potential by TrkB via activation of IL6/JAK2/STAT3 and PI3K/AKT signaling in breast cancer. Oncotarget *6*, 40158–40171.

Kim, W.K., Pyee, Y., Chung, H.-J., Park, H.J., Hong, J.-Y., Son, K.H., and Lee, S.K. (2016). Antitumor Activity of Spicatoside A by Modulation of Autophagy and Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells. J. Nat. Prod. *79*, 1097–1104.

Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. J. Cell Biol. *151*, 263–276.

Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., et al. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. Dev. Cell *5*, 539–545.

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy *12*, 1–222.

Konda, B., Shum, H., and Rajdev, L. (2015). Anti-angiogenic agents in metastatic colorectal cancer. World J. Gastrointest. Oncol. *7*, 71–86.

Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., and Peter, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. Nat. Cell Biol. *10*, 602–610.

Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 1004–1010.

Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. Mol. Cell *40*, 280–293.

Kwon, S., and Christian, J.L. (2011). Sortilin Associates with Transforming Growth Factor-β Family Proteins to Enhance Lysosome-mediated Degradation. J. Biol. Chem. *286*, 21876–21885.

Laderoute, K.R., Amin, K., Calaoagan, J.M., Knapp, M., Le, T., Orduna, J., Foretz, M., and Viollet, B. (2006). 5′-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Induced by Low-Oxygen and Glucose Deprivation Conditions Found in Solid-Tumor Microenvironments. Mol. Cell. Biol. *26*, 5336–5347.

Lai, M.-C., Chang, C.-M., and Sun, H.S. (2016). Hypoxia Induces Autophagy through Translational Up-Regulation of Lysosomal Proteins in Human Colon Cancer Cells. PLOS ONE *11*, e0153627.

de Lau, W., Barker, N., and Clevers, H. (2007). WNT signaling in the normal intestine and colorectal cancer. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *12*, 471–491.

Laurent-Puig, P., Agostini, J., and Maley, K. (2010). [Colorectal oncogenesis]. Bull. Cancer (Paris) *97*, 1311–1321.

Lawlor, M.A., and Alessi, D.R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? J. Cell Sci. *114*, 2903–2910.

Leach, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomäki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L.A., and Nyström-Lahti, M. (1993). Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cell *75*, 1215–1225.

Lee, J.W., Park, S., Takahashi, Y., and Wang, H.-G. (2010). The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. PloS One *5*, e15394.

Lefevre, J.H., Rodrigue, C.M., Mourra, N., Bennis, M., Flejou, J.-F., Parc, R., Tiret, E., Gespach, C., and Parc, Y.R. (2006). Implication of MYH in colorectal polyposis. Ann. Surg. *244*, 874-879-880.

Lefort, S., Joffre, C., Kieffer, Y., Givel, A.-M., Bourachot, B., Zago, G., Bieche, I., Dubois, T., Meseure, D., Vincent-Salomon, A., et al. (2015). Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. Autophagy *10*, 2122–2142.

Lessmann, V., Gottmann, K., and Malcangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. Prog. Neurobiol. *69*, 341–374.

Levi-Montalcini, R., and Cohen, S. (1956). IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF A NERVE GROWTH-STIMULATING AGENT ISOLATED FROM SNAKE VENOM*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *42*, 695–699.

Levine, B., and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? J. Clin. Invest. *115*, 2679–2688.

Lévy, J., Cacheux, W., Bara, M.A., L'Hermitte, A., Lepage, P., Fraudeau, M., Trentesaux, C., Lemarchand, J., Durand, A., Crain, A.-M., et al. (2015). Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. Nat. Cell Biol. *17*, 1062–1073.

Leystra, A.A., Deming, D.A., Zahm, C.D., Farhoud, M., Olson, T.J.P., Hadac, J.N., Nettekoven, L.A., Albrecht, D.M., Clipson, L., Sullivan, R., et al. (2012). Mice expressing activated PI3K rapidly develop advanced colon cancer. Cancer Res. *72*, 2931–2936.

Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S., and Kuwano, H. (2010). Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 *46*, 1900–1909.

Li, S.-S., Liu, J.-J., Wang, S., Tang, Q.-L., Liu, B.-B., and Yang, X.-M. (2014). Clinical significance of TrkB expression in nasopharyngeal carcinoma. Oncol. Rep. *31*, 665–672.

Li, Y., Lam, S., Mak, J.C., Zheng, C., and Ho, J.C. (2013). Erlotinib-induced autophagy in epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer. Lung Cancer Amst. Neth. *81*, 354–361.

Li, Z., Jaboin, J., Dennis, P.A., and Thiele, C.J. (2005). Genetic and Pharmacologic Identification of Akt as a Mediator of Brain-Derived Neurotrophic Factor/TrkB Rescue of Neuroblastoma Cells from Chemotherapy-Induced Cell Death. Cancer Res. *65*, 2070–2075.

Lim, S.-C., Hahm, K.-S., Lee, S.-H., and Oh, S.-H. (2010). Autophagy involvement in cadmium resistance through induction of multidrug resistance-associated protein and counterbalance of endoplasmic reticulum stress WI38 lung epithelial fibroblast cells. Toxicology *276*, 18–26.

Lin, L., and Baehrecke, E.H. (2015). Autophagy, cell death, and cancer. Mol. Cell. Oncol. *2*, e985913.

Liu, B., Bao, J.-K., Yang, J.-M., and Cheng, Y. (2013). Targeting autophagic pathways for cancer drug discovery. Chin. J. Cancer *32*, 113–120.

Löffler, A.S., Alers, S., Dieterle, A.M., Keppeler, H., Franz-Wachtel, M., Kundu, M., Campbell, D.G., Wesselborg, S., Alessi, D.R., and Stork, B. (2011). Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. Autophagy *7*, 696–706.

Lonze, B.E., and Ginty, D.D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. Neuron *35*, 605–623.

Lorin, S., Codogno, P., and Djavaheri-Mergny, M. (2008). [Autophagy: a new concept in cancer research]. Bull. Cancer (Paris) *95*, 43–50.

Luberg, K., Wong, J., Weickert, C.S., and Timmusk, T. (2010). Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. J. Neurochem. *113*, 952–964.

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 741–752.

Maiuri, M.C., Tasdemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J.M., Carnuccio, R., and Kroemer, G. (2009). Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. Cell Death Differ. *16*, 87–93.

Maiuri, M.C., Criollo, A., and Kroemer, G. (2010). Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. EMBO J. *29*, 515–516.

Majeski, A.E., and Dice, J.F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. Int. J. Biochem. Cell Biol. *36*, 2435–2444.

Martin-Zanca, D., Mitra, G., Long, L.K., and Barbacid, M. (1986). Molecular characterization of the human trk oncogene. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *51 Pt 2*, 983–992.

Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., et al. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. Cell *137*, 1062–1075.

Mathonnet, M., Perraud, A., Christou, N., Akil, H., Melin, C., Battu, S., Jauberteau, M.-O., and Denizot, Y. (2014). Hallmarks in colorectal cancer: Angiogenesis and cancer stem-like cells. World J. Gastroenterol. WJG *20*, 4189–4196.

Matsumoto, K., Wada, R.K., Yamashiro, J.M., Kaplan, D.R., and Thiele, C.J. (1995). Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. Cancer Res. *55*, 1798–1806.

Matsumoto, T., Numakawa, T., Adachi, N., Yokomaku, D., Yamagishi, S., Takei, N., and Hatanaka, H. (2001). Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release in cultured cortical neurons. J. Neurochem. *79*, 522–530.

Maurel, J., and Postigo, A. (2015). Prognostic and Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer. From the Preclinical Setting to Clinical Practice. Curr. Cancer Drug Targets *15*, 703–715.

McKay, M.M., and Morrison, D.K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. Oncogene *26*, 3113–3121.

Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. Nat. Rev. Cancer *6*, 449–458.

Meijer, A.J., and Codogno, P. (2007). AMP-activated protein kinase and autophagy. Autophagy *3*, 238–240.

Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J.H.P.M., Dubbelhuis, P.F., Helmond, M.T.J., Codogno, P., and Meijer, A.J. (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. J. Biol. Chem. *281*, 34870–34879.

Mélin, C., Perraud, A., Akil, H., Jauberteau, M.-O., Cardot, P., Mathonnet, M., and Battu, S. (2012). Cancer stem cell sorting from colorectal cancer cell lines by sedimentation field flow fractionation. Anal. Chem. *84*, 1549–1556.

Menéndez-Benito, V., and Neefjes, J. (2007). Autophagy in MHC class II presentation: sampling from within. Immunity *26*, 1–3.

Middlemas, D.S., Kihl, B.K., Zhou, J., and Zhu, X. (1999). Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and chemoprotection of human neuroblastoma cells. J. Biol. Chem. *274*, 16451–16460.

Miknyoczki, S.J., Lang, D., Huang, L., Klein-Szanto, A.J., Dionne, C.A., and Ruggeri, B.A. (1999). Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. Int. J. Cancer *81*, 417–427.

Mintern, J.D., and Harris, J. (2015). Autophagy and immunity. Immunol. Cell Biol. *93*, 1–2.

Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. Cell Death Differ. *12 Suppl 2*, 1535–1541.

Mizushima, N., and Kuma, A. (2008). Autophagosomes in GFP-LC3 Transgenic Mice. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *445*, 119–124.

Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. J. Cell Sci. *116*, 1679–1688.

Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I.R., and Schwartz, M. (2000). Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. J. Autoimmun. *15*, 331–345.

Moore, N., and Lyle, S. (2010). Quiescent, Slow-Cycling Stem Cell Populations in Cancer: A Review of the Evidence and Discussion of Significance. J. Oncol. *2011*, e396076.

Moore, B.R., Page-Sharp, M., Stoney, J.R., Ilett, K.F., Jago, J.D., and Batty, K.T. (2011). Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Allometric Scaling of Chloroquine in a Murine Malaria Model. Antimicrob. Agents Chemother. *55*, 3899–3907.

Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Vicencio, J.-M., Criollo, A., Maiuri, M.C., and Kroemer, G. (2009). Anti- and pro-tumor functions of autophagy. Biochim. Biophys. Acta *1793*, 1524–1532.

Morselli, E., Shen, S., Ruckenstuhl, C., Bauer, M.A., Mariño, G., Galluzzi, L., Criollo, A., Michaud, M., Maiuri, M.C., Chano, T., et al. (2011). p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. Cell Cycle Georget. Tex *10*, 2763–2769.

Mowla, S.J., Pareek, S., Farhadi, H.F., Petrecca, K., Fawcett, J.P., Seidah, N.G., Morris, S.J., Sossin, W.S., and Murphy, R.A. (1999). Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 2069–2080.

Muller, P.A.J., Vousden, K.H., and Norman, J.C. (2011). p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. J. Cell Biol. *192*, 209–218.

Nair, U., Cao, Y., Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Roles of the lipid-binding motifs of Atg18 and Atg21 in the cytoplasm to vacuole targeting pathway and autophagy. J. Biol. Chem. *285*, 11476–11488.

Nakamura, K., Martin, K.C., Jackson, J.K., Beppu, K., Woo, C.-W., and Thiele, C.J. (2006). Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. Cancer Res. *66*, 4249–4255.

Nakamura, T., Saito, H., and Takekawa, M. (2013). SAPK pathways and p53 cooperatively regulate PLK4 activity and centrosome integrity under stress. Nat. Commun. *4*, 1775.

Nanda, A., Karim, B., Peng, Z., Liu, G., Qiu, W., Gan, C., Vogelstein, B., St Croix, B., Kinzler, K.W., and Huso, D.L. (2006). Tumor endothelial marker 1 (Tem1) functions in the growth and progression of abdominal tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 3351–3356.

Naves, T., Jawhari, S., Jauberteau, M.-O., Ratinaud, M.-H., and Verdier, M. (2013). Autophagy takes place in mutated p53 neuroblastoma cells in response to hypoxia mimetic CoCl(2). Biochem. Pharmacol. *85*, 1153–1161.

Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M.F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. Nat. Protoc. *2*, 1998–2004.

Nilsson, A.S., Fainzilber, M., Falck, P., and Ibáñez, C.F. (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. FEBS Lett. *424*, 285–290.

Nixon, R.A., and Yang, D.-S. (2011). Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. Neurobiol. Dis. *43*, 38–45.

Notte, A., Leclere, L., and Michiels, C. (2011). Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. Biochem. Pharmacol. *82*, 427–434.

Nye, S.H., Squinto, S.P., Glass, D.J., Stitt, T.N., Hantzopoulos, P., Macchi, M.J., Lindsay, N.S., Ip, N.Y., and Yancopoulos, G.D. (1992). K-252a and staurosporine selectively block autophosphorylation of neurotrophin receptors and neurotrophin-mediated responses. Mol. Biol. Cell *3*, 677–686.

Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. Nature *427*, 843–848.

Nykjaer, A., Willnow, T.E., and Petersen, C.M. (2005). p75NTR--live or let die. Curr. Opin. Neurobiol. *15*, 49–57.

Obermeier, A., Halfter, H., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1993). Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. EMBO J. *12*, 933–941.

Obrocea, F.L., Sajin, M., Marinescu, E.C., and Stoica, D. (2011). Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform

pathologic reporting. Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol. *52*, 537–544.

Odate, S., Nakamura, K., Onishi, H., Kojima, M., Uchiyama, A., Nakano, K., Kato, M., Tanaka, M., and Katano, M. (2013). TrkB/BDNF signaling pathway is a potential therapeutic target for pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. Lung Cancer *79*, 205–214.

O'Donovan, T.R., Rajendran, S., O'Reilly, S., O'Sullivan, G.C., and McKenna, S.L. (2015). Lithium Modulates Autophagy in Esophageal and Colorectal Cancer Cells and Enhances the Efficacy of Therapeutic Agents In Vitro and In Vivo. PLOS ONE *10*, e0134676.

Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. Mol. Cell. Biol. *26*, 9220–9231.

Ogier-Denis, E., Pattingre, S., El Benna, J., and Codogno, P. (2000). Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. J. Biol. Chem. *275*, 39090–39095.

Okamura, K., Harada, T., Wang, S., Ijichi, K., Furuyama, K., Koga, T., Okamoto, T., Takayama, K., Yano, T., and Nakanishi, Y. (2012). Expression of TrkB and BDNF is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. Lung Cancer Amst. Neth. *78*, 100–106.

Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. J. Biol. Chem. *282*, 24131–24145.

Pantelouris, E.M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. Nature *217*, 370–371.

Park, K.-J., Lee, S.-H., Lee, C.-H., Jang, J.-Y., Chung, J., Kwon, M.-H., and Kim, Y.-S. (2009). Upregulation of Beclin-1 expression and phosphorylation of Bcl-2 and p53 are involved in the JNK-mediated autophagic cell death. Biochem. Biophys. Res. Commun. *382*, 726–729.

Pascolo, S. (2016). Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. Eur. J. Pharmacol. *771*, 139–144.

Patapoutian, A., and Reichardt, L.F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. Curr. Opin. Neurobiol. *11*, 272–280.

Patel, S.B., Stenehjem, D.D., Gill, D.M., Tantravahi, S.K., Agarwal, A.M., Hsu, J., Vuong, W., Pal, S.K., and Agarwal, N. (2016). Everolimus Versus Temsirolimus in Metastatic Renal Cell Carcinoma After Progression With Previous Systemic Therapies. Clin. Genitourin. Cancer *14*, 153–159.

Peddareddigari, V.G., Wang, D., and DuBois, R.N. (2010). The Tumor Microenvironment in Colorectal Carcinogenesis. Cancer Microenviron. *3*, 149–166.

Perraud, A., Akil, H., Nouaille, M., Petit, D., Labrousse, F., Jauberteau, M.-O., and Mathonnet, M. (2012). Implications of cleaved caspase 3 and AIF expression in colorectal cancer based on patient age. Oncol. Rep. *27*, 1787–1793.

Petersen, C.M., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H.H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P., and Moestrup, S.K. (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. J. Biol. Chem. *272*, 3599–3605.

Peterson, T.E., Kirkpatrick, N.D., Huang, Y., Farrar, C.T., Marijt, K.A., Kloepper, J., Datta, M., Amoozgar, Z., Seano, G., Jung, K., et al. (2016). Dual inhibition of Ang-2 and VEGF receptors normalizes tumor vasculature and prolongs survival in glioblastoma by altering macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. *113*, 4470–4475.

Polson, H.E.J., de Lartigue, J., Rigden, D.J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M.J., and Tooze, S.A. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. Autophagy *6*, 506–522.

Ramanathan, V., Jin, G., Westphalen, C.B., Whelan, A., Dubeykovskiy, A., Takaishi, S., and Wang, T.C. (2012). P53 gene mutation increases progastrin dependent colonic proliferation and colon cancer formation in mice. Cancer Invest. *30*, 275–286.

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. Physiol. Rev. *90*, 1383–1435.

Razi, M., Chan, E.Y.W., and Tooze, S.A. (2009). Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. J. Cell Biol. *185*, 305–321.

Rebecca, V.W., and Amaravadi, R.K. (2016). Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. Oncogene *35*, 1–11.

Reggiori, F., and Tooze, S.A. (2012). Autophagy regulation through Atg9 traffic. J. Cell Biol. *198*, 151–153.

Rende, M., Rambotti, M.G., Stabile, A.M., Pistilli, A., Montagnoli, C., Chiarelli, M.T., and Mearini, E. (2010). Novel localization of low affinity NGF receptor (p75) in the stroma of prostate cancer and possible implication in neoplastic invasion: an immunohistochemical and ultracytochemical study. The Prostate *70*, 555–561.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature *414*, 105–111.

Reyjal, J., Cormier, K., and Turcotte, S. (2014). Autophagy and cell death to target cancer cells: exploiting synthetic lethality as cancer therapies. Adv. Exp. Med. Biol. *772*, 167–188.

Ricci, A., Greco, S., Mariotta, S., Felici, L., Bronzetti, E., Cavazzana, A., Cardillo, G., Amenta, F., Bisetti, A., and Barbolini, G. (2001). Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *25*, 439–446.

Ricci-Vitiani, L., Fabrizi, E., Palio, E., and De Maria, R. (2009). Colon cancer stem cells. J. Mol. Med. Berl. Ger. *87*, 1097–1104.

Risberg, K., Redalen, K.R., Sønstevold, L., Bjørnetrø, T., Sølvernes, J., and Ree, A.H. (2016). Pro-survival responses to the dual inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins and mTOR-mediated signaling in hypoxic colorectal carcinoma cells. BMC Cancer *16*, 531.

Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., and Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene. Genes Cancer *2*, 466–474.

Rodriguez-Tébar, A., Dechant, G., and Barde, Y.A. (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. Neuron *4*, 487–492.

Roesler, R., de Farias, C.B., Abujamra, A.L., Brunetto, A.L., and Schwartsmann, G. (2011). BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. Expert Rev. Anticancer Ther. *11*, 1473–1475.

Roselli, S., Pundavela, J., Demont, Y., Faulkner, S., Keene, S., Attia, J., Jiang, C.C., Zhang, X.D., Walker, M.M., and Hondermarck, H. (2015). Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. Oncotarget *6*, 10473–10486.

Roux, P.P., and Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. Prog. Neurobiol. *67*, 203–233.

