



HAL
open science

Plasticité des réseaux de récepteurs membranaires dans la signalisation du NGF et de son précurseur dans les cancers du sein

Romain Lévêque

► **To cite this version:**

Romain Lévêque. Plasticité des réseaux de récepteurs membranaires dans la signalisation du NGF et de son précurseur dans les cancers du sein. Biologie moléculaire. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS102 . tel-03685295

HAL Id: tel-03685295

<https://theses.hal.science/tel-03685295>

Submitted on 2 Jun 2022

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.

Université de Lille

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par

Romain LÉVÊQUE

**Plasticité des réseaux de récepteurs membranaires dans la
signalisation du NGF et de son précurseur dans les cancers
du sein**

Soutenue le 27 mai 2019 devant la commission d'examen :

Rapporteurs :

Pr. Danielle TROUDAUD

Pr. Antoine GALMICHE

Examineurs :

Pr. Réjane PAUMELLE-LESTRELIN
(Présidente du jury)

Pr. Véronique ORIAN-ROUSSEAU

Directeurs de thèse :

Pr. Robert-Alain TOILLON

Pr. Dominique CHEVALIER

Directrice du laboratoire :

Pr. Xuefen LE BOURHIS

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

*Je remercie tout d'abord Madame le Professeur **Xuefen Le Bourhis** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses conseils avisés et pour la disponibilité dont elle a fait preuve tout au long de l'accomplissement de ce travail. La période que j'ai passé dans votre laboratoire m'a appris énormément tant au niveau scientifique qu'à d'autres niveaux et je vous remercie sincèrement pour cela.*

*Je remercie mes directeurs de thèse, Messieurs les Professeurs **Robert-Alain Toillon** et **Dominique Chevalier** qui m'ont permis de travailler sur ce projet. En particulier, je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Robert-Alain Toillon** qui m'a trouvé une place dans son équipe dès mon année de Master 1. Votre disponibilité, votre engouement scientifique et votre optimisme inébranlable m'ont mené au bout de cette grande aventure humaine et professionnelle.*

*Je remercie également les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail : Madame le Professeur **Danielle Troutaud**, Monsieur le Professeur **Antoine Galmiche**, Madame le Professeur **Réjane Paumelle-Lestrelin** et Madame le Professeur **Véronique Orian-Rousseau** pour avoir accepté d'analyser ce travail. Merci pour les longues lignes ainsi que pour les longues distances parcourues pour rendre ce travail meilleur.*

*Mes remerciements vont ensuite à Madame le Docteur **Dimitra Gkika** et à Monsieur le Professeur **Christophe Biot** qui m'ont apporté leur soutien et leurs expériences scientifiques chaque année pour faire en sorte que ce travail aboutisse de la meilleure des façons. Vous avez su me prodiguer conseils et encouragements, et vos différentes questions au sujet de mon travail m'ont permis d'élargir mes horizons.*

*Je remercie Monsieur le Docteur **Jérôme De Ruyck** pour sa participation et son aide dans la modélisation informatique. Un grand merci à Madame le Professeur **Véronique Orian-Rousseau** pour m'avoir fait l'honneur de me laisser participer au travail d'un de ses articles. J'aurais beaucoup aimé que le projet de mobilité internationale aboutisse pour venir travailler dans votre laboratoire.*

Je remercie les différents membres du laboratoire INSERM U908 :

*Merci aux statutaires pour leurs conseils et réflexions pendant les réunions hebdomadaires ainsi que pour l'apport de leurs expertises respectives. Merci **Eric Adriaenssens** pour ta bonne humeur et tes blagues, certes parfois douteuses, mais qui m'ont toujours bien fait rire. Je tiens également à saluer ce don hors du commun à sentir les pots ! Merci **Chann Lagadec** pour ta bienveillance et ta disponibilité pour les formations aux outils informatiques. Merci également d'avoir continué le combat pour maintenir le bon fonctionnement du cytomètre. Merci à **Pierre-Olivier Angrand** et **Pamela Völkel** pour m'avoir prodigué l'aide et les conseils dont j'avais besoin pour les mutagénèses dirigées. Je n'oublie pas non plus votre participation aux pots, notamment le traditionnel vin chaud que vous nous apportiez ! Merci à **Valérie Chopin** pour ton organisation millimétrée qui est pour moi d'une importance capitale dans le bon*

REMERCIEMENTS

fonctionnement d'un laboratoire. **Samuel Meignan**, je n'ai pas eu l'occasion de travailler avec toi mais tes participations aux réunions m'ont laissé l'image d'une personne passionnée, investie et sympathique.

Un grand merci à **Nicole** avec qui j'ai passé beaucoup de temps pour le marquage des coupes de tumeur. Bien qu'étant un travail long et répétitif, je retiendrai surtout nos longues discussions sur l'actualité ou nos différentes destinations de vacance qui me laissent un super souvenir ! Merci à **Valérie Cendré** pour la gestion des commandes du laboratoire et pour m'avoir aidé à gérer toutes les subtilités administratives notamment pour le congrès à Cavtat qui ne fut pas une mince affaire ! Je me revois sourire derrière mon bureau dès que j'entendais ton rire si reconnaissable résonner dans le couloir. **Isabelle**, merci pour ton travail qui m'a permis de ne jamais être pris au dépourvu si j'avais besoin de cônes, tubes ou autres matériels communs. Merci pour ton naturel et ta spontanéité. **Nathalie**, tu es partie du laboratoire juste avant que je termine ma thèse, et j'espère que tu es épanouie et heureuse. Merci d'avoir été là pour m'aider au rangement, notamment pour vider les bidons de CMR, et pour nos discussions de couloir. Un grand merci à **Véro** pour tes bonjours toujours souriants. Ton entrée dans mon bureau signifiait une pause-café toujours bienvenue et un retour dans un bureau propre et frais !

J'adresse un merci tout particulier à l'ensemble des jeunes qui se sont succédés au sein du laboratoire et qui ont largement participé à égayer les journées parfois difficiles passées tout au long de ma thèse. Cette « fine équipe » des jeunes est d'une importance capitale pour maintenir la bonne humeur, apporter le soutien nécessaire dans les mauvais moments et surtout pour se déconnecter du travail de temps en temps. J'espère pour les futurs arrivants au laboratoire qu'ils auront la joie de faire partie d'une équipe aussi drôle, présente et soudée que celle dont j'ai eu la joie de faire partie. Tout d'abord, merci à **Léo** qui m'a tout appris. Merci pour ta patience à mon égard au moment où je faisais mes premiers pas dans le milieu ainsi que pour les habitudes de « maniaque » que tu m'as inculqué. **Jérémy**, merci d'avoir été présent pour me rappeler qu'il n'y a pas que le travail dans la vie. Heureusement que tu étais là pour me suivre dans mes moments de folie pendant mon Master 2 ! Je ne compte plus le nombre de discussions pseudo-philosophiques qu'on a pu avoir ensemble autour d'un verre.

Merci aux différents stagiaires et jeunes docteurs qui se sont succédés dans le bureau et qui ont marqué ma thèse : **Samia** qui m'a initié à la psychologie. **Fabien** qui m'a bien fait rire avec sa boule coco au drôle de goût. **Thibaut**, le fan de musique toujours souriant. **Thomas** et **Martin**, les deux médecins qui se sont succédés pendant deux ans pour m'accompagner dans les pauses café. J'ai adoré la dernière page de mon calendrier que vous aviez pris soin de customiser.

Je sors de notre équipe et je remercie **Justine** et **Barbara**, les deux « vieilles » du labo, ou du moins les anciennes. Vos conseils et votre soutien à mes débuts ont été inestimables. Merci **Justine**, tu me faisais relativiser mes problèmes et tu as toujours été partante pour un verre ou un pique-nique à la citadelle. Merci **Barbara**, je n'ai jamais rencontré quelqu'un d'aussi jovial

REMERCIEMENTS

*et dont le rire était si communicatif. Avec toi, n'importe quelle blague est un succès ! Dire que je t'entendais rire du troisième étage lorsque j'étais dehors, en bas du bâtiment ! Merci également à **Axel** et **Jérémy** qui nous ont accompagné et supporté quand on passait nos soirées à parler de biologie (ou pas). Merci **Jérémy** pour l'équipement de moto, on se retrouve dans quelques mois pour une balade sur les routes !*