Roux, P.P., Bhakar, A.L., Kennedy, T.E., and Barker, P.A. (2001). The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. J. Biol. Chem. *276*, 23097–23104.

Royce, M.E., and Osman, D. (2015). Everolimus in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. Breast Cancer Basic Clin. Res. *9*, 73–79.

Russo, M., Misale, S., Wei, G., Siravegna, G., Crisafulli, G., Lazzari, L., Corti, G., Rospo, G., Novara, L., Mussolin, B., et al. (2016). Acquired Resistance to the TRK Inhibitor Entrectinib in Colorectal Cancer. Cancer Discov. *6*, 36–44.

Rydén, M., and Ibáñez, C.F. (1996). Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC. J. Biol. Chem. *271*, 5623–5627.

Sabers, C.J., Martin, M.M., Brunn, G.J., Williams, J.M., Dumont, F.J., Wiederrecht, G., and Abraham, R.T. (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. J. Biol. Chem. *270*, 815–822.

Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 623–635.

Sakai, N., Wada, T., Furuichi, K., Iwata, Y., Yoshimoto, K., Kitagawa, K., Kokubo, S., Kobayashi, M., Takeda, S., Kida, H., et al. (2002). p38 MAPK phosphorylation and NF-kappa B activation in human crescentic glomerulonephritis. Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc. *17*, 998–1004.

Sakaki, K., Wu, J., and Kaufman, R.J. (2008). Protein kinase Ctheta is required for autophagy in response to stress in the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. *283*, 15370–15380.

Sakitani, K., Hirata, Y., Hikiba, Y., Hayakawa, Y., Ihara, S., Suzuki, H., Suzuki, N., Serizawa, T., Kinoshita, H., Sakamoto, K., et al. (2015). Inhibition of autophagy exerts anti-colon cancer effects via apoptosis induced by p53 activation and ER stress. BMC Cancer *15*, 795.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Mol. Cell *22*, 159–168.

Sartore-Bianchi, A., Ardini, E., Bosotti, R., Amatu, A., Valtorta, E., Somaschini, A., Raddrizzani, L., Palmeri, L., Banfi, P., Bonazzina, E., et al. (2016). Sensitivity to Entrectinib Associated With a Novel LMNA-NTRK1 Gene Fusion in Metastatic Colorectal Cancer. J. Natl. Cancer Inst. *108*.

Sasahira, T., Ueda, N., Kurihara, M., Matsushima, S., Ohmori, H., Fujii, K., Bhawal, U.K., Yamamoto, K., Kirita, T., and Kuniyasu, H. (2013). Tropomyosin receptor kinases B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma. Hum. Pathol. *44*, 1098–1106.

Sasaki, K., Tsuno, N.H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y., Nishikawa, T., Shuno, Y., Hongo, K., Hiyoshi, M., et al. (2010a). Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. BMC Cancer *10*, 370.

Sasaki, K., Tsuno, N.H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y., Nishikawa, T., Shuno, Y., Hongo, K., Hiyoshi, M., et al. (2010b). Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. BMC Cancer *10*, 370.

Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Horie, Y., Bachmaier, K., Fata, J.E., Li, M., Suzuki, A., Bouchard, D., Ho, A., Redston, M., et al. (2000). Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. Nature *406*, 897–902.

Sato, K., Tsuchihara, K., Fujii, S., Sugiyama, M., Goya, T., Atomi, Y., Ueno, T., Ochiai, A., and Esumi, H. (2007). Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. Cancer Res. *67*, 9677–9684.

Satoh, F., Mimata, H., Nomura, T., Fujita, Y., Shin, T., Sakamoto, S., Hamada, Y., and Nomura, Y. (2001). Autocrine expression of neurotrophins and their receptors in prostate cancer. Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc. *8*, S28-34.

Scarlatti, F., Bauvy, C., Ventruti, A., Sala, G., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Ghidoni, R., and Codogno, P. (2004). Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. J. Biol. Chem. *279*, 18384–18391.

Schecterson, L.C., and Bothwell, M. (2010). Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. Dev. Neurobiol. *70*, 332–338.

Schmitz, K.J., Ademi, C., Bertram, S., Schmid, K.W., and Baba, H.A. (2016). Prognostic relevance of autophagy-related markers LC3, p62/sequestosome 1, Beclin-1 and ULK1 in colorectal cancer patients with respect to KRAS mutational status. World J. Surg. Oncol. *14*.

Schneikert, J., and Behrens, J. (2007). The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. Gut *56*, 417–425.

Sclabas, G.M., Fujioka, S., Schmidt, C., Li, Z., Frederick, W.A.I., Yang, W., Yokoi, K., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Hess, K.R., et al. (2005). Overexpression of tropomysin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *11*, 440–449.

Scoville, D.H., Sato, T., He, X.C., and Li, L. (2008). Current view: intestinal stem cells and signaling. Gastroenterology *134*, 849–864.

Seglen, P.O., and Gordon, P.B. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *79*, 1889–1892.

Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Chrétien, M., and Murphy, R.A. (1996). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. FEBS Lett. *379*, 247–250.

Selvakumaran, M., Amaravadi, R.K., Vasilevskaya, I.A., and O'Dwyer, P.J. (2013). Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *19*, 2995–3007.

Shao, Z., Bao, Q., Jiang, F., Qian, H., Fang, Q., and Hu, X. (2015). VS-5584, a Novel PI3K-mTOR Dual Inhibitor, Inhibits Melanoma Cell Growth In Vitro and In Vivo. PLOS ONE *10*, e0132655.

Sharif, S., O'Connell, M.J., Yothers, G., Lopa, S., and Wolmark, N. (2008). FOLFOX and FLOX regimens for the adjuvant treatment of resected stage II and III colon cancer. Cancer Invest. *26*, 956–963.

Shibutani, S.T., and Yoshimori, T. (2014). A current perspective of autophagosome biogenesis. Cell Res. *24*, 58–68.

Shim, B.Y., Sun, D.S., Won, H.S., Lee, M.A., Hong, S.U., Jung, J.-H., Cho, H.-M., and Ko, Y.H. (2016). Role of autophagy-related protein expression in patients with rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. BMC Cancer *16*, 207.

Shimizu, S., Konishi, A., Nishida, Y., Mizuta, T., Nishina, H., Yamamoto, A., and Tsujimoto, Y. (2010). Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. Oncogene *29*, 2070–2082.

Shimizu, S., Yoshida, T., Tsujioka, M., and Arakawa, S. (2014). Autophagic cell death and cancer. Int. J. Mol. Sci. *15*, 3145–3153.

Skaper, S.D. (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *846*, 1–12.

Smit, M.A., Geiger, T.R., Song, J.-Y., Gitelman, I., and Peeper, D.S. (2009). A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis. Mol. Cell. Biol. *29*, 3722–3737.

Smith, E.D., Prieto, G.A., Tong, L., Sears-Kraxberger, I., Rice, J.D., Steward, O., and Cotman, C.W. (2014). Rapamycin and interleukin-1β impair brain-derived neurotrophic factor-dependent neuron survival by modulating autophagy. J. Biol. Chem. *289*, 20615–20629.

Sridharan, S., Jain, K., and Basu, A. (2011). Regulation of Autophagy by Kinases. Cancers *3*, 2630–2654.

Stoilov, P., Castren, E., and Stamm, S. (2002). Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. Biochem. Biophys. Res. Commun. *290*, 1054–1065.

Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., et al. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. Cell Death Dis. *4*, e838.

Sui, X., Kong, N., Wang, X., Fang, Y., Hu, X., Xu, Y., Chen, W., Wang, K., Li, D., Jin, W., et al. (2014). JNK confers 5-fluorouracil resistance in p53-deficient and mutant p53-expressing colon cancer cells by inducing survival autophagy. Sci. Rep. *4*.

Sun, Y., Tian, H., and Wang, L. (2015). Effects of PTEN on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells via the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway. Oncol. Rep. *33*, 1828–1836.

Suter, U., Heymach, J.V., and Shooter, E.M. (1991). Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. EMBO J. *10*, 2395–2400.

Sweeney, S.E., and Firestein, G.S. (2007). Primer: signal transduction in rheumatic disease--a clinician's guide. Nat. Clin. Pract. Rheumatol. *3*, 651–660.

Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Gulino, A., and Mackay, A.R. (2005). Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. Future Oncol. Lond. Engl. *1*, 689–698.

Tan, S.H., Shui, G., Zhou, J., Li, J.J., Bay, B.-H., Wenk, M.R., and Shen, H.-M. (2012). Induction of autophagy by palmitic acid via protein kinase C-mediated signaling pathway independent of mTOR (mammalian target of rapamycin). J. Biol. Chem. *287*, 14364–14376.

Tanaka, K., Okugawa, Y., Toiyama, Y., Inoue, Y., Saigusa, S., Kawamura, M., Araki, T., Uchida, K., Mohri, Y., and Kusunoki, M. (2014). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)-Induced Tropomyosin-Related Kinase B (Trk B) Signaling Is a Potential Therapeutic Target for Peritoneal Carcinomatosis Arising from Colorectal Cancer. PLoS ONE *9*.

Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., and Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. Cancer Sci. *94*, 965–973.

Tang, J.-C., Feng, Y.-L., Liang, X., and Cai, X.-J. (2016). Autophagy in 5-Fluorouracil Therapy in Gastrointestinal Cancer: Trends and Challenges. Chin. Med. J. (Engl.) *129*, 456–463.

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

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

Tasdemir, E., Chiara Maiuri, M., Morselli, E., Criollo, A., D'Amelio, M., Djavaheri-Mergny, M., Cecconi, F., Tavernarakis, N., and Kroemer, G. (2008). A dual role of p53 in the control of autophagy. Autophagy *4*, 810–814.

Temraz, S., Mukherji, D., Alameddine, R., and Shamseddine, A. (2014). Methods of overcoming treatment resistance in colorectal cancer. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *89*, 217–230.

Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., et al. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 5455–5463.

Teng, K.K., Felice, S., Kim, T., and Hempstead, B.L. (2010). Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. Dev. Neurobiol. *70*, 350–359.

Thaker, A.I., Shaker, A., Rao, M.S., and Ciorba, M.A. (2012a). Modeling Colitis-Associated Cancer with Azoxymethane (AOM) and Dextran Sulfate Sodium (DSS). J. Vis. Exp. JoVE.

Thaker, A.I., Shaker, A., Rao, M.S., and Ciorba, M.A. (2012b). Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). J. Vis. Exp. JoVE.

Thiele, C.J., Li, Z., and McKee, A.E. (2009). On Trk—The TrkB Signal Transduction Pathway Is an Increasingly Important Target in Cancer Biology. Clin. Cancer Res. *15*, 5962–5967.

Thorburn, A. (2014). Autophagy and Its Effects: Making Sense of Double-Edged Swords. PLoS Biol. *12*.

Thorburn, A., Thamm, D.H., and Gustafson, D.L. (2014). Autophagy and Cancer Therapy. Mol. Pharmacol. *85*, 830–838.

Thyagarajan, A., Jedinak, A., Nguyen, H., Terry, C., Baldridge, L.A., Jiang, J., and Sliva, D. (2010). Triterpenes from Ganoderma Lucidum induce autophagy in colon cancer through the inhibition of p38 mitogen-activated kinase (p38 MAPK). Nutr. Cancer *62*, 630–640.

Todde, V., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J. (2009). Autophagy: Principles and significance in health and disease. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. *1792*, 3–13.

Tong, Y., Yang, W., and Koeffler, H.P. (2011). Mouse models of colorectal cancer. Chin. J. Cancer *30*, 450–462.

Truzzi, F., Marconi, A., Lotti, R., Dallaglio, K., French, L.E., Hempstead, B.L., and Pincelli, C. (2008). Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. J. Invest. Dermatol. *128*, 2031–2040.

Tsuchihara, K., Fujii, S., and Esumi, H. (2009). Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. Cancer Lett. *278*, 130–138.

Urfer, R., Tsoulfas, P., O'Connell, L., Shelton, D.L., Parada, L.F., and Presta, L.G. (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. EMBO J. *14*, 2795–2805.

Vaegter, C.B., Jansen, P., Fjorback, A.W., Glerup, S., Skeldal, S., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J.R., Tessarollo, L., Lewin, G.R., et al. (2011). Sortilin associates with Trk

receptors to enhance anterograde transport and signaling by neurotrophins. Nat. Neurosci. *14*.

Van Cutsem, E., Köhne, C.-H., Láng, I., Folprecht, G., Nowacki, M.P., Cascinu, S., Shchepotin, I., Maurel, J., Cunningham, D., Tejpar, S., et al. (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *29*, 2011–2019.

Vanhecke, E., Adriaenssens, E., Verbeke, S., Meignan, S., Germain, E., Berteaux, N., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., and Hondermarck, H. (2011). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *17*, 1741–1752.

Vaseva, A.V., and Moll, U.M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. Biochim. Biophys. Acta *1787*, 414.

Vega, J.A., García-Suárez, O., Hannestad, J., Pérez-Pérez, M., and Germanà, A. (2003). Neurotrophins and the immune system. J. Anat. *203*, 1–19.

Voloshanenko, O., Erdmann, G., Dubash, T.D., Augustin, I., Metzig, M., Moffa, G., Hundsrucker, C., Kerr, G., Sandmann, T., Anchang, B., et al. (2013). Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. Nat. Commun. *4*, 2610.

Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. Cell *137*, 413–431.

Wagner, E.F., and Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Nat. Rev. Cancer *9*, 537–549.

Wang, J., Tan, X., Yang, Q., Zeng, X., Zhou, Y., Luo, W., Lin, X., Song, L., Cai, J., Wang, T., et al. (2016a). Inhibition of autophagy promotes apoptosis and enhances anticancer efficacy of adriamycin via augmented ROS generation in prostate cancer cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. *77*, 80–90.

Wang, Z., Du, T., Dong, X., Li, Z., Wu, G., and Zhang, R. (2016b). Autophagy inhibition facilitates erlotinib cytotoxicity in lung cancer cells through modulation of endoplasmic reticulum stress. Int. J. Oncol. *48*, 2558–2566.

Watson, A.J.M. (2004). Apoptosis and colorectal cancer. Gut *53*, 1701–1709.

Webber, J.L., and Tooze, S.A. (2010). Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. EMBO J. *29*, 27–40.

Weeraratna, A.T., Dalrymple, S.L., Lamb, J.C., Denmeade, S.R., Miknyoczki, S., Dionne, C.A., and Isaacs, J.T. (2001). Pan-trk Inhibition Decreases Metastasis and Enhances Host Survival in Experimental Models as a Result of Its Selective Induction of Apoptosis of Prostate Cancer Cells. Clin. Cancer Res. *7*, 2237–2245.

Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, P.R., and Büchler, M.W. (2005). Colorectal cancer. Lancet Lond. Engl. *365*, 153–165.

White, B.D., Chien, A.J., and Dawson, D.W. (2012). Dysregulation of Wnt/β-catenin Signaling in Gastrointestinal Cancers. Gastroenterology *142*, 219–232.

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

Wu, L., and Yan, B. (2011). Discovery of small molecules that target autophagy for cancer treatment. Curr. Med. Chem. *18*, 1866–1873.

Wu, W.K.K., Sakamoto, K.M., Milani, M., Aldana-Masankgay, G., Fan, D., Wu, K., Lee, C.W., Cho, C.H., Yu, J., and Sung, J.J.Y. (2010). Macroautophagy modulates cellular response to proteasome inhibitors in cancer therapy. Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother. *13*, 87–92.

Xie, Z., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2008a). Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. Mol. Biol. Cell *19*, 3290–3298.

Xie, Z., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2008b). Dissecting autophagosome formation: the missing pieces. Autophagy *4*, 920–922.

Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., and Stefanis, L. (2008). alpha-synuclein degradation by autophagic pathways: a potential key to Parkinson's disease pathogenesis. Autophagy *4*, 917–919.

Xilouri, M., Brekk, O.R., Landeck, N., Pitychoutis, P.M., Papasilekas, T., Papadopoulou-Daifoti, Z., Kirik, D., and Stefanis, L. (2013). Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates α-synuclein-induced neurodegeneration. Brain J. Neurol. *136*, 2130–2146.

Xiong, J., Zhou, L., Lim, Y., Yang, M., Zhu, Y.-H., Li, Z.-W., Zhou, F.H., Xiao, Z.-C., and Zhou, X.-F. (2013). Mature BDNF promotes the growth of glioma cells in vitro. Oncol. Rep. *30*, 2719–2724.

Xiong, J., Zhou, L.I., Lim, Y., Yang, M., Zhu, Y.-H., Li, Z.-W., Fu, D.-L., and Zhou, X.-F. (2015). Mature brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB are upregulated in human glioma tissues. Oncol. Lett. *10*, 223–227.

Yang, H.-Z., Ma, Y., Zhou, Y., Xu, L.-M., Chen, X.-J., Ding, W.-B., and Zou, H.-B. (2015a). Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment. Cancer Lett. *361*, 128–136.

Yang, K., Chen, X.-Z., Zhang, B., Yang, C., Chen, H.-N., Chen, Z.-X., Zhou, Z.-G., Chen, J.-P., and Hu, J.-K. (2011a). Is CD133 a biomarker for cancer stem cells of colorectal cancer and brain tumors? A meta-analysis. Int. J. Biol. Markers *26*, 173–180.

YANG, X., NIU, B., WANG, L., CHEN, M., KANG, X., WANG, L., JI, Y., and ZHONG, J. (2016). Autophagy inhibition enhances colorectal cancer apoptosis induced by dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. Oncol. Lett. *12*, 102–106.

Yang, Y., Hu, L., Zheng, H., Mao, C., Hu, W., Xiong, K., Wang, F., and Liu, C. (2013). Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. Acta Pharmacol. Sin. *34*, 625–635.

Yang, Y., Luo, H., Hui, K., Ci, Y., Shi, K., Chen, G., Shi, L., and Xu, C. (2015b). Selenite-induced autophagy antagonizes apoptosis in colorectal cancer cells in vitro and in vivo. Oncol. Rep.

Yang, Z.J., Chee, C.E., Huang, S., and Sinicrope, F.A. (2011b). The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. Mol. Cancer Ther. *10*, 1533–1541.

Yano, H., and Chao, M.V. (2000). Neurotrophin receptor structure and interactions. Pharm. Acta Helv. *74*, 253–260.

Yonekawa, T., and Thorburn, A. (2013). Autophagy and Cell Death. Essays Biochem. *55*, 105–117.

Yoshimori, T. (2004). Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *313*, 453–458.

Young, M., Ordonez, L., and Clarke, A.R. (2013). What are the best routes to effectively model human colorectal cancer? Mol. Oncol. *7*, 178–189.

Yu, L., Lenardo, M.J., and Baehrecke, E.H. (2004). Autophagy and caspases: a new cell death program. Cell Cycle Georget. Tex *3*, 1124–1126.

Yu, Y., Zhang, S., Wang, X., Yang, Z., and Ou, G. (2010). Overexpression of TrkB promotes the progression of colon cancer. APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. *118*, 188–195.

Zage, P.E., Graham, T.C., Zeng, L., Fang, W., Pien, C., Thress, K., Omer, C., Brown, J.L., and Zweidler-McKay, P.A. (2011). The selective Trk inhibitor AZ623 inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroblastoma cell proliferation and signaling and is synergistic with topotecan. Cancer *117*, 1321–1391.