*Un grand merci à **Nadège** avec qui j'ai passé de bons moments à discuter des « potins » du labo et de nos malheurs respectifs. Je t'ai très rarement vu de mauvaise humeur et, malgré une charge de boulot colossale, tu as toujours su écouter et rester positive. Ton efficacité et ton sens de l'organisation m'ont toujours impressionné et j'espère vraiment que tu t'épanouiras professionnellement car tu le mérites. Je n'oublie pas les soirées jeux qu'on a pu passer ainsi que les « traquenards » dans lesquels on a pu tomber (avec une pensée pour **Stève**). Merci à **Kévin** qui nous a accompagné et pour les GOT que tu m'as donné !*

*Merci à **Clément** et **Jordan** de l'équipe H19, un « duo de choc » qui me fait un peu penser au duo Yvain et Geauvin de Kaamelott ! Vous laisserez votre trace au laboratoire à travers toutes les affiches accrochées sur les frigos et qui m'ont bien fait rire ! **Clément**, je m'incline devant ta capacité à créer des vidéos hilarantes et je garderai le souvenir de cette soirée mémorable qui a fini sur une touche rosée (encore un traquenard, encore une pensée pour **Stève**).*

*Merci à **Ihsan** pour ton sourire perpétuel qui fait chaud au cœur. Ta gentillesse est ta plus grande qualité mais aussi un défaut, ne te laisse pas faire ! J'espère que tes projets aboutiront rapidement.*

*Merci à **Bernadette** qui est entrée en thèse en même temps que moi et qui m'a devancé pour la fin. Merci pour ces bonnes soirées passées en ta compagnie et pour la visite de la ferme pour la fin de ta thèse ! J'espère sincèrement que ta nouvelle vie te plaît et te souhaite que du bonheur dans cette nouvelle aventure.*

*Enfin, je termine par remercier les nouveaux arrivants avec qui j'ai malheureusement moins eu l'occasion de travailler ou déconner. **Sarah**, qui reprend le flambeau, tu es passée en thèse et tu as donc prouvé que tu pouvais faire le plus dur. Essaie d'être plus optimiste et surtout, essaie de plus te déconnecter du laboratoire ! **Julien**, la nouvelle génération. Bon courage pour la prochaine étape et pas la plus facile : le passage de ton Master 2. Merci à tous les autres : **Marie D.**, **Marie W.**, **Evodie**, **Ludivine**, **Camille**, **Julia**, **Aurélien**, **Quentin** et **Tony**. Et surtout, que la Force soit avec vous !*

*Merci également aux différents membres du laboratoire LBHE de Lens pour m'avoir accueilli ces derniers mois et sans qui j'aurai eu du mal à terminer cette thèse. Merci **Caroline** pour la confiance que tu as placée en moi.*

*Merci à mes amies et amis qui ont toujours su être là au moment où j'avais besoin de décompresser et m'amuser. Mention spéciale à **Quentin**, **Yoann** et **Flore** avec qui j'ai passé les soirées les plus folles et sans qui mon arrivée à l'Université de Lille aurait été plus difficile. Merci à l'équipe de Lille : **Margaux**, **Marie**, **Maxence**, **Leslie**, **Kévin** et **Swan**. Merci aux boulonnais :*

REMERCIEMENTS

Florent, Marie, Raphaël, Louison et Gautier qui, malgré l'éloignement, ont su être là quand il fallait. Merci à mes anciens Faidherbards qui sont restés présents : **Gaëlle, Benjamin, Thibaut** et **Paul**.

Je remercie ma famille et notamment **mes parents** qui ont toujours su écouter quand il le fallait et ma petite sœur **Manon**, l'artiste de la famille ! Ne t'inquiète pas, tu auras d'autres occasions pour prendre ta revanche au bowling. Un grand merci à mon frère **Nicolas**, le voyageur, et à **Clémence** avec qui j'ai également passé les soirées les plus folles. Un merci tout particulier à **ma famille d'adoption portugaise** qui m'a accueilli à bras ouverts et dont les moments passés ensemble ont toujours été un énorme plaisir. Parmi eux, je remercie sincèrement **Nathalie, Fernando** et **Rémy** dont le soutien, la joie de vivre et les invitations à manger ont été d'un énorme réconfort pendant cette période de ma vie. **Nathalie** et **Fernando**, encore merci pour m'avoir fourni ma dose de bières. **Rémy**, merci de m'avoir fait sortir du vieux continent européen.

Je terminerai par la personne la plus importante à mes yeux. Je te remercie toi, **Harmony**, ma meilleure amie, ma femme. C'est simple, si tu n'avais pas été présente dans ma vie depuis plus de 5 ans, je n'aurais sûrement pas été au bout de cette aventure. Tu as été là dans les différentes périodes, jouant tous les rôles. Tu as été l'épaule sur laquelle me reposer quand je n'étais pas en forme, le sourire dont j'avais besoin pour repartir du bon pied, le rire et la folie qui me permettaient de m'évader et tes encouragements m'ont permis de croire en moi jusqu'à la fin. Pour tous ces moments merveilleux passés avec toi et tous ceux à venir, je ne te remercierai jamais assez. Pour tout cela, je tiens à te dédier cette thèse. « Le bonheur n'est possible que partagé » (Into the wild).

« Fais le ou ne le fais pas, il n'y a pas d'essais »

Maitre Yoda, Star Wars Episode V.

RÉSUMÉ

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont impliqués dans de nombreux processus qui régulent la croissance cellulaire. Ils sont d'ailleurs considérés comme des oncogènes dans de nombreux cancers. Le laboratoire INSERM U908 a mis en évidence le rôle déterminant du NGF (*Nerve Growth Factor*) et de son précurseur le proNGF dans l'agressivité du cancer du sein et dans le processus métastatique. De précédentes études ont montré que l'inhibition de l'activité kinasique de TrkA par des inhibiteurs tels que le K252a ou le loxo-101 aboutissait à une diminution de la taille des tumeurs *in vitro* mais aussi dans des modèles pré-cliniques de xénogreffes en souris SCID. Néanmoins, ces inhibiteurs ont donné lieu à des essais cliniques décevants. Dans ce contexte, nous avons démontré que la résistance intrinsèque à ces inhibiteurs est en partie due à l'activation de voies de signalisation alternatives qui résultent de la formation de complexes de récepteurs membranaires. Nous avons ainsi montré que le pro-NGF induit une interaction sortiline/TrkA/EphA2 et l'activation de la voie sous-jacente Src. De plus, le laboratoire INSERM U908 a mis en évidence que le NGF induit une interaction TrkA/CD44 et que l'activation de la voie sous-jacente est dépendante de p115RhoGEF/RhoA/ROCK1 (Aubert *et al.*, 2015). Ces deux signalisations sont indépendantes de la phosphorylation de TrkA, ce qui explique la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase. Dans la continuité de ce travail, j'ai plus précisément identifié qu'un variant de CD44 est impliqué dans la réponse au NGF et dans le complexe membranaire formé. Ces résultats soulignent également l'importance de ce variant dans la signalisation pro-tumorale du NGF grâce à des tests de migration et de clonogénicité. Nous avons également observé une corrélation entre le profil PR- et la présence du complexe TrkA/CD44v. De plus, par des délétions de domaines dans la séquence de ce variant de CD44, nous avons pu identifier deux sous-domaines d'environ 10 résidus d'acides aminés nécessaires à l'interaction avec TrkA. Mes travaux de thèse ont ainsi permis de déterminer l'importance des complexes de récepteurs membranaires dans la plasticité des cellules cancéreuses et suggèrent que ces nouveaux complexes impliquant TrkA pourraient être des outils pronostics et thérapeutiques prometteurs.

Mots clés : Cancer du sein, résistance aux traitements, TrkA, complexes de récepteurs, CD44, EphA2.