Zhang, S., and Yu, D. (2010). PI(3)king apart PTEN's role in cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *16*, 4325–4330.

Zhang, P., Xing, Z., Li, X., Song, Y., Zhao, J., Xiao, Y., and Xing, Y. (2016). Tyrosine receptor kinase B silencing inhibits anoikis-resistance and improves anticancer efficiency of sorafenib in human renal cancer cells. Int. J. Oncol. *48*, 1417–1425.

Zhang, Y., Fujiwara, Y., Doki, Y., Takiguchi, S., Yasuda, T., Miyata, H., Yamazaki, M., Ngan, C.Y., Yamamoto, H., Ma, Q., et al. (2008). Overexpression of tyrosine kinase B protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma. Oncology *75*, 17–26.

Zhao, M., and Klionsky, D.J. (2011). AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 induces autophagy. Cell Metab. *13*, 119–120.

Zheng, H., Zhang, X., Wang, X., and Sun, B. (2012). Autophagy Enhances the Aggressiveness of Human Colorectal Cancer Cells and Their Ability to Adapt to Apoptotic Stimulus. Cancer Biol. Med. *9*, 105–110.

Figure legends

Figure 1: Effect of tyrosine kinase receptor inhibitor (K252a) on TrkB/BDNF expression and autophagy induction.

SW480 and SW620 were treated with 100 nM of K252a for 3 h, recovered, washed and total RNA and proteins were extracted (see Materials and Methods).

A: BDNF, Full Length (FL) and Truncated (Tr) TrkB, transcripts expression was assessed by qPCR. Histograms are representative of 3 independent experiments. The fold expression was obtained by the comparative cycle threshold method using the GAPDH RNA expression level as internal control.

B: BDNF, FL TrkB, Tr TrkB, phospho-TrkB (P TrkB), AKT, phospho-AKT (P AKT), mTOR, and phospho-mTOR (P mTOR), proteins expression were assessed by western blotting.

C: Staining of SW480 and SW620 was realized with anti-BDNF antibody (green), anti-TrkB antibody (red), and DAPI (blue). Images were obtained through confocal microscopy (magnification ×1000).

D: Beclin1, ATG5, and LC3 proteins expression was assessed by western blotting after treatment with either K252a (100 nM, 3h) or with CQ (25 µM, 3h).

E: Staining of SW480 and SW620 was realized with anti-LC3 antibody (green) and DAPI (blue) through indirect immunofluorescence. Rapamycin (20 nM, 3 h) was used as a positive control for autophagy induction. Relative quantification was accomplished by using a green surface plot with the ImageJ software application.

The density of each band representative for protein expression was calculated with ImageJ software. Images show representative results performed for 3 experiments. Statiscally results are explained in comparison with non treated cells, normalized at 1 (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$).

Figure 2: Pharmacologic inhibition of autophagy with CQ induced TrkB/BDNF pathway activation in CRC cell lines.

SW480 and SW620 were treated with 25 µM of CQ for 3 h, recovered, washed and total RNA and proteins were extracted (see Materials and Methods).

A: BDNF, FL TrkB and Tr TrkB, transcripts expression was assessed by qPCR.

B: BDNF, TrkB, phospho-TrkB, AKT, phospho-AKT, mTOR, and phospho-mTOR proteins expression was assessed by western blotting.

C: Staining of SW480 and SW620 was realized with anti-BDNF antibody (green), anti-TrkB antibody (red), and DAPI (blue). Images were obtained through confocal microscopy (magnification ×1000).

Figure 3: Transcriptomic inhibition of autophagy with siRNA ATG5 induced activation of the TrkB/BDNF pathway.

SW480 and SW620 were transfected with siRNA ATG5, recovered, washed and total proteins were extracted (see Materials and Methods).

A: ATG5, LC3 proteins expression was assessed by western blotting.

B: BDNF, TrkB, phospho-TrkB, AKT, phospho-AKT, mTOR, and phospho-mTOR was assessed by western blotting.

The density of each band representative for protein expression was calculated with ImageJ software. Images show representative results performed for 3 experiments. Statiscally results are explained in comparison with non treated cells, normalized at 1 (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$).

Figure 4: Metabolic activity and PARP cleavage in CRC cell lines after K252a, CQ, and K252a + CQ treatments.

SW480 and SW620 were treated with K252a, CQ, or both molecules for 72 h (see Materials and Methods).

A: Metabolic activity was assessed through MTT testing. Histograms show the means ±SEM of at least 3 independent experiments (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$).

B: PARP cleavage was assessed by western blotting.

The density of each band representative for protein expression was calculated with ImageJ software. Images show representative results performed for 3 experiments. Statiscally results are explained in comparison with non treated cells, normalized at 1 (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$).

Figure 5: Effects of NT inhibitor (K252a), autophagy inhibitor (CQ), and dual treatment on tumoral growth.

Nude mice were subcutaneously engrafted with SW480 or SW620 (1.10^6 cells). When tumors reached a volume of 300 mm^3, animals were divided into different groups and treated with K252a for 21 days or with CQ for 12 days, or with both molecules (see Materials and Methods).

A: Tumor growth was determined weekly. Results are expressed in mean tumor volumes (mm^3) ±s.d. in comparison with the non treated group (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$) .

B: Images of representative tumors.

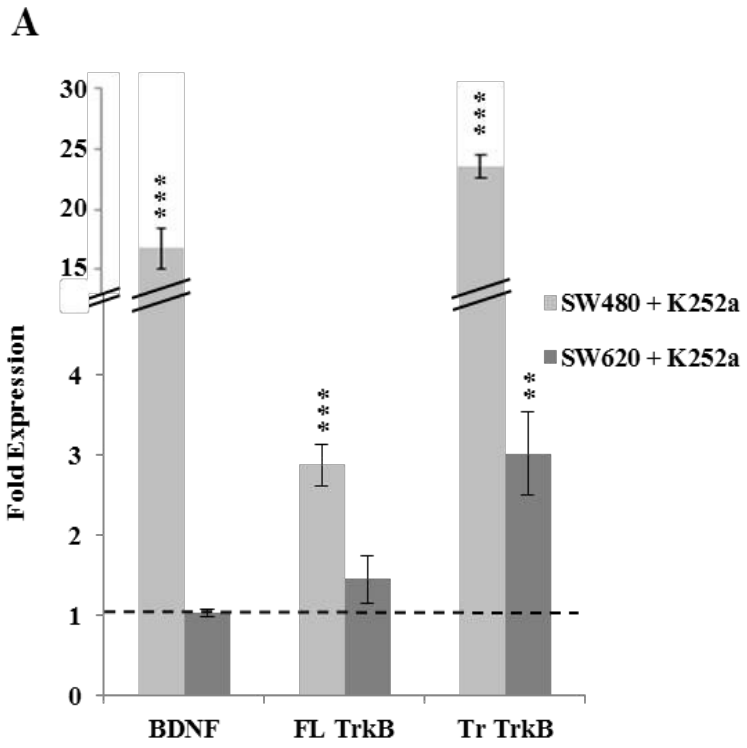
Figure 6: Neurotrophin and autophagy pathways are active in CRC patients

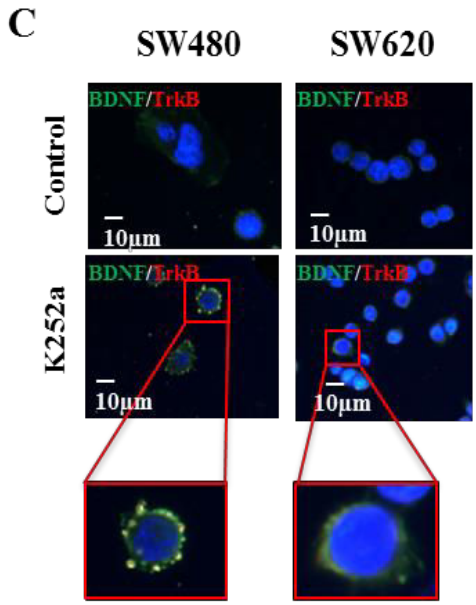
Tumor samples from each stage were collected from at least 3 patients having CRC, lyzed and total proteins were extracted.

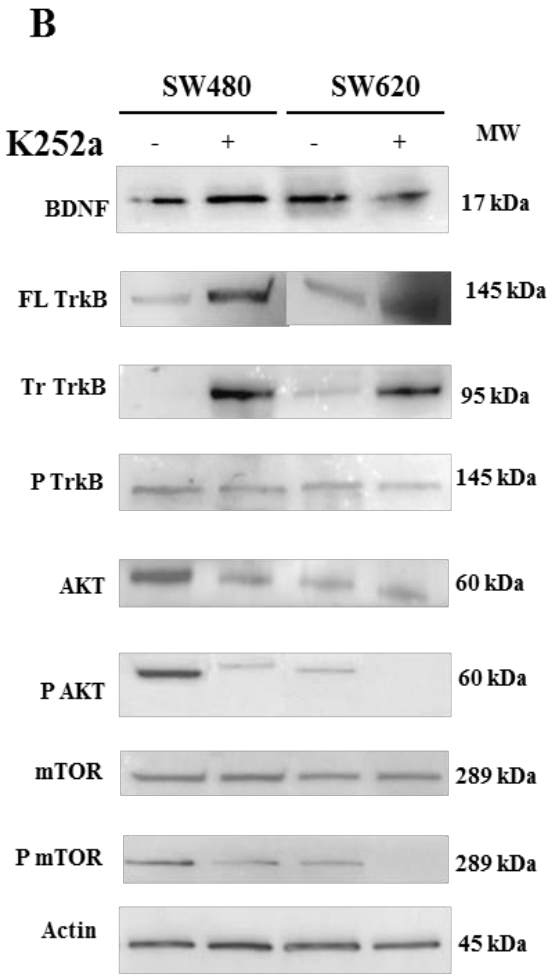
FL TrkB, phospho-TrkB, AKT, phospho-AKT, and LC3 protein expression was assessed by western blotting.

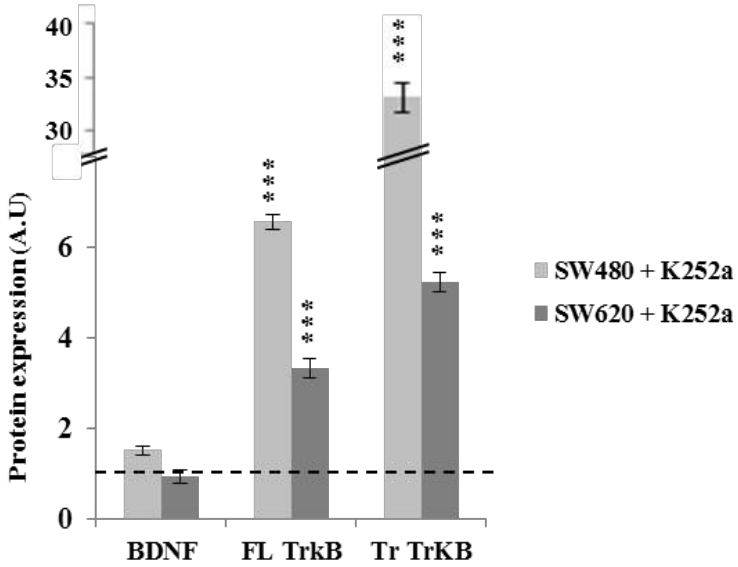
The density of each band was calculated with ImageJ software. Images show representative results performed for 3 experiments. Significant differences were obtained by comparison with Stage 0/I, considered as a pre-cancerous stage (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$).

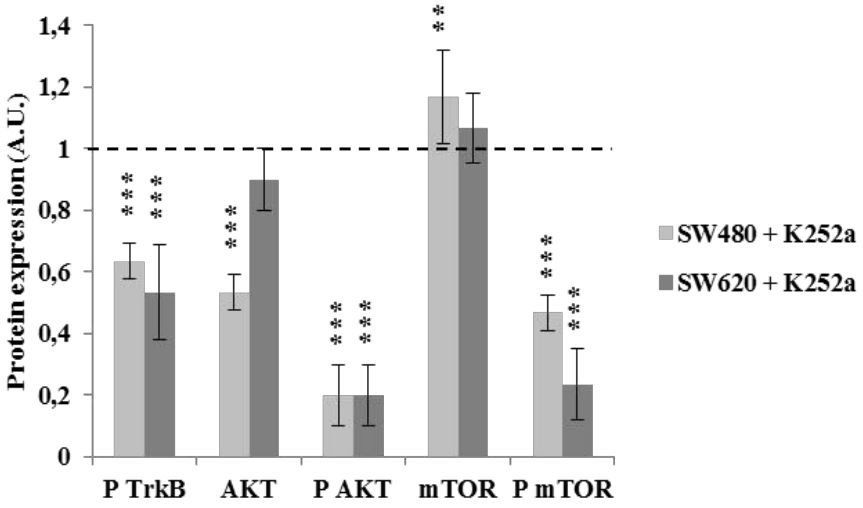
Figure 7: Take home message of the study.

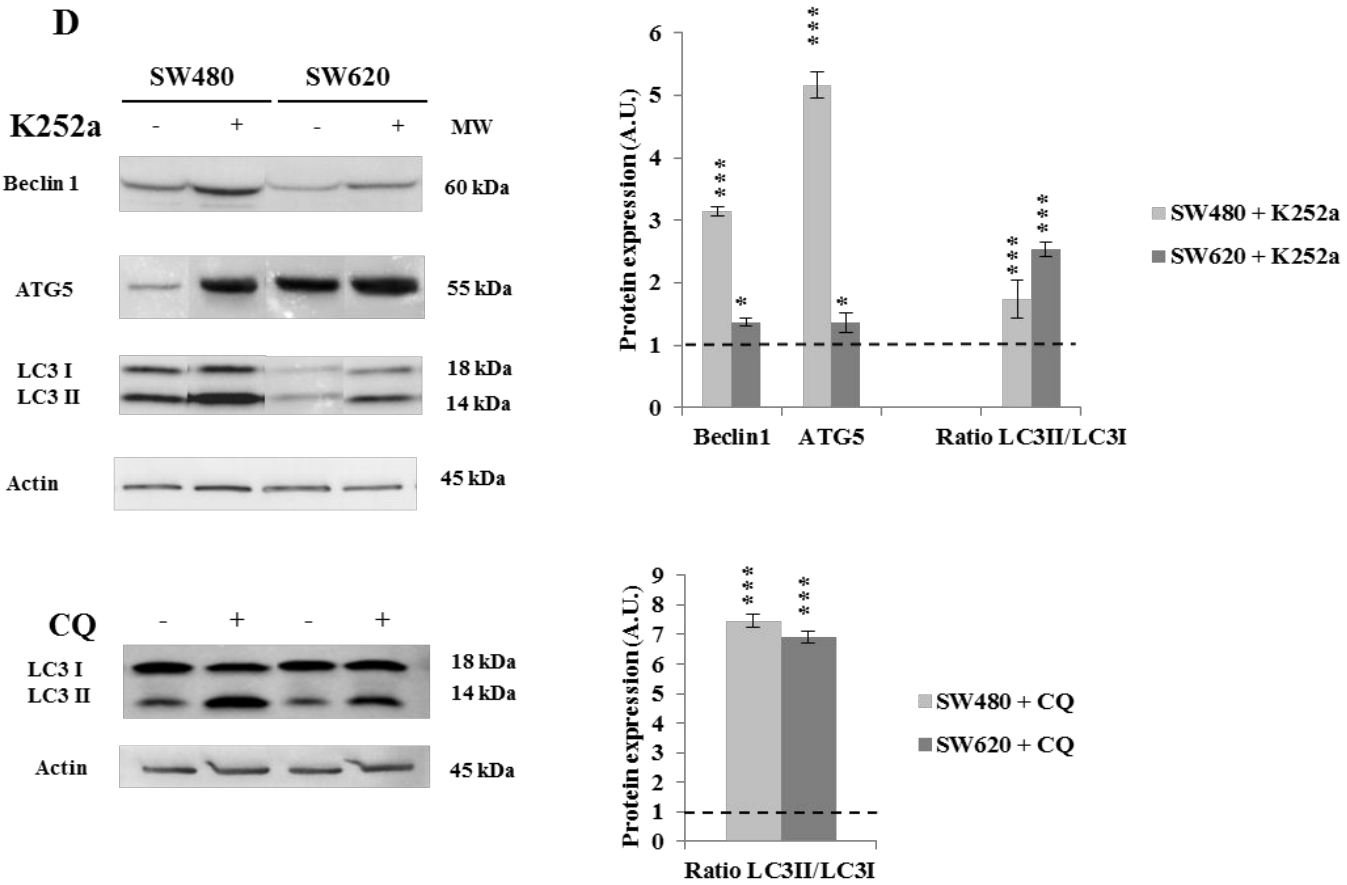

A
Fold Expression
30
25
20
15
4
3
2
1
0
***
***
***
**
SW480 + K252a
SW620 + K252a
BDNF
FL TrkB
Tr TrkB


C
SW480
SW620
Control
K252a
BDNF/TrkB
10µm


B
SW480
SW620
K252a
-
+
-
+
MW
BDNF
17 kDa
FL TrkB
145 kDa
Tr TrkB
95 kDa
P TrkB
145 kDa
AKT
60 kDa
P AKT
60 kDa
mTOR
289 kDa
P mTOR
289 kDa
Actin
45 kDa


Protein expression (A.U)
40
35
30
6
4
2
0
***
***
***
***
SW480 + K252a
SW620 + K252a
BDNF
FL TrkB
Tr TrKB


Protein expression (A.U.)
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
**
***
***
***
***
***
***
***
SW480 + K252a
SW620 + K252a
P TrkB
AKT
P AKT
mTOR
P mTOR


D
SW480
SW620
K252a
-
+
-
+
MW
Beclin 1
60 kDa
ATG5
55 kDa
LC3 I
LC3 II
18 kDa
14 kDa
Actin
45 kDa
Protein expression (A.U.)
Beclin1
ATG5
Ratio LC3II/LC3I
SW480 + K252a
SW620 + K252a
CQ
LC3 I
LC3 II
18 kDa
14 kDa
Actin
45 kDa
Protein expression (A.U.)
Ratio LC3II/LC3I
SW480 + CQ
SW620 + CQ

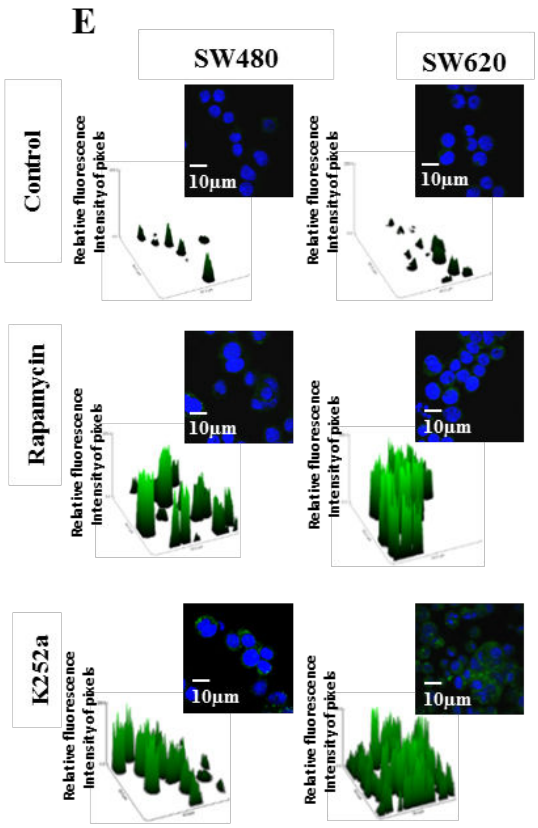

E
SW480
SW620
Control
Rapamycin
K252a
Relative fluorescence Intensity of pixels
10µm