ABSTRACT

Tyrosine Kinase Receptors are involved in various cellular processes regulating cell growth and they are oncogenes for numerous cancers. INSERM U908 lab highlighted the emerging role of NGF (Nerve Growth Factor) and its precursor proNGF in breast cancer aggressiveness and metastasis. Previous works demonstrated that inhibition of TrkA kinase activity by using K252a or loxo-101 (Tyrosine kinases inhibitors) contributes to a significant decrease of the tumors size *in vitro* or in pre-clinical model (SCID mice tumor xenograft model). Nevertheless, these inhibitors resulted in disappointing clinical trials. In this context, we demonstrated that the intrinsic resistance to TrkA tyrosine kinase inhibitors is in part due to the activation of alternative pathways through the formation of membrane receptor complexes. More precisely, we first showed that proNGF induces sortilin/TrkA/EphA2 interaction and subsequent Src signaling pathway. The U908 unit has also showed that NGF induces TrkA/CD44 interaction and subsequent p115RhoGEF/RhoA/ROCK1 signaling pathways (Aubert *et al.*, 2015). Both signalizations are independent of TrkA phosphorylation explaining resistance to tyrosine kinase inhibitors. During my PhD work, I highlighted that only one CD44 variant is recruited at the membrane after NGF treatment and that only this variant could interact with TrkA. Moreover, I pointed out the importance of this variant in NGF oncogenic signaling through migration and clonogenic assays. We also observed that TrkA/CD44v complex is correlated with PR- breast cancer status. Through domain deletions in the variant sequence, we identified two major domains of about 10 amino acids for the set-up of the interaction and synthesized two mimetic peptides targeting these sequences. Our findings highlight the importance of membrane receptor complex in the cancer cell plasticity and suggest that these complexes could be promising prognostic and therapeutic opportunities.

Keywords: Breast cancer, treatments resistance, TrkA, receptors complexes, CD44, EphA2.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	20
I. Modèle d'étude : les cancers du sein	21
A. La glande mammaire	21
1. Développement.....	21
a. Phase prénatale.....	21
b. Phase pubertaire	24
c. Phase adulte.....	25
2. Anatomie	26
B. Le cancer du sein	29
1. Epidémiologie.....	29
2. Etiologie et facteurs de risque	32
a. Statut hormonal et condition des seins.....	32
b. Mode de vie et facteurs environnementaux.....	33
c. Histoire familiale et facteurs génétiques.....	35
3. Origine cellulaire du cancer du sein	36
a. Altérations génétiques.....	38
b. Altérations épigénétiques.....	45
c. Microenvironnement tumoral	51
4. Le cancer du sein : un terme, plusieurs entités	58
a. Théories à l'origine de l'hétérogénéité cellulaire du cancer du sein	58
b. Plusieurs stades de développement	60
c. Plusieurs classifications	62
5. Diagnostic et traitements du cancer du sein	70
a. Détection et diagnostic.....	70
b. Traitements des cancers du sein.....	71
II. Le (pro)NGF dans le cancer du sein	82
A. Le NGF et son précurseur.....	82
1. Synthèse et maturation du (pro)NGF.....	82
2. Structures protéiques du (pro)NGF.....	83
3. Expression et rôles physiologiques du (pro)NGF	85
B. Les récepteurs du (pro)NGF	87
1. Le récepteur du NGF : TrkA	87
a. Découverte.....	87

b.	Structure	87
c.	Les isoformes de TrkA	90
d.	Signalisations physiologiques de TrkA	91
e.	Régulation de l'activité de TrkA	94
2.	Le récepteur du proNGF : la sortiline	97
a.	Découverte	97
b.	Du gène à la protéine	97
c.	Signalisations physiologiques de la sortiline	99
3.	Le récepteur p75 ^{NTR}	102
a.	Découverte	102
b.	Du gène à la protéine	103
c.	Signalisation physiologique de p75 ^{NTR}	106
	107	
C.	Implications du (pro)NGF dans le cancer du sein	110
1.	Le NGF et son précurseur dans le cancer du sein	110
2.	Le NGF et son précurseur comme cibles thérapeutiques dans les cancers.....	114
III.	Plasticité des réseaux de récepteurs membranaires dans la signalisation	
	protumorale du (pro)NGF.....	118
A.	Interactions entre les récepteurs du (pro)NGF	118
1.	Interaction TrkA/p75 ^{NTR}	118
2.	Interaction p75 ^{NTR} /sortiline.....	120
3.	Interaction TrkA/sortiline	121
D.	L'importance des co-récepteurs : exemple de CD44	122
1.	Interactome de TrkA : la partie immergée de l'iceberg	122
2.	CD44, un partenaire des RTKs	124
a.	Généralités sur CD44	124
b.	CD44 : co-récepteur des RTKs	128
c.	CD44 comme cible thérapeutique dans les cancers	129
	PRÉSENTATION DE LA THÈSE	131
	Contexte scientifique.....	132
	Objectifs de la thèse	133
	Valorisation des résultats	134
	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	135
I.	Modèles expérimentaux	136