Figure 1

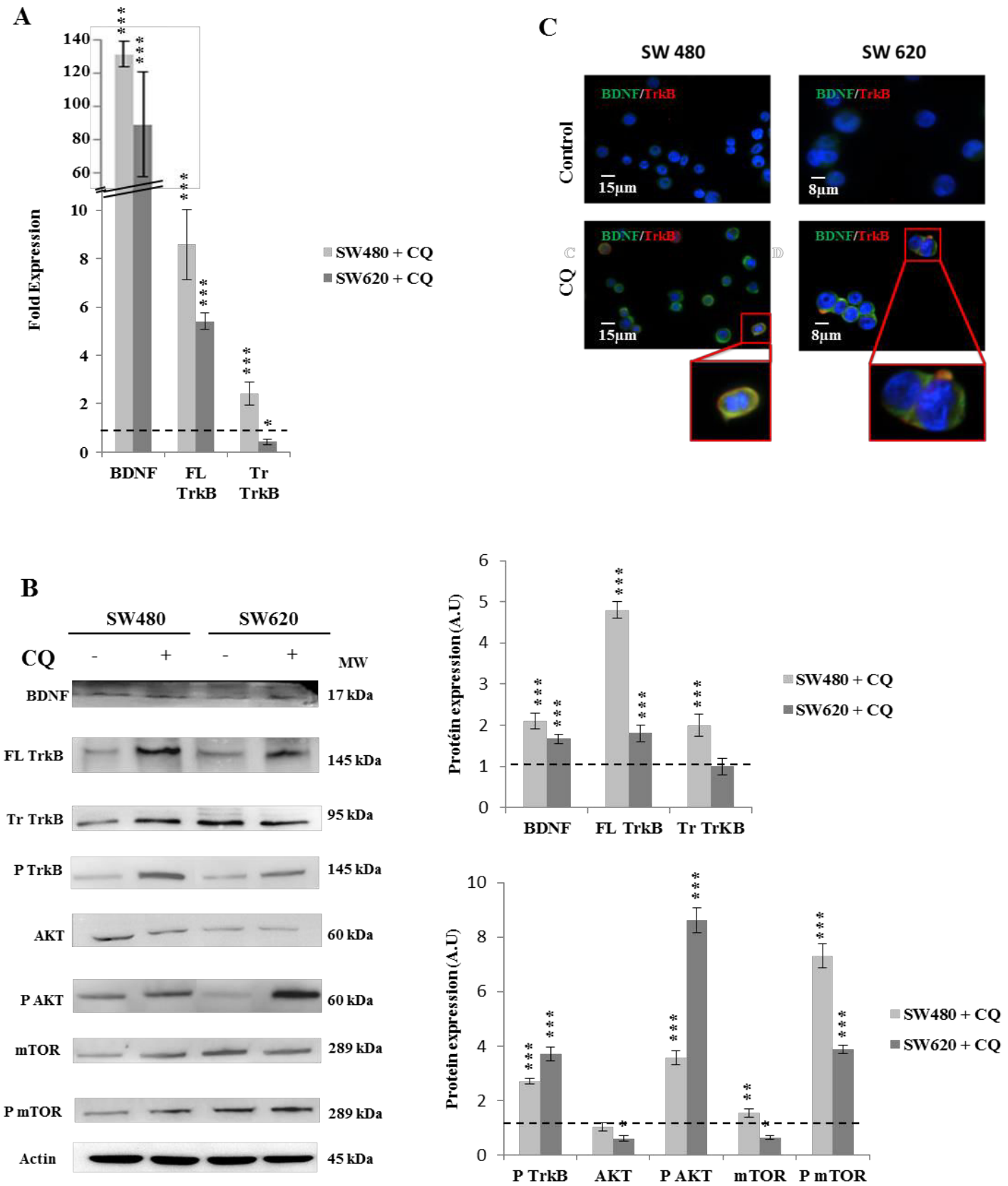
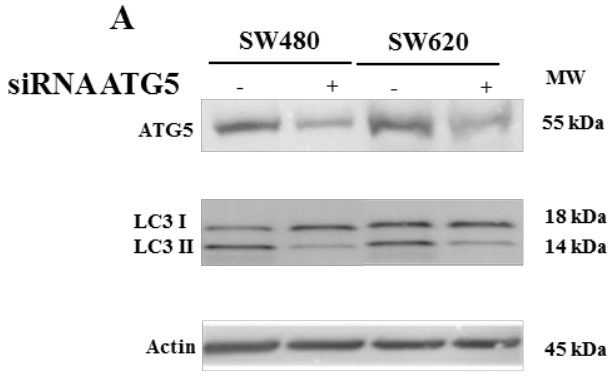

A
Fold Expression
140
120
100
80
60
10
8
6
4
2
0
BDNF
FL TrkB
Tr TrkB
SW480 + CQ
SW620 + CQ
C
SW 480
SW 620
Control
CQ
BDNF/TrkB
15µm
8µm
B
SW480
SW620
CQ
-
+
-
+
MW
BDNF
17 kDa
FL TrkB
145 kDa
Tr TrkB
95 kDa
P TrkB
145 kDa
AKT
60 kDa
P AKT
60 kDa
mTOR
289 kDa
P mTOR
289 kDa
Actin
45 kDa
Protéin expression (A.U)
BDNF
FL TrkB
Tr TrKB
Protein expression (A.U)
P TrkB
AKT
P AKT
mTOR
P mTOR

Figure 2


A
SW480
SW620
siRNA ATG5
-
+
-
+
MW
ATG5
55 kDa
LC3 I
LC3 II
18 kDa
14 kDa
Actin
45 kDa

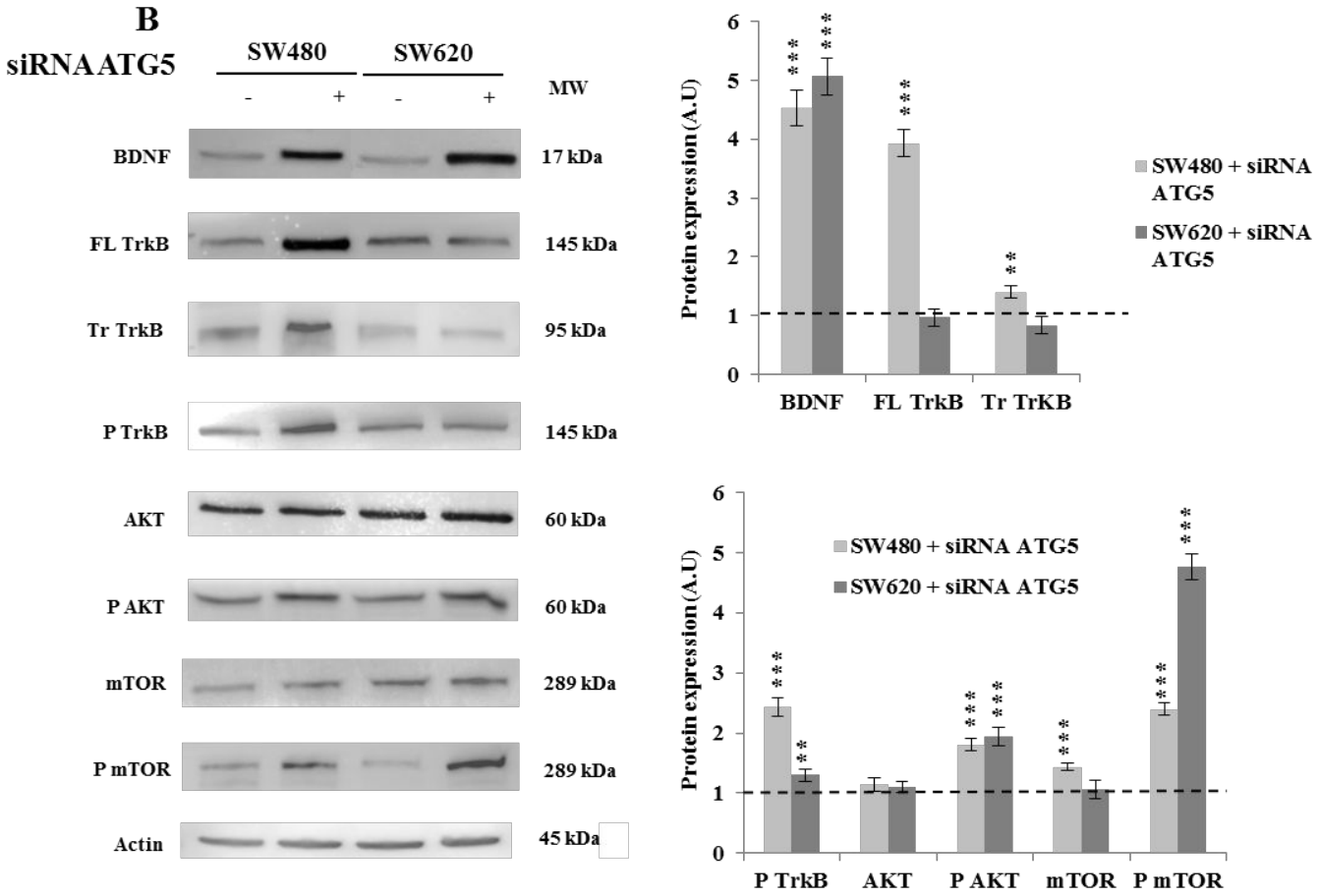

B
siRNA ATG5
SW480
SW620
-
+
-
+
MW
BDNF
17 kDa
FL TrkB
145 kDa
Tr TrkB
95 kDa
P TrkB
145 kDa
AKT
60 kDa
P AKT
60 kDa
mTOR
289 kDa
P mTOR
289 kDa
Actin
45 kDa
Protein expression (A.U)
SW480 + siRNA ATG5
SW620 + siRNA ATG5
BDNF
FL TrkB
Tr TrKB
P TrkB
AKT
P AKT
mTOR
P mTOR

Figure 3

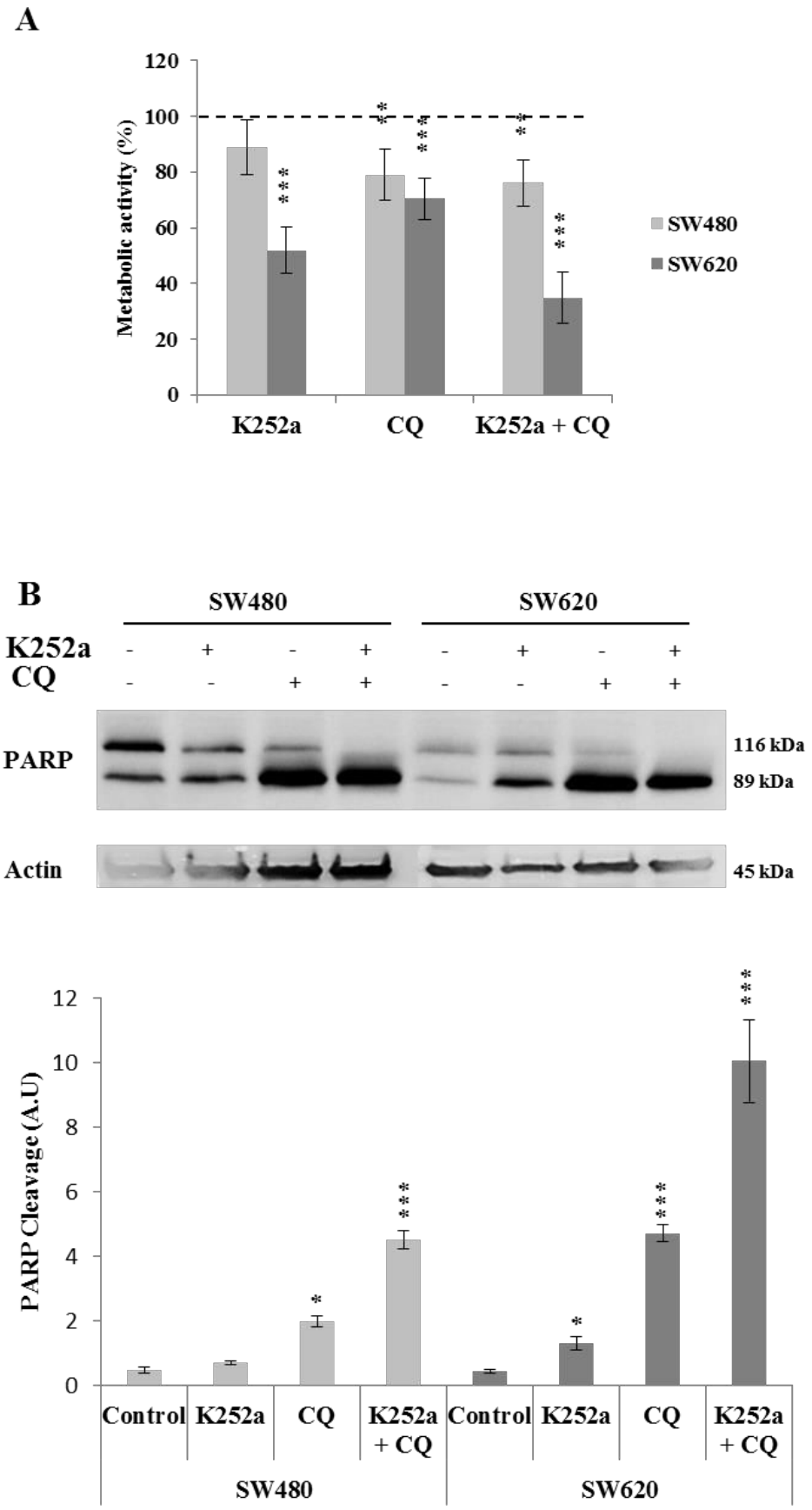

A
Metabolic activity (%)
120
100
80
60
40
20
0
K252a
CQ
K252a + CQ
SW480
SW620
B
SW480
SW620
K252a
CQ
PARP
116 kDa
89 kDa
Actin
45 kDa
PARP Cleavage (A.U)
12
10
8
6
4
2
0
Control
K252a
CQ
K252a + CQ
SW480
SW620

Figure 4

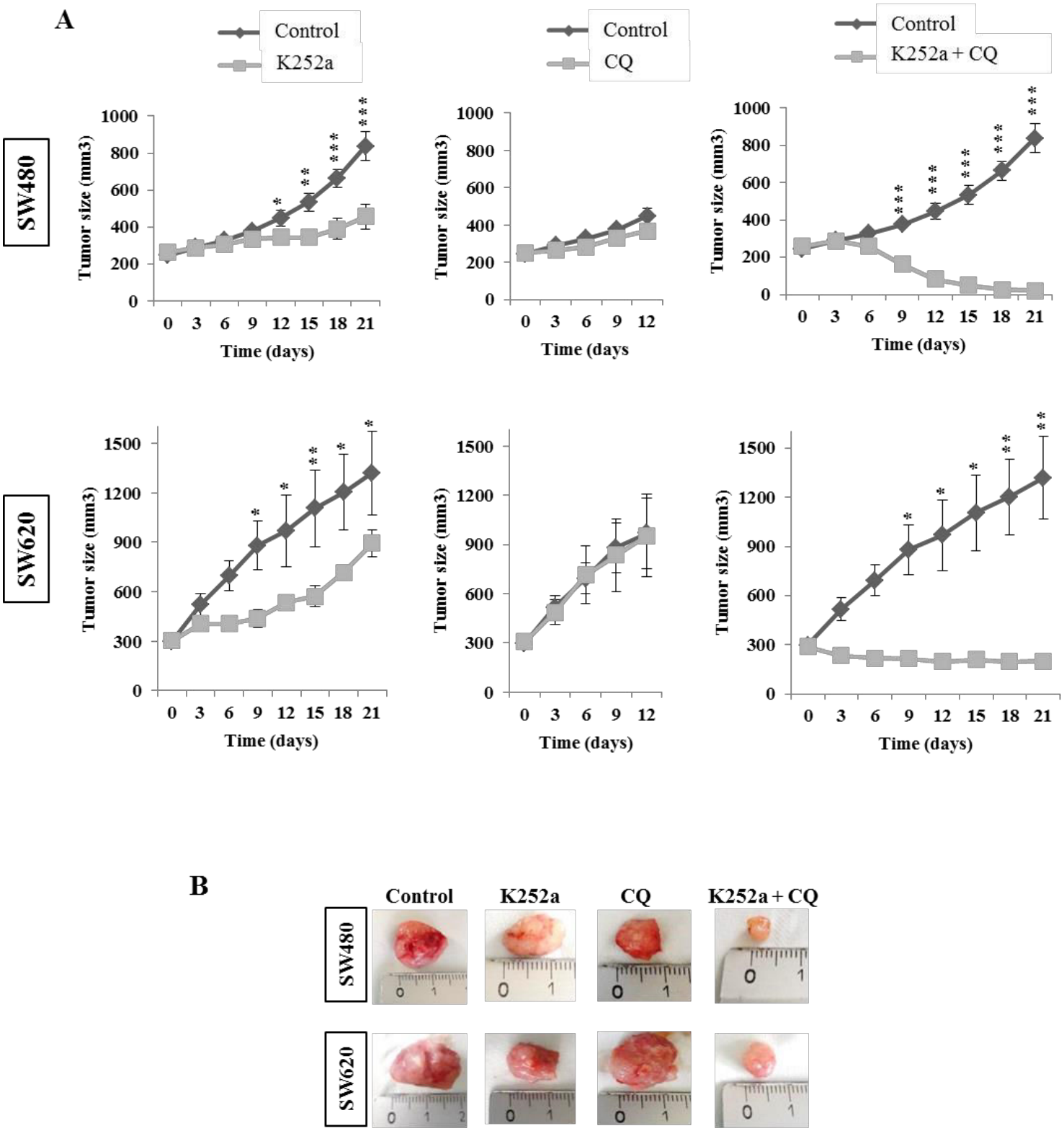

A
Control
K252a
Control
CQ
Control
K252a + CQ
SW480
SW620
Tumor size (mm3)
Time (days)
B
Control
K252a
CQ
K252a + CQ
SW480
SW620