A.	Modèles <i>in vitro</i>	136
B.	Modèles <i>in vivo</i>	137
II.	Culture cellulaire.....	137
A.	Entretien des lignées.....	137
B.	Traitements des cellules aux facteurs de croissance	138
C.	Traitements des cellules aux inhibiteurs.....	138
III.	Transfections	138
A.	Transfections de plasmides.....	138
B.	Transfection de siARNs.....	139
C.	Obtention des plasmides	140
IV.	Analyse de l'expression des transcrits.....	143
A.	Extraction et purification de l'ADN	143
B.	Rétro-transcription.....	143
C.	Polymerase-Chain Reaction (PCR).....	143
D.	Séquençage des bandes PCR.....	144
E.	PCR quantitative.....	144
V.	Analyse de l'expression des protéines	145
A.	Extraction et dosage protéique.....	145
B.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide et Western Blot	146
C.	Extraction des protéines en gel de polyacrylamide en vue d'une analyse par spectrométrie de masse.....	147
D.	Analyse de protéines par spectrométrie de masse	148
E.	Analyse des niveaux de CD44v3 et CD44v6 par cytométrie en flux	148
F.	Immunocytochimie	148
G.	Immunohistochimie	149
VI.	Mise en évidence des interactions protéiques.....	150
A.	Immunoprécipitation	150
B.	Proximity Ligation Assay (PLA)	150
C.	Quantification du signal PLA	152
D.	Prévision des interactions par modélisation moléculaire.....	153
VII.	Tests fonctionnels.....	154
A.	Test de clonogénicité	154
B.	Test de migration cellulaire.....	154
C.	Test d'invasion en Transwell	155
VIII.	Expériences <i>in vivo</i>	155

A.	Xénogreffes en souris SCID	155
B.	Dissémination métastatique en souris <i>SCID</i>	156
RÉSULTATS		157
I.	Plasticité des réseaux de récepteurs membranaires dans la signalisation pro-tumorale du NGF dans les cancers du sein	158
A.	Interaction TrkA/CD44 : état des lieux des récepteurs en présence..	158
1.	Profils des isoformes de CD44 des lignées cancéreuses mammaires.....	158
2.	Niveaux d'expression des récepteurs TrkA et CD44 dans les cellules cancéreuses mammaires.....	162
B.	Détermination du variant de CD44 impliqué dans l'interaction TrkA/CD44.....	168
1.	Analyse dans le modèle cellulaire COS-7	168
2.	Analyse dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231.....	171
3.	Analyse de l'interaction TrkA/CD44v3 dans les cellules cancéreuses mammaires par PLA.....	174
C.	Implications fonctionnelles du complexe TrkA/CD44v3 dans la signalisation pro-tumorale du NGF.....	177
1.	Clonogénicité.....	177
2.	Migration.....	179
3.	Invasion cellulaire.....	181
4.	Implication du complexe TrkA/CD44v3 <i>in vivo</i>	181
D.	Ciblage de l'interaction TrkA/CD44.....	185
1.	Détermination des zones de CD44v3 impliquées dans l'interaction.....	185
2.	Effets des peptides sur la signalisation pro-tumorale du NGF dans les cellules cancéreuses mammaires.....	187
II.	Plasticité des réseaux de récepteurs membranaires sous stimulation au proNGF dans le cancer du sein : l'interaction Sortiline/TrkA/EphA2	191
A.	Mise en évidence d'un nouveau partenaire de l'interaction sortiline/TrkA : EphA2	191
1.	Détermination des protéines en interaction avec TrkA sous stimulation au proNGF par spectrométrie de masse	191
2.	Analyse de la mise en place de l'interaction sortiline/TrkA/EphA2 dans les cellules MDA-MB-231_HA-TrkA	192
3.	Analyse de l'interaction sortiline/TrkA/EphA2 dans les différents sous-types moléculaires de cancer du sein	196

a.	<i>Niveaux d'expression de la sortiline, d'EphA2 et d'Ephrin-A1</i>	196
b.	<i>Mise en évidence de l'interaction TrkA/EphA2 dans les différents sous-types moléculaires de cancer du sein</i>	199
B.	Implications fonctionelles du complexe sortiline/TrkA/EphA2 dans la signalisation protumorale du proNGF	199
1.	Importance du récepteur EphA2 dans la signalisation pro-tumorale du proNGF dans les cellules cancéreuses mammaires.....	199
2.	Mise en évidence de l'importance du complexe <i>in vivo</i> et ciblage thérapeutique du complexe	201
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	205
I.	De nouveaux partenaires membranaires dans la signalisation protumorale du (pro)NGF impliquent une plasticité des réseaux de récepteurs membranaires	208
II.	De nouveaux partenaires membranaires dans la signalisation protumorale du (pro)NGF impliquent une plasticité des voies de signalisation induites	214
III.	Ciblage thérapeutique des complexes membranaires : vers un meilleur ciblage ?	218
	ANNEXES	223
	BIBLIOGRAPHIE	250

LISTE DES ABRÉVIATIONS

0-1

5-FU : 5-FluoroUracile
18-FDG : 18-FluoroDésoxyGlucose
27-HC : 27-HydroxyCholestérol

A

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase Domain
ADN : Acide DésoxyriboNucléotidique
Ai : Aromatase inhibitor
AJCC : American Joint Committee on Cancer
Akt : Ak strain thymona
Ang-1 : Angiopoietin-1
ANG1 : Angiopoietin 1
ANOVA : ANalysis Of Variance
AP2 : Activating Protein 2
APC : AlloPhycoCyanin
AR : Androgen Receptor
ARMS : Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning
ARN : Acide RiboNucléotidique
ASOS : Anti-Sens Oligonucleotides
ATCC : American Type Culture Collection
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
α-SMA : α-Spinal Muscular Atrophy

B

BAD : Bcl2 Agonist of cell Death
BAX : Bcl-2-Associated X
BCA : BiCinchonic Acid
BCAR4 : Breast Cancer Anti-Estrogen Resistance 4
BCL2 : B-Cell Lymphoma 2
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor
BEX2 : Brain Expressed X-linked 2
BH3 : Bcl2 Homology 3
BIM : Bcl-2-like protein 11
BMP4 : Bone Morphogenic Protein 4
BRCA 1/2 : BRCA1 Interacting Protein C-terminal
BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer
BRIP1 : BRCA1 Interacting Protein C-terminal helicase 1

C

C3G : CRK SH3-binding Guanine nucleotide-releasing protein
CA : Cancer Antigen
CAF : Cancer Associated Fibroblast
CAM : Cell Adhesion Molecule
CAMK : Ca²⁺/CALMODULIN-regulated protein Kinase
CASP : CASPase
CAT : Computer Assisted Tomography
Cbl-b : Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene b
CCI : Carcinome Canalaire Invasif
CCIL : Carcinome Lobulaire *in situ*
CCIS : Carcinome Canalaire *in situ*
CCL : C-C Motif Chemokine Ligand
CCM2 : Cerebral Cavernous Malformation 2
CCND2 : Cyclin D2
CD : Cluster of Differentiation
CDH1 : CaDHerin 1
Cdk : Cyclin-dependent kinase
CEA : CarcinoEmbrionic Antigen
CGH : Comparative Genomic Hybridization
CHEK2 : CHEckpoint Kinase 2
CK : CytoKératine
CNA : Copy Number Alteration
COM : Concertation Oncologique Multidisciplinaire
COS-7 : CV-1 in Origin, SV40 (-7)
CPAC : Cell Plasticity And Cancer
CpG : Cytosine phosphate Guanine
CRD : Cysteine Rich Domain
CREB : Cyclic Adenosine 3,5-Monophosphate Response Element-Binding Protein
CRK : CT-10 Regulator of Kinase
CSC : Cancer Stem Cell
Ct : Cycle threshold
CTF : C-Terminal Fragment
CTRL : ConTRôle
CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand

D

DAG : DiAcylGlycerol
DD : Death Domain
DDE : DichloroDiphényldichloroÉthylène
dNTP : diDésoxyriboNucléotide Triphosphate
DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNMT : DNA Methyl Transferase