Figure 5

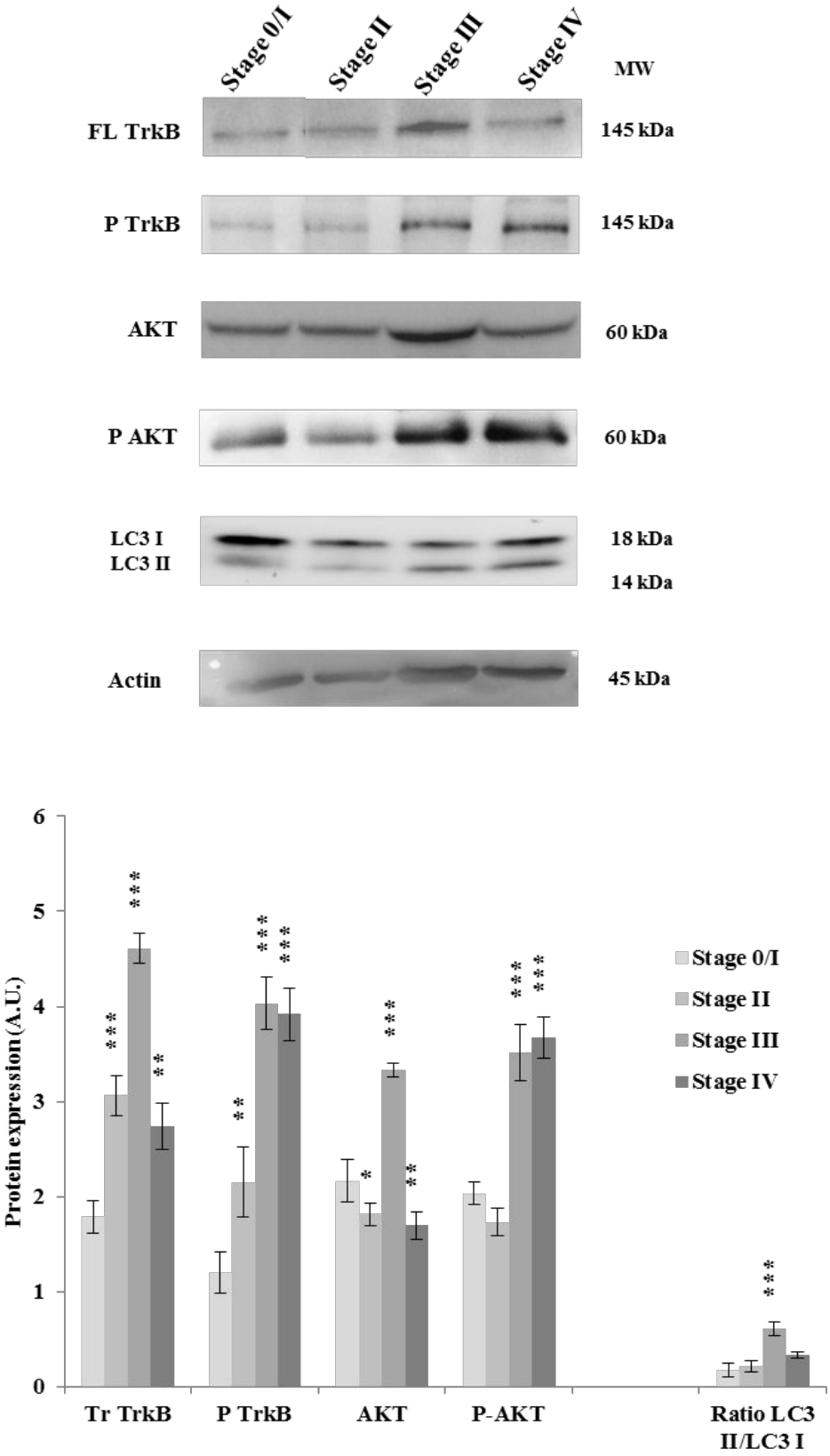

Stage 0/I
Stage II
Stage III
Stage IV
MW
FL TrkB
145 kDa
P TrkB
145 kDa
AKT
60 kDa
P AKT
60 kDa
LC3 I
LC3 II
18 kDa
14 kDa
Actin
45 kDa
Protein expression (A.U.)
0
1
2
3
4
5
6
Stage 0/I
Stage II
Stage III
Stage IV
Tr TrkB
P TrkB
AKT
P-AKT
Ratio LC3 II/LC3 I

Figure 6

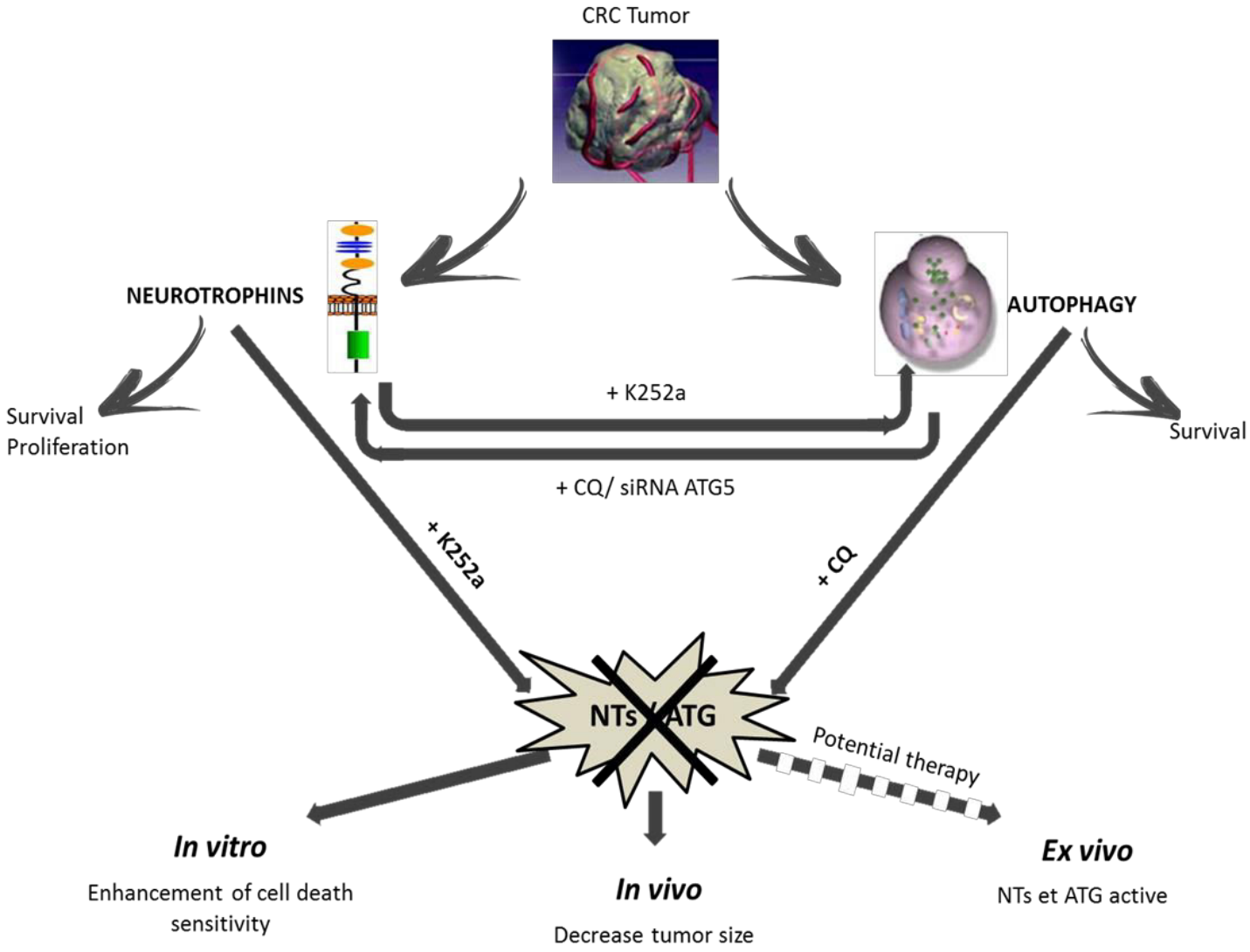

CRC Tumor
NEUROTROPHINS
AUTOPHAGY
Survival
Proliferation
Survival
+ K252a
+ CQ/ siRNA ATG5
+ K252a
+ CQ
NTs / ATG
Potential therapy
In vitro
Enhancement of cell death sensitivity
In vivo
Decrease tumor size
Ex vivo
NTs et ATG active

Figure 7

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ahmed, D., Eide, P.W., Eilertsen, I.A., Danielsen, S.A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G.E., and Lothe, R.A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. Oncogenesis *2*, e71.

Aita, V.M., Liang, X.H., Murty, V.V., Pincus, D.L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., Gilliam, T.C., and Levine, B. (1999). Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. Genomics *59*, 59–65.

Akil, H., Perraud, A., Mélin, C., Jauberteau, M.-O., and Mathonnet, M. (2011). Fine-Tuning Roles of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor, TrkB and Sortilin in Colorectal Cancer Cell Survival. PLOS ONE *6*, e25097.

Akil, H., Perraud, A., Jauberteau, M.-O., and Mathonnet, M. (2016). Tropomyosin-related kinase B/brain derived-neurotrophic factor signaling pathway as a potential therapeutic target for colorectal cancer. World J. Gastroenterol. *22*, 490–500.

Albaugh, P., Fan, Y., Mi, Y., Sun, F., Adrian, F., Li, N., Jia, Y., Sarkisova, Y., Kreusch, A., Hood, T., et al. (2012). Discovery of GNF-5837, a Selective TRK Inhibitor with Efficacy in Rodent Cancer Tumor Models. ACS Med. Chem. Lett. *3*, 140–145.

Alderson, R.F., Curtis, R., Alterman, A.L., Lindsay, R.M., and DiStefano, P.S. (2000). Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro. Brain Res. *871*, 210–222.

Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., et al. (2005). Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. Dev. Camb. Engl. *132*, 1443–1451.

Anitei, M.-G., Zeitoun, G., Mlecnik, B., Marliot, F., Haicheur, N., Todosi, A.-M., Kirilovsky, A., Lagorce, C., Bindea, G., Ferariu, D., et al. (2014). Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *20*, 1891–1899.

Ardini, E., Menichincheri, M., Banfi, P., Bosotti, R., De Ponti, C., Pulci, R., Ballinari, D., Ciomei, M., Texido, G., Degrassi, A., et al. (2016). Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications. Mol. Cancer Ther. *15*, 628–639.

Arévalo, J.C., and Wu, S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! Cell. Mol. Life Sci. CMLS *63*, 1523–1537.

Armaghany, T., Wilson, J.D., Chu, Q., and Mills, G. (2012). Genetic Alterations in Colorectal Cancer. Gastrointest. Cancer Res. GCR *5*, 19–27.

Arora, A., and Scholar, E.M. (2005). Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. J. Pharmacol. Exp. Ther. *315*, 971–979.

Au, C.W.H., Siu, M.K.Y., Liao, X., Wong, E.S.Y., Ngan, H.Y.S., Tam, K.F., Chan, D.C.W., Chan, Q.K.Y., and Cheung, A.N.Y. (2009). Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in ovarian cancers - Effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome. Cancer Lett. *281*, 151–161.

Ávalos, Y., Canales, J., Bravo-Sagua, R., Criollo, A., Lavandero, S., and Quest, A.F.G. (2014). Tumor suppression and promotion by autophagy. BioMed Res. Int. *2014*, 603980.

Aveic, S., and Tonini, G.P. (2016). Resistance to receptor tyrosine kinase inhibitors in solid tumors: can we improve the cancer fighting strategy by blocking autophagy? Cancer Cell Int. *16*, 62.

Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. J. Cell Biol. *182*, 685–701.

Bai, H., Li, H., Li, W., Gui, T., Yang, J., Cao, D., and Shen, K. (2015). The PI3K/AKT/mTOR pathway is a potential predictor of distinct invasive and migratory capacities in human ovarian cancer cell lines. Oncotarget *6*, 25520–25532.

Barbacid, M. (1995). Neurotrophic factors and their receptors. Curr. Opin. Cell Biol. *7*, 148–155.

Barde, Y.A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. EMBO J. *1*, 549–553.

Barderas, R., Villar-Vázquez, R., Fernández-Aceñero, M.J., Babel, I., Peláez-García, A., Torres, S., and Casal, J.I. (2013). Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis. Sci. Rep. *3*.

Bayas, A., Kruse, N., Moriabadi, N.F., Weber, F., Hummel, V., Wohleben, G., Gold, R., Toyka, K.V., and Rieckmann, P. (2003). Modulation of cytokine mRNA expression by brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells. Neurosci. Lett. *335*, 155–158.

Beck, B., and Blanpain, C. (2013). Unravelling cancer stem cell potential. Nat. Rev. Cancer *13*, 727–738.

Bellanger, C., Dubanet, L., Lise, M.-C., Fauchais, A.-L., Bordessoule, D., Jauberteau, M.-O., and Troutaud, D. (2011). Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. PloS One *6*, e27213.

Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N.C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. Cell *126*, 107–120.

Bensaad, K., Cheung, E.C., and Vousden, K.H. (2009). Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. EMBO J. *28*, 3015–3026.

Besser, M., and Wank, R. (1999). Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *162*, 6303–6306.

Biffo, S., Offenhäuser, N., Carter, B.D., and Barde, Y.A. (1995). Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. Dev. Camb. Engl. *121*, 2461–2470.

Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., et al. (2013). Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. Immunity *39*, 782–795.

Blum, R., and Konnerth, A. (2005). Neurotrophin-Mediated Rapid Signaling in the Central Nervous System: Mechanisms and Functions. Physiology *20*, 70–78.

Boman, B.M., and Huang, E. (2008). Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *26*, 2828–2838.

Bouvier, A.-M., Latournerie, M., Jooste, V., Lepage, C., Cottet, V., and Faivre, J. (2008). The lifelong risk of metachronous colorectal cancer justifies long-term colonoscopic follow-up. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 *44*, 522–527.

Bracho-Valdés, I., Moreno-Alvarez, P., Valencia-Martínez, I., Robles-Molina, E., Chávez-Vargas, L., and Vázquez-Prado, J. (2011). mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. IUBMB Life *63*, 896–914.

Brech, A., Ahlquist, T., Lothe, R.A., and Stenmark, H. (2009). Autophagy in tumour suppression and promotion. Mol. Oncol. *3*, 366–375.

Brodeur, G.M., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Iyer, R., Varela, C.R., Light, J.E., Kolla, V., and Evans, A.E. (2009). Trk Receptor Expression and Inhibition in Neuroblastomas. Clin. Cancer Res. *15*, 3244–3250.

Buczacki, S., Davies, R.J., and Winton, D.J. (2011). Stem cells, quiescence and rectal carcinoma: an unexplored relationship and potential therapeutic target. Br. J. Cancer *105*, 1253–1259.

Burada, F., Nicoli, E.R., Ciurea, M.E., Uscatu, D.C., Ioana, M., and Gheonea, D.I. (2015). Autophagy in colorectal cancer: An important switch from physiology to pathology. World J. Gastrointest. Oncol. *7*, 271–284.

Caroleo, M.C., Costa, N., Bracci-Laudiero, L., and Aloe, L. (2001). Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. J. Neuroimmunol. *113*, 193–201.

Cazorla, M., Prémont, J., Mann, A., Girard, N., Kellendonk, C., and Rognan, D. (2011). Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. J. Clin. Invest. *121*, 1846–1857.

Chao, M.V. (2003). Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. Nat. Rev. Neurosci. *4*, 299–309.

Chen, A. (2013). Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. Mol. Med. Rep.

Chen, N., and Karantza, V. (2011). Autophagy as a therapeutic target in cancer. Cancer Biol. Ther. *11*, 157–168.

Chen, Y., Zeng, J., Cen, L., Chen, Y., Wang, X., Yao, G., Wang, W., Qi, W., and Kong, K. (2009). Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system. J. Int. Med. Res. *37*, 281–288.

Chen, Z., Gao, S., Wang, D., Song, D., and Feng, Y. (2016). Colorectal cancer cells are resistant to anti-EGFR monoclonal antibody through adapted autophagy. Am. J. Transl. Res. *8*, 1190–1196.

Chiacchiera, F., and Simone, C. (2009). Inhibition of p38alpha unveils an AMPK-FoxO3A axis linking autophagy to cancer-specific metabolism. Autophagy *5*, 1030–1033.

Chittaranjan, S. [b1] (analytic), Bortnik, S. [b1 b4] (analytic), Dragowska, W.H. [b2] (analytic), JING XU [b1 b8] (analytic), Abeysundara, N. [b1] (analytic), Leung, A. [b1] (analytic), Go, N.E. [b1 b8] (analytic), Devorkin, L. [b1 b8] (analytic), Weppler, S.A. [b2] (analytic), Gelmon, K. [b2 b3 b5] (analytic), et al. (2014). Autophagy Inhibition Augments the Anticancer Effects of Epirubicin Treatment in Anthracycline-Sensitive and -Resistant Triple-Negative Breast Cancer (English). Clin Cancer Res Print *20*, 3159–3173.

Church, D.N., Midgley, R., and Kerr, D.J. (2013). Stage II colon cancer. Chin. Clin. Oncol. *2*, 16.

Clevers, H. (2004a). Wnt breakers in colon cancer. Cancer Cell *5*, 5–6.

Clevers, H. (2004b). At the crossroads of inflammation and cancer. Cell *118*, 671–674.

Clevers, H. (2006). Wnt/β-Catenin Signaling in Development and Disease. Cell *127*, 469–480.

Clevers, H., and Batlle, E. (2006). EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. Cancer Res. *66*, 2–5.

Codogno, P., and Meijer, A.J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. Cell Death Differ. *12 Suppl 2*, 1509–1518.

Coissieux, M.-M., Tomsic, J., Castets, M., Hampel, H., Tuupanen, S., Andrieu, N., Comeras, I., Drouet, Y., Lasset, C., Liyanarachchi, S., et al. (2011). Variants in the netrin-1 receptor UNC5C prevent apoptosis and increase risk of familial colorectal cancer. Gastroenterology *141*, 2039–2046.

Corradetti, M.N., and Guan, K.-L. (2006). Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? Oncogene *25*, 6347–6360.

Crighton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K.M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. Cell *126*, 121–134.

de la Cruz-Morcillo, M.A., García-Cano, J., Arias-González, L., García-Gil, E., Artacho-Cordón, F., Ríos-Arrabal, S., Valero, M.L., Cimas, F.J., Serrano-Oviedo, L., Villas, M.V., et al. (2013). Abrogation of the p38 MAPK α signaling pathway does not promote radioresistance but its activity is required for 5-Fluorouracil-associated radiosensitivity. Cancer Lett. *335*, 66–74.

Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000). Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. J. Cell Sci. *113 Pt 24*, 4441–4450.

Cuervo, A.M., and Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. Cell Res. *24*, 92–104.

Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., and Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. Science *305*, 1292–1295.

Cui, J., Hu, Y.-F., Feng, X.-M., Tian, T., Guo, Y.-H., Ma, J.-W., Nan, K.-J., and Zhang, H.-Y. (2014). EGFR inhibitors and autophagy in cancer treatment. Tumor Biol. *35*, 11701–11709.

Day, F.L., Jorissen, R.N., Lipton, L., Mouradov, D., Sakthianandeswaren, A., Christie, M., Li, S., Tsui, C., Tie, J., Desai, J., et al. (2013). PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *19*, 3285–3296.

De la Cruz-Morcillo, M.A., Berger, J., Sánchez-Prieto, R., Saada, S., Naves, T., Guillaudeau, A., Perraud, A., Sindou, P., Lacroix, A., Descazeaud, A., et al. (2016). p75 neurotrophin receptor and pro-BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma. Oncotarget *7*, 34480–34497.

De Roock, W., Claes, B., Bernasconi, D., De Schutter, J., Biesmans, B., Fountzilas, G., Kalogeras, K.T., Kotoula, V., Papamichael, D., Laurent-Puig, P., et al. (2010). Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. *11*, 753–762.

De Roock, W., De Vriendt, V., Normanno, N., Ciardiello, F., and Tejpar, S. (2011). KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol. *12*, 594–603.

Dechant, G., and Barde, Y.A. (1997). Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. Curr. Opin. Neurobiol. *7*, 413–418.

Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., et al. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. Cancer Cell *10*, 51–64.

Degirolamo, C., Modica, S., Palasciano, G., and Moschetta, A. (2011). Bile acids and colon cancer: Solving the puzzle with nuclear receptors. Trends Mol. Med. *17*, 564–572.

Deinhardt, K., and Jeanneteau, F. (2012). More Than Just an OFF-Switch: The Essential Role of Protein Dephosphorylation in the Modulation of BDNF Signaling Events. In Protein Phosphorylation in Human Health, C. Huang, ed. (InTech), p.

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

Diaz-Cano, S.J. (2012). Tumor Heterogeneity: Mechanisms and Bases for a Reliable Application of Molecular Marker Design. Int. J. Mol. Sci. *13*, 1951–2011.

Douillard, J.-Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., et al. (2013). Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. N. Engl. J. Med. *369*, 1023–1034.

Douma, S., van Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., van Garderen, E., and Peeper, D.S. (2004). Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. Nature *430*, 1034–1039.

Dubanet, L., Bentayeb, H., Petit, B., Olivrie, A., Saada, S., de la Cruz-Morcillo, M.A., Lalloué, F., Gourin, M.-P., Bordessoule, D., Faumont, N., et al. (2015). Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. Br. J. Cancer *113*, 934–944.

Duffy, A., Le, J., Sausville, E., and Emadi, A. (2015). Autophagy modulation: a target for cancer treatment development. Cancer Chemother. Pharmacol. *75*, 439–447.

Dunn, W.A. (1990). Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. J. Cell Biol. *110*, 1923–1933.

Dupont, J., Renou, J.P., Shani, M., Hennighausen, L., and LeRoith, D. (2002). PTEN overexpression suppresses proliferation and differentiation and enhances apoptosis of the mouse mammary epithelium. J. Clin. Invest. *110*, 815–825.

Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. Science *331*, 456–461.

Eide, F.F., Vining, E.R., Eide, B.L., Zang, K., Wang, X.Y., and Reichardt, L.F. (1996). Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *16*, 3123–3129.

English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., and Cobb, M.H. (1999). New insights into the control of MAP kinase pathways. Exp. Cell Res. *253*, 255–270.

Fan, M., Sun, J., Wang, W., Fan, J., Wang, L., Zhang, X., Yang, A., Wang, W., Zhang, R., and Li, J. (2014). Tropomyosin-related kinase B promotes distant metastasis of colorectal cancer through protein kinase B-mediated anoikis suppression and correlates with poor prognosis. Apoptosis Int. J. Program. Cell Death *19*, 860–870.

Fan, T.-F., Bu, L.-L., Wang, W.-M., Ma, S.-R., Liu, J.-F., Deng, W.-W., Mao, L., Yu, G.-T., Huang, C.-F., Liu, B., et al. (2015). Tumor growth suppression by inhibiting both autophagy and STAT3 signaling in HNSCC. Oncotarget *6*, 43581–43593.

Fanburg-Smith, J.C., and Miettinen, M. (2001). Low-affinity nerve growth factor receptor (p75) in dermatofibrosarcoma protuberans and other nonneural tumors: a study of 1,150 tumors and fetal and adult normal tissues. Hum. Pathol. *32*, 976–983.

de Farias, C.B., Heinen, T.E., dos Santos, R.P., Abujamra, A.L., Schwartsmann, G., and Roesler, R. (2012). BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. Biochem. Biophys. Res. Commun. *425*, 328–332.

Fauchais, A.-L., Lalloué, F., Lise, M.-C., Boumediene, A., Preud'homme, J.-L., Vidal, E., and Jauberteau, M.-O. (2008). Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 3027–3038.

Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. Annu. Rev. Pathol. *6*, 479–507.

Fearon, E.R., and Pierceall, W.E. (1995). The deleted in colorectal cancer (DCC) gene: a candidate tumour suppressor gene encoding a cell surface protein with similarity to neural cell adhesion molecules. Cancer Surv. *24*, 3–17.

Ferrara, N., Hillan, K.J., and Novotny, W. (2005). Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. Biochem. Biophys. Res. Commun. *333*, 328–335.

Flanagan, S.P. (1966). “Nude”, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. Genet. Res. *8*, 295–309.

Florez-McClure, M.L., Linseman, D.A., Chu, C.T., Barker, P.A., Bouchard, R.J., Le, S.S., Laessig, T.A., and Heidenreich, K.A. (2004). The p75 neurotrophin receptor can induce autophagy and death of cerebellar Purkinje neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 4498–4509.

Frattini, M., Saletti, P., Romagnani, E., Martin, V., Molinari, F., Ghisletta, M., Camponovo, A., Etienne, L.L., Cavalli, F., and Mazzucchelli, L. (2007). PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. Br. J. Cancer *97*, 1139–1145.

Friedman, W.J., and Greene, L.A. (1999a). Neurotrophin signaling via Trks and p75. Exp. Cell Res. *253*, 131–142.

Friedman, W.J., and Greene, L.A. (1999b). Neurotrophin signaling via Trks and p75. Exp. Cell Res. *253*, 131–142.

Fujikawa, H., Tanaka, K., Toiyama, Y., Saigusa, S., Inoue, Y., Uchida, K., and Kusunoki, M. (2012). High TrkB expression levels are associated with poor prognosis and EMT induction in colorectal cancer cells. J. Gastroenterol. *47*, 775–784.

Furuta, S., Hidaka, E., Ogata, A., Yokota, S., and Kamata, T. (2004). Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. Oncogene *23*, 3898–3904.

Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J.M., Amaravadi, R.K., Baehrecke, E.H., Cecconi, F., Codogno, P., Debnath, J., Gewirtz, D.A., Karantza, V., et al. (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. EMBO J. *34*, 856–880.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science *313*, 1960–1964.

Galon, J., Fridman, W.-H., and Pagès, F. (2007). The Adaptive Immunologic Microenvironment in Colorectal Cancer: A Novel Perspective. Cancer Res. *67*, 1883–1886.

Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H.K., Berger, A., Lagorce, C., Lugli, A., Zlobec, I., Hartmann, A., Bifulco, C., et al. (2014). Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. J. Pathol. *232*, 199–209.

García-Mauriño, S., Alcaide, A., and Domínguez, C. (2012). Pharmacological control of autophagy: therapeutic perspectives in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. Curr. Pharm. Des. *18*, 3853–3873.

Gelino, S., and Hansen, M. (2012). Autophagy - An Emerging Anti-Aging Mechanism. J. Clin. Exp. Pathol. *Suppl 4*.

Genevois, A.-L., Ichim, G., Coissieux, M.-M., Lambert, M.-P., Lavial, F., Goldschneider, D., Jarrosson-Wuilleme, L., Lepinasse, F., Gouysse, G., Herceg, Z., et al. (2013). Dependence receptor TrkC is a putative colon cancer tumor suppressor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 3017–3022.

Ghaemimanesh, F., Ahmadian, G., Talebi, S., Zarnani, A.-H., Behmanesh, M., Hemmati, S., Hadavi, R., Jeddi-Tehrani, M., Farzi, M., Akhondi, M.M., et al. (2014). The effect of sortilin silencing on ovarian carcinoma cells. Avicenna J. Med. Biotechnol. *6*, 169–177.

Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Harris, A.L., Polychronidis, A., Gatter, K.C., and Sivridis, E. (2010). Prognostic relevance of light chain 3 (LC3A) autophagy patterns in colorectal adenocarcinomas. J. Clin. Pathol. *63*, 867–872.

González-Polo, R.-A., Boya, P., Pauleau, A.-L., Jalil, A., Larochette, N., Souquère, S., Eskelinen, E.-L., Pierron, G., Saftig, P., and Kroemer, G. (2005). The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. J. Cell Sci. *118*, 3091–3102.

Gotink, K.J., and Verheul, H.M.W. (2010). Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? Angiogenesis *13*, 1–14.

Gozuacik, D., and Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene *23*, 2891–2906.

Green, J.E., and Hudson, T. (2005). The promise of genetically engineered mice for cancer prevention studies. Nat. Rev. Cancer *5*, 184–198.

Groulx, J.-F., Khalfaoui, T., Benoit, Y.D., Bernatchez, G., Carrier, J.C., Basora, N., and Beaulieu, J.-F. (2012). Autophagy is active in normal colon mucosa. Autophagy *8*, 893–902.

Guo, D., Hou, X., Zhang, H., Sun, W., Zhu, L., Liang, J., and Jiang, X. (2011). More expressions of BDNF and TrkB in multiple hepatocellular carcinoma and anti-BDNF or K252a induced apoptosis, supressed invasion of HepG2 and HCCLM3 cells. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR *30*, 97.

Guo, J.Y., Xia, B., and White, E. (2013). Autophagy-Mediated Tumor Promotion. Cell *155*, 1216–1219.

Hallböök, F., Ibáñez, C.F., and Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary. Neuron *6*, 845–858.

Hammond, W.A., Swaika, A., and Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. Ther. Adv. Med. Oncol. *8*, 57–84.

Han, K., Kim, J., and Choi, M. (2015). Autophagy mediates phase transitions from cell death to life. Heliyon *1*, e00027.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Harel, L., Costa, B., and Fainzilber, M. (2010). On the death Trk. Dev. Neurobiol. *70*, 298–303.

Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev. *18*, 1926–1945.

Hayat, M.A. (2011). Stem Cells and Cancer Stem Cells, Volume 1: Stem Cells and Cancer Stem Cells, Therapeutic Applications in Disease and Injury: (Springer Science & Business Media).

Hayat, M.A. (2013). Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging: Volume 1 - Molecular Mechanisms (Academic Press).

Herrup, K., and Shooter, E.M. (1975). Properties of the beta-nerve growth factor receptor in development. J. Cell Biol. *67*, 118–125.

Hewitt, R.E., McMarlin, A., Kleiner, D., Wersto, R., Martin, P., Tsokos, M., Stamp, G.W., Stetler-Stevenson, W.G., and Tsoskas, M. (2000). Validation of a model of colon cancer progression. J. Pathol. *192*, 446–454.

Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., and Barde, Y.A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. Nature *344*, 339–341.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. Mol. Biol. Cell *20*, 1981–1991.

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., and Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. Cancers *6*, 1769–1792.

Høyer-Hansen, M., and Jäättelä, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. Cell Death Differ. *14*, 1576–1582.

Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., et al. (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. Mol. Cell *25*, 193–205.

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

Huang, S.-M., Lin, C., Lin, H.-Y., Chiu, C.-M., Fang, C.-W., Liao, K.-F., Chen, D.-R., and Yeh, W.-L. (2015). Brain-derived neurotrophic factor regulates cell motility in human colon cancer. Endocr. Relat. Cancer *22*, 455–464.

Huang, Y.T., Lai, P.C., Wu, C.C., Hsu, S.H., Cheng, C.C., Lan, Y.F., and Chiu, T.H. (2010). BDNF mediated TrkB activation is a survival signal for transitional cell carcinoma cells. Int. J. Oncol. *36*, 1469–1476.

Huerta, S., Harris, D.M., Jazirehi, A., Bonavida, B., Elashoff, D., Livingston, E.H., and Heber, D. (2003). Gene expression profile of metastatic colon cancer cells resistant to cisplatin-induced apoptosis. Int. J. Oncol. *22*, 663–670.

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell *115*, 577–590.

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

ISOZAKI, T., FUJITA, M., YAMADA, S., IMADOME, K., SHOJI, Y., YASUDA, T., NAKAYAMA, F., IMAI, T., and MATSUBARA, H. (2016). Effects of carbon ion irradiation and X-ray irradiation on the ubiquitylated protein accumulation. Int. J. Oncol. *49*, 144–152.

Janku, F., McConkey, D.J., Hong, D.S., and Kurzrock, R. (2011). Autophagy as a target for anticancer therapy. Nat. Rev. Clin. Oncol. *8*, 528–539.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. CA. Cancer J. Clin. *61*, 69–90.

Jia, S., Wang, W., Hu, Z., Shan, C., Wang, L., Wu, B., Yang, Z., Yang, X., and Lei, D. (2015). BDNF mediated TrkB activation contributes to the EMT progression and the poor prognosis in human salivary adenoid cystic carcinoma. Oral Oncol. *51*, 64–70.

Jiang, H., Cheng, D., Liu, W., Peng, J., and Feng, J. (2010). Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3. Biochem. Biophys. Res. Commun. *395*, 471–476.

Juhasz, G., and Neufeld, T.P. (2006). Autophagy: A Forty-Year Search for a Missing Membrane Source. PLOS Biol *4*, e36.

Jung, B., Smith, E.J., Doctolero, R.T., Gervaz, P., Alonso, J.C., Miyai, K., Keku, T., Sandler, R.S., and Carethers, J.M. (2006). Influence of target gene mutations on survival, stage and histology in sporadic microsatellite unstable colon cancers. Int. J. Cancer *118*, 2509–2513.

Jung, B., Gomez, J., Chau, E., Cabral, J., Lee, J.K., Anselm, A., Slowik, P., Ream-Robinson, D., Messer, K., Sporn, J., et al. (2009). Activin Signaling in Microsatellite Stable Colon Cancers Is Disrupted by a Combination of Genetic and Epigenetic Mechanisms. PLOS ONE *4*, e8308.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J. *19*, 5720–5728.

Kaplan, D.R., Martin-Zanca, D., and Parada, L.F. (1991a). Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. Nature *350*, 158–160.

Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V., and Parada, L.F. (1991b). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. Science *252*, 554–558.

Karanasios, E., Stapleton, E., Manifava, M., Kaizuka, T., Mizushima, N., Walker, S.A., and Ktistakis, N.T. (2013). Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. J. Cell Sci. *126*, 5224–5238.

Karim, B.O., and Huso, D.L. (2013). Mouse models for colorectal cancer. Am. J. Cancer Res. *3*, 240–250.

Karin, M. (1995). The Regulation of AP-1 Activity by Mitogen-activated Protein Kinases. J. Biol. Chem. *270*, 16483–16486.

Kawamura, N., Kawamura, K., Manabe, M., and Tanaka, T. (2010). Inhibition of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling suppresses choriocarcinoma cell growth. Endocrinology *151*, 3006–3014.

Kayali, A.G., Austin, D.A., and Webster, N.J. (2000). Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. Diabetes *49*, 1783–1793.

Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in Saccharomyces cerevisiae. J. Cell Biol. *152*, 519–530.

Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. Arch. Biochem. Biophys. *462*, 245–253.

Kim, J., Huang, W.-P., Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J. (2002). Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. J. Biol. Chem. *277*, 763–773.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat. Cell Biol. *13*, 132–141.

Kim, M.S., Lee, W.S., Jeong, J., Kim, S.-J., and Jin, W. (2015). Induction of metastatic potential by TrkB via activation of IL6/JAK2/STAT3 and PI3K/AKT signaling in breast cancer. Oncotarget *6*, 40158–40171.

Kim, W.K., Pyee, Y., Chung, H.-J., Park, H.J., Hong, J.-Y., Son, K.H., and Lee, S.K. (2016). Antitumor Activity of Spicatoside A by Modulation of Autophagy and Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells. J. Nat. Prod. *79*, 1097–1104.

Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. J. Cell Biol. *151*, 263–276.

Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., et al. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. Dev. Cell *5*, 539–545.

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy *12*, 1–222.

Konda, B., Shum, H., and Rajdev, L. (2015). Anti-angiogenic agents in metastatic colorectal cancer. World J. Gastrointest. Oncol. *7*, 71–86.

Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., and Peter, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. Nat. Cell Biol. *10*, 602–610.

Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 1004–1010.

Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. Mol. Cell *40*, 280–293.

Kwon, S., and Christian, J.L. (2011). Sortilin Associates with Transforming Growth Factor-β Family Proteins to Enhance Lysosome-mediated Degradation. J. Biol. Chem. *286*, 21876–21885.

Laderoute, K.R., Amin, K., Calaoagan, J.M., Knapp, M., Le, T., Orduna, J., Foretz, M., and Viollet, B. (2006). 5′-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Induced by Low-Oxygen and Glucose Deprivation Conditions Found in Solid-Tumor Microenvironments. Mol. Cell. Biol. *26*, 5336–5347.

Lai, M.-C., Chang, C.-M., and Sun, H.S. (2016). Hypoxia Induces Autophagy through Translational Up-Regulation of Lysosomal Proteins in Human Colon Cancer Cells. PLOS ONE *11*, e0153627.

de Lau, W., Barker, N., and Clevers, H. (2007). WNT signaling in the normal intestine and colorectal cancer. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *12*, 471–491.

Laurent-Puig, P., Agostini, J., and Maley, K. (2010). [Colorectal oncogenesis]. Bull. Cancer (Paris) *97*, 1311–1321.

Lawlor, M.A., and Alessi, D.R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? J. Cell Sci. *114*, 2903–2910.

Leach, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomäki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L.A., and Nyström-Lahti, M. (1993). Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cell *75*, 1215–1225.

Lee, J.W., Park, S., Takahashi, Y., and Wang, H.-G. (2010). The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. PloS One *5*, e15394.

Lefevre, J.H., Rodrigue, C.M., Mourra, N., Bennis, M., Flejou, J.-F., Parc, R., Tiret, E., Gespach, C., and Parc, Y.R. (2006). Implication of MYH in colorectal polyposis. Ann. Surg. *244*, 874-879-880.

Lefort, S., Joffre, C., Kieffer, Y., Givel, A.-M., Bourachot, B., Zago, G., Bieche, I., Dubois, T., Meseure, D., Vincent-Salomon, A., et al. (2015). Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. Autophagy *10*, 2122–2142.

Lessmann, V., Gottmann, K., and Malcangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. Prog. Neurobiol. *69*, 341–374.

Levi-Montalcini, R., and Cohen, S. (1956). IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF A NERVE GROWTH-STIMULATING AGENT ISOLATED FROM SNAKE VENOM*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *42*, 695–699.

Levine, B., and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? J. Clin. Invest. *115*, 2679–2688.

Lévy, J., Cacheux, W., Bara, M.A., L'Hermitte, A., Lepage, P., Fraudeau, M., Trentesaux, C., Lemarchand, J., Durand, A., Crain, A.-M., et al. (2015). Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. Nat. Cell Biol. *17*, 1062–1073.

Leystra, A.A., Deming, D.A., Zahm, C.D., Farhoud, M., Olson, T.J.P., Hadac, J.N., Nettekoven, L.A., Albrecht, D.M., Clipson, L., Sullivan, R., et al. (2012). Mice expressing activated PI3K rapidly develop advanced colon cancer. Cancer Res. *72*, 2931–2936.

Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S., and Kuwano, H. (2010). Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 *46*, 1900–1909.

Li, S.-S., Liu, J.-J., Wang, S., Tang, Q.-L., Liu, B.-B., and Yang, X.-M. (2014). Clinical significance of TrkB expression in nasopharyngeal carcinoma. Oncol. Rep. *31*, 665–672.

Li, Y., Lam, S., Mak, J.C., Zheng, C., and Ho, J.C. (2013). Erlotinib-induced autophagy in epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer. Lung Cancer Amst. Neth. *81*, 354–361.

Li, Z., Jaboin, J., Dennis, P.A., and Thiele, C.J. (2005). Genetic and Pharmacologic Identification of Akt as a Mediator of Brain-Derived Neurotrophic Factor/TrkB Rescue of Neuroblastoma Cells from Chemotherapy-Induced Cell Death. Cancer Res. *65*, 2070–2075.

Lim, S.-C., Hahm, K.-S., Lee, S.-H., and Oh, S.-H. (2010). Autophagy involvement in cadmium resistance through induction of multidrug resistance-associated protein and counterbalance of endoplasmic reticulum stress WI38 lung epithelial fibroblast cells. Toxicology *276*, 18–26.

Lin, L., and Baehrecke, E.H. (2015). Autophagy, cell death, and cancer. Mol. Cell. Oncol. *2*, e985913.

Liu, B., Bao, J.-K., Yang, J.-M., and Cheng, Y. (2013). Targeting autophagic pathways for cancer drug discovery. Chin. J. Cancer *32*, 113–120.

Löffler, A.S., Alers, S., Dieterle, A.M., Keppeler, H., Franz-Wachtel, M., Kundu, M., Campbell, D.G., Wesselborg, S., Alessi, D.R., and Stork, B. (2011). Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. Autophagy *7*, 696–706.

Lonze, B.E., and Ginty, D.D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. Neuron *35*, 605–623.

Lorin, S., Codogno, P., and Djavaheri-Mergny, M. (2008). [Autophagy: a new concept in cancer research]. Bull. Cancer (Paris) *95*, 43–50.

Luberg, K., Wong, J., Weickert, C.S., and Timmusk, T. (2010). Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. J. Neurochem. *113*, 952–964.

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 741–752.

Maiuri, M.C., Tasdemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J.M., Carnuccio, R., and Kroemer, G. (2009). Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. Cell Death Differ. *16*, 87–93.

Maiuri, M.C., Criollo, A., and Kroemer, G. (2010). Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. EMBO J. *29*, 515–516.

Majeski, A.E., and Dice, J.F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. Int. J. Biochem. Cell Biol. *36*, 2435–2444.

Martin-Zanca, D., Mitra, G., Long, L.K., and Barbacid, M. (1986). Molecular characterization of the human trk oncogene. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *51 Pt 2*, 983–992.

Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., et al. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. Cell *137*, 1062–1075.

Mathonnet, M., Perraud, A., Christou, N., Akil, H., Melin, C., Battu, S., Jauberteau, M.-O., and Denizot, Y. (2014). Hallmarks in colorectal cancer: Angiogenesis and cancer stem-like cells. World J. Gastroenterol. WJG *20*, 4189–4196.

Matsumoto, K., Wada, R.K., Yamashiro, J.M., Kaplan, D.R., and Thiele, C.J. (1995). Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. Cancer Res. *55*, 1798–1806.

Matsumoto, T., Numakawa, T., Adachi, N., Yokomaku, D., Yamagishi, S., Takei, N., and Hatanaka, H. (2001). Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release in cultured cortical neurons. J. Neurochem. *79*, 522–530.

Maurel, J., and Postigo, A. (2015). Prognostic and Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer. From the Preclinical Setting to Clinical Practice. Curr. Cancer Drug Targets *15*, 703–715.

McKay, M.M., and Morrison, D.K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. Oncogene *26*, 3113–3121.

Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. Nat. Rev. Cancer *6*, 449–458.

Meijer, A.J., and Codogno, P. (2007). AMP-activated protein kinase and autophagy. Autophagy *3*, 238–240.

Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J.H.P.M., Dubbelhuis, P.F., Helmond, M.T.J., Codogno, P., and Meijer, A.J. (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. J. Biol. Chem. *281*, 34870–34879.

Mélin, C., Perraud, A., Akil, H., Jauberteau, M.-O., Cardot, P., Mathonnet, M., and Battu, S. (2012). Cancer stem cell sorting from colorectal cancer cell lines by sedimentation field flow fractionation. Anal. Chem. *84*, 1549–1556.

Menéndez-Benito, V., and Neefjes, J. (2007). Autophagy in MHC class II presentation: sampling from within. Immunity *26*, 1–3.

Middlemas, D.S., Kihl, B.K., Zhou, J., and Zhu, X. (1999). Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and chemoprotection of human neuroblastoma cells. J. Biol. Chem. *274*, 16451–16460.

Miknyoczki, S.J., Lang, D., Huang, L., Klein-Szanto, A.J., Dionne, C.A., and Ruggeri, B.A. (1999). Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. Int. J. Cancer *81*, 417–427.

Mintern, J.D., and Harris, J. (2015). Autophagy and immunity. Immunol. Cell Biol. *93*, 1–2.

Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. Cell Death Differ. *12 Suppl 2*, 1535–1541.

Mizushima, N., and Kuma, A. (2008). Autophagosomes in GFP-LC3 Transgenic Mice. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *445*, 119–124.

Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. J. Cell Sci. *116*, 1679–1688.

Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I.R., and Schwartz, M. (2000). Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. J. Autoimmun. *15*, 331–345.

Moore, N., and Lyle, S. (2010). Quiescent, Slow-Cycling Stem Cell Populations in Cancer: A Review of the Evidence and Discussion of Significance. J. Oncol. *2011*, e396076.

Moore, B.R., Page-Sharp, M., Stoney, J.R., Ilett, K.F., Jago, J.D., and Batty, K.T. (2011). Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Allometric Scaling of Chloroquine in a Murine Malaria Model. Antimicrob. Agents Chemother. *55*, 3899–3907.

Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Vicencio, J.-M., Criollo, A., Maiuri, M.C., and Kroemer, G. (2009). Anti- and pro-tumor functions of autophagy. Biochim. Biophys. Acta *1793*, 1524–1532.

Morselli, E., Shen, S., Ruckenstuhl, C., Bauer, M.A., Mariño, G., Galluzzi, L., Criollo, A., Michaud, M., Maiuri, M.C., Chano, T., et al. (2011). p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. Cell Cycle Georget. Tex *10*, 2763–2769.

Mowla, S.J., Pareek, S., Farhadi, H.F., Petrecca, K., Fawcett, J.P., Seidah, N.G., Morris, S.J., Sossin, W.S., and Murphy, R.A. (1999). Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 2069–2080.

Muller, P.A.J., Vousden, K.H., and Norman, J.C. (2011). p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. J. Cell Biol. *192*, 209–218.

Nair, U., Cao, Y., Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Roles of the lipid-binding motifs of Atg18 and Atg21 in the cytoplasm to vacuole targeting pathway and autophagy. J. Biol. Chem. *285*, 11476–11488.

Nakamura, K., Martin, K.C., Jackson, J.K., Beppu, K., Woo, C.-W., and Thiele, C.J. (2006). Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. Cancer Res. *66*, 4249–4255.

Nakamura, T., Saito, H., and Takekawa, M. (2013). SAPK pathways and p53 cooperatively regulate PLK4 activity and centrosome integrity under stress. Nat. Commun. *4*, 1775.

Nanda, A., Karim, B., Peng, Z., Liu, G., Qiu, W., Gan, C., Vogelstein, B., St Croix, B., Kinzler, K.W., and Huso, D.L. (2006). Tumor endothelial marker 1 (Tem1) functions in the growth and progression of abdominal tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 3351–3356.

Naves, T., Jawhari, S., Jauberteau, M.-O., Ratinaud, M.-H., and Verdier, M. (2013). Autophagy takes place in mutated p53 neuroblastoma cells in response to hypoxia mimetic CoCl(2). Biochem. Pharmacol. *85*, 1153–1161.

Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M.F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. Nat. Protoc. *2*, 1998–2004.

Nilsson, A.S., Fainzilber, M., Falck, P., and Ibáñez, C.F. (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. FEBS Lett. *424*, 285–290.

Nixon, R.A., and Yang, D.-S. (2011). Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. Neurobiol. Dis. *43*, 38–45.

Notte, A., Leclere, L., and Michiels, C. (2011). Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. Biochem. Pharmacol. *82*, 427–434.

Nye, S.H., Squinto, S.P., Glass, D.J., Stitt, T.N., Hantzopoulos, P., Macchi, M.J., Lindsay, N.S., Ip, N.Y., and Yancopoulos, G.D. (1992). K-252a and staurosporine selectively block autophosphorylation of neurotrophin receptors and neurotrophin-mediated responses. Mol. Biol. Cell *3*, 677–686.

Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. Nature *427*, 843–848.

Nykjaer, A., Willnow, T.E., and Petersen, C.M. (2005). p75NTR--live or let die. Curr. Opin. Neurobiol. *15*, 49–57.

Obermeier, A., Halfter, H., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1993). Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. EMBO J. *12*, 933–941.

Obrocea, F.L., Sajin, M., Marinescu, E.C., and Stoica, D. (2011). Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform pathologic reporting. Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol. *52*, 537–544.

Odate, S., Nakamura, K., Onishi, H., Kojima, M., Uchiyama, A., Nakano, K., Kato, M., Tanaka, M., and Katano, M. (2013). TrkB/BDNF signaling pathway is a potential therapeutic target for pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. Lung Cancer *79*, 205–214.

O'Donovan, T.R., Rajendran, S., O'Reilly, S., O'Sullivan, G.C., and McKenna, S.L. (2015). Lithium Modulates Autophagy in Esophageal and Colorectal Cancer Cells and Enhances the Efficacy of Therapeutic Agents In Vitro and In Vivo. PLOS ONE *10*, e0134676.

Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. Mol. Cell. Biol. *26*, 9220–9231.

Ogier-Denis, E., Pattingre, S., El Benna, J., and Codogno, P. (2000). Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. J. Biol. Chem. *275*, 39090–39095.

Okamura, K., Harada, T., Wang, S., Ijichi, K., Furuyama, K., Koga, T., Okamoto, T., Takayama, K., Yano, T., and Nakanishi, Y. (2012). Expression of TrkB and BDNF is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. Lung Cancer Amst. Neth. *78*, 100–106.

Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. J. Biol. Chem. *282*, 24131–24145.

Pantelouris, E.M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. Nature *217*, 370–371.

Park, K.-J., Lee, S.-H., Lee, C.-H., Jang, J.-Y., Chung, J., Kwon, M.-H., and Kim, Y.-S. (2009). Upregulation of Beclin-1 expression and phosphorylation of Bcl-2 and p53 are involved in the JNK-mediated autophagic cell death. Biochem. Biophys. Res. Commun. *382*, 726–729.

Pascolo, S. (2016). Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. Eur. J. Pharmacol. *771*, 139–144.

Patapoutian, A., and Reichardt, L.F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. Curr. Opin. Neurobiol. *11*, 272–280.

Patel, S.B., Stenehjem, D.D., Gill, D.M., Tantravahi, S.K., Agarwal, A.M., Hsu, J., Vuong, W., Pal, S.K., and Agarwal, N. (2016). Everolimus Versus Temsirolimus in Metastatic Renal Cell Carcinoma After Progression With Previous Systemic Therapies. Clin. Genitourin. Cancer *14*, 153–159.

Peddareddigari, V.G., Wang, D., and DuBois, R.N. (2010). The Tumor Microenvironment in Colorectal Carcinogenesis. Cancer Microenviron. *3*, 149–166.

Perraud, A., Akil, H., Nouaille, M., Petit, D., Labrousse, F., Jauberteau, M.-O., and Mathonnet, M. (2012). Implications of cleaved caspase 3 and AIF expression in colorectal cancer based on patient age. Oncol. Rep. *27*, 1787–1793.

Petersen, C.M., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H.H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P., and Moestrup, S.K. (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. J. Biol. Chem. *272*, 3599–3605.

Peterson, T.E., Kirkpatrick, N.D., Huang, Y., Farrar, C.T., Marijt, K.A., Kloepper, J., Datta, M., Amoozgar, Z., Seano, G., Jung, K., et al. (2016). Dual inhibition of Ang-2 and VEGF

receptors normalizes tumor vasculature and prolongs survival in glioblastoma by altering macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. *113*, 4470–4475.

Polson, H.E.J., de Lartigue, J., Rigden, D.J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M.J., and Tooze, S.A. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. Autophagy *6*, 506–522.

Ramanathan, V., Jin, G., Westphalen, C.B., Whelan, A., Dubeykovskiy, A., Takaishi, S., and Wang, T.C. (2012). P53 gene mutation increases progastrin dependent colonic proliferation and colon cancer formation in mice. Cancer Invest. *30*, 275–286.

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. Physiol. Rev. *90*, 1383–1435.

Razi, M., Chan, E.Y.W., and Tooze, S.A. (2009). Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. J. Cell Biol. *185*, 305–321.

Rebecca, V.W., and Amaravadi, R.K. (2016). Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. Oncogene *35*, 1–11.

Reggiori, F., and Tooze, S.A. (2012). Autophagy regulation through Atg9 traffic. J. Cell Biol. *198*, 151–153.

Rende, M., Rambotti, M.G., Stabile, A.M., Pistilli, A., Montagnoli, C., Chiarelli, M.T., and Mearini, E. (2010). Novel localization of low affinity NGF receptor (p75) in the stroma of prostate cancer and possible implication in neoplastic invasion: an immunohistochemical and ultracytochemical study. The Prostate *70*, 555–561.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature *414*, 105–111.

Reyjal, J., Cormier, K., and Turcotte, S. (2014). Autophagy and cell death to target cancer cells: exploiting synthetic lethality as cancer therapies. Adv. Exp. Med. Biol. *772*, 167–188.

Ricci, A., Greco, S., Mariotta, S., Felici, L., Bronzetti, E., Cavazzana, A., Cardillo, G., Amenta, F., Bisetti, A., and Barbolini, G. (2001). Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *25*, 439–446.

Ricci-Vitiani, L., Fabrizi, E., Palio, E., and De Maria, R. (2009). Colon cancer stem cells. J. Mol. Med. Berl. Ger. *87*, 1097–1104.

Risberg, K., Redalen, K.R., Sønstevold, L., Bjørnetrø, T., Sølvernes, J., and Ree, A.H. (2016). Pro-survival responses to the dual inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins and mTOR-mediated signaling in hypoxic colorectal carcinoma cells. BMC Cancer *16*, 531.

Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., and Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene. Genes Cancer *2*, 466–474.

Rodriguez-Tébar, A., Dechant, G., and Barde, Y.A. (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. Neuron *4*, 487–492.

Roesler, R., de Farias, C.B., Abujamra, A.L., Brunetto, A.L., and Schwartsmann, G. (2011). BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. Expert Rev. Anticancer Ther. *11*, 1473–1475.

Roselli, S., Pundavela, J., Demont, Y., Faulkner, S., Keene, S., Attia, J., Jiang, C.C., Zhang, X.D., Walker, M.M., and Hondermarck, H. (2015). Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. Oncotarget *6*, 10473–10486.

Roux, P.P., and Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. Prog. Neurobiol. *67*, 203–233.

Roux, P.P., Bhakar, A.L., Kennedy, T.E., and Barker, P.A. (2001). The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. J. Biol. Chem. *276*, 23097–23104.

Royce, M.E., and Osman, D. (2015). Everolimus in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. Breast Cancer Basic Clin. Res. *9*, 73–79.

Russo, M., Misale, S., Wei, G., Siravegna, G., Crisafulli, G., Lazzari, L., Corti, G., Rospo, G., Novara, L., Mussolin, B., et al. (2016). Acquired Resistance to the TRK Inhibitor Entrectinib in Colorectal Cancer. Cancer Discov. *6*, 36–44.

Rydén, M., and Ibáñez, C.F. (1996). Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC. J. Biol. Chem. *271*, 5623–5627.

Sabers, C.J., Martin, M.M., Brunn, G.J., Williams, J.M., Dumont, F.J., Wiederrecht, G., and Abraham, R.T. (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. J. Biol. Chem. *270*, 815–822.

Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 623–635.

Sakai, N., Wada, T., Furuichi, K., Iwata, Y., Yoshimoto, K., Kitagawa, K., Kokubo, S., Kobayashi, M., Takeda, S., Kida, H., et al. (2002). p38 MAPK phosphorylation and NF-kappa B activation in human crescentic glomerulonephritis. Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc. *17*, 998–1004.

Sakaki, K., Wu, J., and Kaufman, R.J. (2008). Protein kinase Ctheta is required for autophagy in response to stress in the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. *283*, 15370–15380.

Sakitani, K., Hirata, Y., Hikiba, Y., Hayakawa, Y., Ihara, S., Suzuki, H., Suzuki, N., Serizawa, T., Kinoshita, H., Sakamoto, K., et al. (2015). Inhibition of autophagy exerts anti-colon cancer effects via apoptosis induced by p53 activation and ER stress. BMC Cancer *15*, 795.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Mol. Cell *22*, 159–168.

Sartore-Bianchi, A., Ardini, E., Bosotti, R., Amatu, A., Valtorta, E., Somaschini, A., Raddrizzani, L., Palmeri, L., Banfi, P., Bonazzina, E., et al. (2016). Sensitivity to Entrectinib Associated With a Novel LMNA-NTRK1 Gene Fusion in Metastatic Colorectal Cancer. J. Natl. Cancer Inst. *108*.

Sasahira, T., Ueda, N., Kurihara, M., Matsushima, S., Ohmori, H., Fujii, K., Bhawal, U.K., Yamamoto, K., Kirita, T., and Kuniyasu, H. (2013). Tropomyosin receptor kinases B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma. Hum. Pathol. *44*, 1098–1106.

Sasaki, K., Tsuno, N.H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y., Nishikawa, T., Shuno, Y., Hongo, K., Hiyoshi, M., et al. (2010a). Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. BMC Cancer *10*, 370.

Sasaki, K., Tsuno, N.H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y., Nishikawa, T., Shuno, Y., Hongo, K., Hiyoshi, M., et al. (2010b). Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. BMC Cancer *10*, 370.

Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Horie, Y., Bachmaier, K., Fata, J.E., Li, M., Suzuki, A., Bouchard, D., Ho, A., Redston, M., et al. (2000). Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. Nature *406*, 897–902.

Sato, K., Tsuchihara, K., Fujii, S., Sugiyama, M., Goya, T., Atomi, Y., Ueno, T., Ochiai, A., and Esumi, H. (2007). Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. Cancer Res. *67*, 9677–9684.

Satoh, F., Mimata, H., Nomura, T., Fujita, Y., Shin, T., Sakamoto, S., Hamada, Y., and Nomura, Y. (2001). Autocrine expression of neurotrophins and their receptors in prostate cancer. Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc. *8*, S28-34.

Scarlatti, F., Bauvy, C., Ventruti, A., Sala, G., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Ghidoni, R., and Codogno, P. (2004). Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. J. Biol. Chem. *279*, 18384–18391.

Schecterson, L.C., and Bothwell, M. (2010). Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. Dev. Neurobiol. *70*, 332–338.

Schmitz, K.J., Ademi, C., Bertram, S., Schmid, K.W., and Baba, H.A. (2016). Prognostic relevance of autophagy-related markers LC3, p62/sequestosome 1, Beclin-1 and ULK1 in colorectal cancer patients with respect to KRAS mutational status. World J. Surg. Oncol. *14*.

Schneikert, J., and Behrens, J. (2007). The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. Gut *56*, 417–425.

Sclabas, G.M., Fujioka, S., Schmidt, C., Li, Z., Frederick, W.A.I., Yang, W., Yokoi, K., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Hess, K.R., et al. (2005). Overexpression of tropomysin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *11*, 440–449.

Scoville, D.H., Sato, T., He, X.C., and Li, L. (2008). Current view: intestinal stem cells and signaling. Gastroenterology *134*, 849–864.

Seglen, P.O., and Gordon, P.B. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *79*, 1889–1892.

Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Chrétien, M., and Murphy, R.A. (1996). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. FEBS Lett. *379*, 247–250.

Selvakumaran, M., Amaravadi, R.K., Vasilevskaya, I.A., and O'Dwyer, P.J. (2013). Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *19*, 2995–3007.

Shao, Z., Bao, Q., Jiang, F., Qian, H., Fang, Q., and Hu, X. (2015). VS-5584, a Novel PI3K-mTOR Dual Inhibitor, Inhibits Melanoma Cell Growth In Vitro and In Vivo. PLOS ONE *10*, e0132655.

Sharif, S., O'Connell, M.J., Yothers, G., Lopa, S., and Wolmark, N. (2008). FOLFOX and FLOX regimens for the adjuvant treatment of resected stage II and III colon cancer. Cancer Invest. *26*, 956–963.

Shibutani, S.T., and Yoshimori, T. (2014). A current perspective of autophagosome biogenesis. Cell Res. *24*, 58–68.

Shim, B.Y., Sun, D.S., Won, H.S., Lee, M.A., Hong, S.U., Jung, J.-H., Cho, H.-M., and Ko, Y.H. (2016). Role of autophagy-related protein expression in patients with rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. BMC Cancer *16*, 207.

Shimizu, S., Konishi, A., Nishida, Y., Mizuta, T., Nishina, H., Yamamoto, A., and Tsujimoto, Y. (2010). Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. Oncogene *29*, 2070–2082.

Shimizu, S., Yoshida, T., Tsujioka, M., and Arakawa, S. (2014). Autophagic cell death and cancer. Int. J. Mol. Sci. *15*, 3145–3153.

Skaper, S.D. (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *846*, 1–12.

Smit, M.A., Geiger, T.R., Song, J.-Y., Gitelman, I., and Peeper, D.S. (2009). A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis. Mol. Cell. Biol. *29*, 3722–3737.

Smith, E.D., Prieto, G.A., Tong, L., Sears-Kraxberger, I., Rice, J.D., Steward, O., and Cotman, C.W. (2014). Rapamycin and interleukin-1β impair brain-derived neurotrophic factor-dependent neuron survival by modulating autophagy. J. Biol. Chem. *289*, 20615–20629.

Sridharan, S., Jain, K., and Basu, A. (2011). Regulation of Autophagy by Kinases. Cancers *3*, 2630–2654.

Stoilov, P., Castren, E., and Stamm, S. (2002). Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. Biochem. Biophys. Res. Commun. *290*, 1054–1065.

Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., et al. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. Cell Death Dis. *4*, e838.

Sui, X., Kong, N., Wang, X., Fang, Y., Hu, X., Xu, Y., Chen, W., Wang, K., Li, D., Jin, W., et al. (2014). JNK confers 5-fluorouracil resistance in p53-deficient and mutant p53-expressing colon cancer cells by inducing survival autophagy. Sci. Rep. *4*.

Sun, Y., Tian, H., and Wang, L. (2015). Effects of PTEN on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells via the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway. Oncol. Rep. *33*, 1828–1836.

Suter, U., Heymach, J.V., and Shooter, E.M. (1991). Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. EMBO J. *10*, 2395–2400.

Sweeney, S.E., and Firestein, G.S. (2007). Primer: signal transduction in rheumatic disease--a clinician's guide. Nat. Clin. Pract. Rheumatol. *3*, 651–660.

Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Gulino, A., and Mackay, A.R. (2005). Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. Future Oncol. Lond. Engl. *1*, 689–698.

Tan, S.H., Shui, G., Zhou, J., Li, J.J., Bay, B.-H., Wenk, M.R., and Shen, H.-M. (2012). Induction of autophagy by palmitic acid via protein kinase C-mediated signaling pathway independent of mTOR (mammalian target of rapamycin). J. Biol. Chem. *287*, 14364–14376.

Tanaka, K., Okugawa, Y., Toiyama, Y., Inoue, Y., Saigusa, S., Kawamura, M., Araki, T., Uchida, K., Mohri, Y., and Kusunoki, M. (2014). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)-Induced Tropomyosin-Related Kinase B (Trk B) Signaling Is a Potential Therapeutic Target for Peritoneal Carcinomatosis Arising from Colorectal Cancer. PLoS ONE *9*.

Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., and Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. Cancer Sci. *94*, 965–973.

Tang, J.-C., Feng, Y.-L., Liang, X., and Cai, X.-J. (2016). Autophagy in 5-Fluorouracil Therapy in Gastrointestinal Cancer: Trends and Challenges. Chin. Med. J. (Engl.) *129*, 456–463.

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

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

Tasdemir, E., Chiara Maiuri, M., Morselli, E., Criollo, A., D'Amelio, M., Djavaheri-Mergny, M., Cecconi, F., Tavernarakis, N., and Kroemer, G. (2008). A dual role of p53 in the control of autophagy. Autophagy *4*, 810–814.

Temraz, S., Mukherji, D., Alameddine, R., and Shamseddine, A. (2014). Methods of overcoming treatment resistance in colorectal cancer. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *89*, 217–230.

Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., et al. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 5455–5463.

Teng, K.K., Felice, S., Kim, T., and Hempstead, B.L. (2010). Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. Dev. Neurobiol. *70*, 350–359.

Thaker, A.I., Shaker, A., Rao, M.S., and Ciorba, M.A. (2012a). Modeling Colitis-Associated Cancer with Azoxymethane (AOM) and Dextran Sulfate Sodium (DSS). J. Vis. Exp. JoVE.

Thaker, A.I., Shaker, A., Rao, M.S., and Ciorba, M.A. (2012b). Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). J. Vis. Exp. JoVE.

Thiele, C.J., Li, Z., and McKee, A.E. (2009). On Trk—The TrkB Signal Transduction Pathway Is an Increasingly Important Target in Cancer Biology. Clin. Cancer Res. *15*, 5962–5967.

Thorburn, A. (2014). Autophagy and Its Effects: Making Sense of Double-Edged Swords. PLoS Biol. *12*.

Thorburn, A., Thamm, D.H., and Gustafson, D.L. (2014). Autophagy and Cancer Therapy. Mol. Pharmacol. *85*, 830–838.

Thyagarajan, A., Jedinak, A., Nguyen, H., Terry, C., Baldridge, L.A., Jiang, J., and Sliva, D. (2010). Triterpenes from Ganoderma Lucidum induce autophagy in colon cancer through the inhibition of p38 mitogen-activated kinase (p38 MAPK). Nutr. Cancer *62*, 630–640.

Todde, V., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J. (2009). Autophagy: Principles and significance in health and disease. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. *1792*, 3–13.

Tong, Y., Yang, W., and Koeffler, H.P. (2011). Mouse models of colorectal cancer. Chin. J. Cancer *30*, 450–462.

Truzzi, F., Marconi, A., Lotti, R., Dallaglio, K., French, L.E., Hempstead, B.L., and Pincelli, C. (2008). Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. J. Invest. Dermatol. *128*, 2031–2040.

Tsuchihara, K., Fujii, S., and Esumi, H. (2009). Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. Cancer Lett. *278*, 130–138.

Urfer, R., Tsoulfas, P., O'Connell, L., Shelton, D.L., Parada, L.F., and Presta, L.G. (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. EMBO J. *14*, 2795–2805.

Vaegter, C.B., Jansen, P., Fjorback, A.W., Glerup, S., Skeldal, S., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J.R., Tessarollo, L., Lewin, G.R., et al. (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and signaling by neurotrophins. Nat. Neurosci. *14*.

Van Cutsem, E., Köhne, C.-H., Láng, I., Folprecht, G., Nowacki, M.P., Cascinu, S., Shchepotin, I., Maurel, J., Cunningham, D., Tejpar, S., et al. (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *29*, 2011–2019.

Vanhecke, E., Adriaenssens, E., Verbeke, S., Meignan, S., Germain, E., Berteaux, N., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., and Hondermarck, H. (2011). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *17*, 1741–1752.

Vaseva, A.V., and Moll, U.M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. Biochim. Biophys. Acta *1787*, 414.

Vega, J.A., García-Suárez, O., Hannestad, J., Pérez-Pérez, M., and Germanà, A. (2003). Neurotrophins and the immune system. J. Anat. *203*, 1–19.

Voloshanenko, O., Erdmann, G., Dubash, T.D., Augustin, I., Metzig, M., Moffa, G., Hundsrucker, C., Kerr, G., Sandmann, T., Anchang, B., et al. (2013). Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. Nat. Commun. *4*, 2610.

Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. Cell *137*, 413–431.

Wagner, E.F., and Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Nat. Rev. Cancer *9*, 537–549.

Wang, J., Tan, X., Yang, Q., Zeng, X., Zhou, Y., Luo, W., Lin, X., Song, L., Cai, J., Wang, T., et al. (2016a). Inhibition of autophagy promotes apoptosis and enhances anticancer efficacy of adriamycin via augmented ROS generation in prostate cancer cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. *77*, 80–90.

Wang, Z., Du, T., Dong, X., Li, Z., Wu, G., and Zhang, R. (2016b). Autophagy inhibition facilitates erlotinib cytotoxicity in lung cancer cells through modulation of endoplasmic reticulum stress. Int. J. Oncol. *48*, 2558–2566.

Watson, A.J.M. (2004). Apoptosis and colorectal cancer. Gut *53*, 1701–1709.

Webber, J.L., and Tooze, S.A. (2010). Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. EMBO J. *29*, 27–40.

Weeraratna, A.T., Dalrymple, S.L., Lamb, J.C., Denmeade, S.R., Miknyoczki, S., Dionne, C.A., and Isaacs, J.T. (2001). Pan-trk Inhibition Decreases Metastasis and Enhances Host Survival in Experimental Models as a Result of Its Selective Induction of Apoptosis of Prostate Cancer Cells. Clin. Cancer Res. *7*, 2237–2245.

Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, P.R., and Büchler, M.W. (2005). Colorectal cancer. Lancet Lond. Engl. *365*, 153–165.

White, B.D., Chien, A.J., and Dawson, D.W. (2012). Dysregulation of Wnt/β-catenin Signaling in Gastrointestinal Cancers. Gastroenterology *142*, 219–232.

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

Wu, L., and Yan, B. (2011). Discovery of small molecules that target autophagy for cancer treatment. Curr. Med. Chem. *18*, 1866–1873.

Wu, W.K.K., Sakamoto, K.M., Milani, M., Aldana-Masankgay, G., Fan, D., Wu, K., Lee, C.W., Cho, C.H., Yu, J., and Sung, J.J.Y. (2010). Macroautophagy modulates cellular response to proteasome inhibitors in cancer therapy. Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother. *13*, 87–92.

Xie, Z., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2008a). Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. Mol. Biol. Cell *19*, 3290–3298.

Xie, Z., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2008b). Dissecting autophagosome formation: the missing pieces. Autophagy *4*, 920–922.

Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., and Stefanis, L. (2008). alpha-synuclein degradation by autophagic pathways: a potential key to Parkinson's disease pathogenesis. Autophagy *4*, 917–919.

Xilouri, M., Brekk, O.R., Landeck, N., Pitychoutis, P.M., Papasilekas, T., Papadopoulou-Daifoti, Z., Kirik, D., and Stefanis, L. (2013). Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates α-synuclein-induced neurodegeneration. Brain J. Neurol. *136*, 2130–2146.

Xiong, J., Zhou, L., Lim, Y., Yang, M., Zhu, Y.-H., Li, Z.-W., Zhou, F.H., Xiao, Z.-C., and Zhou, X.-F. (2013). Mature BDNF promotes the growth of glioma cells in vitro. Oncol. Rep. *30*, 2719–2724.

Xiong, J., Zhou, L.I., Lim, Y., Yang, M., Zhu, Y.-H., Li, Z.-W., Fu, D.-L., and Zhou, X.-F. (2015). Mature brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB are upregulated in human glioma tissues. Oncol. Lett. *10*, 223–227.

Yang, H.-Z., Ma, Y., Zhou, Y., Xu, L.-M., Chen, X.-J., Ding, W.-B., and Zou, H.-B. (2015a). Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment. Cancer Lett. *361*, 128–136.

Yang, K., Chen, X.-Z., Zhang, B., Yang, C., Chen, H.-N., Chen, Z.-X., Zhou, Z.-G., Chen, J.-P., and Hu, J.-K. (2011a). Is CD133 a biomarker for cancer stem cells of colorectal cancer and brain tumors? A meta-analysis. Int. J. Biol. Markers *26*, 173–180.

YANG, X., NIU, B., WANG, L., CHEN, M., KANG, X., WANG, L., JI, Y., and ZHONG, J. (2016). Autophagy inhibition enhances colorectal cancer apoptosis induced by dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. Oncol. Lett. *12*, 102–106.

Yang, Y., Hu, L., Zheng, H., Mao, C., Hu, W., Xiong, K., Wang, F., and Liu, C. (2013). Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. Acta Pharmacol. Sin. *34*, 625–635.

Yang, Y., Luo, H., Hui, K., Ci, Y., Shi, K., Chen, G., Shi, L., and Xu, C. (2015b). Selenite-induced autophagy antagonizes apoptosis in colorectal cancer cells in vitro and in vivo. Oncol. Rep.

Yang, Z.J., Chee, C.E., Huang, S., and Sinicrope, F.A. (2011b). The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. Mol. Cancer Ther. *10*, 1533–1541.

Yano, H., and Chao, M.V. (2000). Neurotrophin receptor structure and interactions. Pharm. Acta Helv. *74*, 253–260.

Yonekawa, T., and Thorburn, A. (2013). Autophagy and Cell Death. Essays Biochem. *55*, 105–117.

Yoshimori, T. (2004). Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *313*, 453–458.

Young, M., Ordonez, L., and Clarke, A.R. (2013). What are the best routes to effectively model human colorectal cancer? Mol. Oncol. *7*, 178–189.

Yu, L., Lenardo, M.J., and Baehrecke, E.H. (2004). Autophagy and caspases: a new cell death program. Cell Cycle Georget. Tex *3*, 1124–1126.

Yu, Y., Zhang, S., Wang, X., Yang, Z., and Ou, G. (2010). Overexpression of TrkB promotes the progression of colon cancer. APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. *118*, 188–195.

Zage, P.E., Graham, T.C., Zeng, L., Fang, W., Pien, C., Thress, K., Omer, C., Brown, J.L., and Zweidler-McKay, P.A. (2011). The selective Trk inhibitor AZ623 inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroblastoma cell proliferation and signaling and is synergistic with topotecan. Cancer *117*, 1321–1391.

Zhang, S., and Yu, D. (2010). PI(3)king apart PTEN's role in cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *16*, 4325–4330.

Zhang, P., Xing, Z., Li, X., Song, Y., Zhao, J., Xiao, Y., and Xing, Y. (2016). Tyrosine receptor kinase B silencing inhibits anoikis-resistance and improves anticancer efficiency of sorafenib in human renal cancer cells. Int. J. Oncol. *48*, 1417–1425.

Zhang, Y., Fujiwara, Y., Doki, Y., Takiguchi, S., Yasuda, T., Miyata, H., Yamazaki, M., Ngan, C.Y., Yamamoto, H., Ma, Q., et al. (2008). Overexpression of tyrosine kinase B protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma. Oncology *75*, 17–26.

Zhao, M., and Klionsky, D.J. (2011). AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 induces autophagy. Cell Metab. *13*, 119–120.

Zheng, H., Zhang, X., Wang, X., and Sun, B. (2012). Autophagy Enhances the Aggressiveness of Human Colorectal Cancer Cells and Their Ability to Adapt to Apoptotic Stimulus. Cancer Biol. Med. *9*, 105–110.

Le cancer colorectal (CCR) est le premier cancer digestif dans les pays occidentaux. Malgré les progrès thérapeutiques réalisés au cours des deux dernières décennies, la survie relative à 5 ans ne dépasse pas 56%, et s'abaisse à 11,3% pour les patients métastatiques. Le pronostic est lié au stade de développement de la maladie au moment du diagnostic. Les décès sont en rapport avec une résistance primaire de la masse tumorale aux thérapies, ou la survenue de récidive, en rapport avec une maladie microscopique résiduelle, non contrôlée par les thérapies systémiques adjuvantes. Le travail réalisé au sein de notre laboratoire portant sur deux voies de signalisation met en leurs rôles dans le CCR : les neurotrophines (NTs, facteurs de croissance impliqués dans la survie des cellules cancéreuses) et l'autophagie (processus de recyclage cellulaire impliqué dans la résistance au stress). Le but de cette étude a été d'analyser la part de ces deux voies dans la survie des cellules du cancer colo-rectal et l'impact de leur inhibition sur le devenir cellulaire et l'évolution tumorale.

L'étude a été menée sur deux lignées cellulaires provenant du même patient : SW480 (tumeur primaire) et SW620 (invasion ganglionnaire), aussi utilisées pour la réalisation de greffes sous cutanées sur le modèle murin Nude. De plus, la présence de principales protéines des NTs (TrkB) et de l'autophagie (LC3) a été analysée dans les tissus de patients.

Des travaux précédents menés sur des cultures de CCR ont montré que la surexpression de TrkB était associée à la survie cellulaire. Nous avons donc choisi d'inhiber la voie des NTs avec le K252a (100nM). Sur culture cellulaire de CCR, *in vitro,* l'inactivation de la voie PI3K / AKT, induit une activation de l'autophagie. A l'opposé, le blocage du flux autophagique par une approche pharmacologique (avec la chloroquine, CQ ; 25µM) ou par une approche transcriptomique (siRNA anti-ATG5) induit une suractivation de la signalisation des NTs, via le couple TrkB/BDNF. Ainsi, les deux voies de survie se compensent mutuellement et la double inhibition permet l'amélioration de l'effet des simples traitements. L'utilisation des deux inhibiteurs *in vivo* induit une réduction spectaculaire du volume tumoral (voire même la disparition dans certains cas). Finalement, la présence de la forme active du TrkB (phospho TrkB) et de la forme active de la LC3 (LC3II), démontrant l'activation de ces deux voies dans les tissus de patients, a été observée. L'ensemble de ces résultats montre que l'activation des voies des NTs et de l'autophagie contribue à la survie des cellules de CCR. L'approche qui consiste à la double inhibition des NTs et de l'autophagie pourrait être un point majeur pour le développement de nouvelles thérapies dans le CCR.