E

ECD : ExtraCellular Domain
ECM : Extracellular Matrix
EDTA : Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
EGF : Epidermal Growth Factor
eGFP : enhanced Green Fluorescent Protein
EMEM : Eagle's Minimum Essential Medium
EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition
EphA2 : Ephrin type A receptor 2
EPR1 : Effector Cell Protease Receptor 1
ER : Estrogen Receptor
ERBB2/HER2 : ERYthroBlastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2 / Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
ERK : Extracellular Signal-Regulated Kinase
ERM : Ezrin-Radixin-Moesin

F

FAK : Focal Adhesion Kinase
FAP : Fibroblast Activation Protein
FDA : Food and Drug Administration
FDG : FluoroDésoxyGlucose
FEN1 : Flap Structure-Specific Endonuclease 1
FGF : Fibroblast Growth Factor
FISH : Fluorescence in situ Hybridization
FLT3 : Fms-Like Tyrosine kinase 3
FOX : Forkhead Box
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
FRS2 : Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2

G

GAB1 : GRB2 Associated Binding protein 1
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
GGA : Golgi-localizing Gamma-adaptin ear factor homology domain, ADP-ribosylation factor-binding protein
GH : Growth Hormone
Glut4 : Glucose transporter type 4
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GO : Gene Ontology
GPCR : G-Protein Coupled Receptor
GRB2 : Growth factor Receptor Bound protein 2
GST : Gène Supresseur de Tumeur

GV : Glembatumumab Vedotin

H

HAT : Histone Acetyl Transferase
HB : Heparin Binding
HCL : Hospices Civils de Lyon
HDAC : Histone DeAcetylase
HDMT : Histone DeMeThylase
HEPES : Acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Piperazine Ethane Sulfonic
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HGF/SF : Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor
HMOF : Histone Acetylase Ortholog Of Drosophila Males Absent On The First
HMT : Histone Methyl Transferase
HNSCC : Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HOTAIR : HOX Transcript Antisense RNA
HOX : Homeobox
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography
HRP : Horse Radish Peroxydase
HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycan

I

IC50 : Inhibitory Concentration 50
ICD : IntraCellular Domain
Ig : Immunoglobulin
IGF : Insulin Growth Factor
IHC : ImmunoHisto Chemistry
IL : InterLeukin
IMC : Indice de Masse Corporelle
INCa : Institut National contre le Cancer
Indel : Insertion/deletion
INSERM : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
INSRR : Insulin Receptor Related Receptor
IntClusts : Integrative Clusters
InVs : Institut de Veille Sanitaire
IP : Inositol Phosphate ou ImmunoPrécipitation
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IRS1 : Insulin Receptor Substrate 1
IκB : Inhibitor of kappa B

J

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

K

kb : kilobases

k_d : Constante de dissociation

L

LAR : Luminal Apocrine Receptor

LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor

LHRH : Luteinizing Hormone Releasing Hormone

LIMK : LIM domain Kinase

lncRNA : long non coding RNA

LNGFR : Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor

LOH : Loss Of Heterozygosity

LRD : Leucine Rich Domain

LSD : Lysine-Specific Histone Demethylase

M

MAG : Myelin-Associated Glycoprotein

MALAT1 : Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MAX : MYC Associated Factor X

MBGI : CNS-derived Myelin-Based Growth Inhibitor

MCF-7 : Michigan Cancer Foundation-7

MDA-MB-231 : Monroe Dunaway Anderson-Metastasis Breast cancer cell line-231

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MEF2D : MADS box transcription Enhancer Factor 2 polypeptide D

Met : Met proto-oncogene (HGFR)

MET : Mesenchymal-Epithelial Transition

miRNA : micro RNA

MLL3 : Mixed-Lineage Leukemia protein 3

MMAE : MonoMethyl Auristatin E

MMP : Matrix Metallo Protease

mmu : milli mass unit

MOG : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein

MQ : Milli-Q

mRNA : messenger RNA

mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin kinase

MW : Molecular Weight

N

NA : Non Acquis

NADE : Neurotrophin Associated cell Death Executor

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NCT : National Clinical Trial

ND : Non Déterminé

NEDD4-2 : Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 4-2

NF-κB : Nuclear Factor- κB

NGF : Nerve Growth Factor

NGS : Next Generation Sequencing

NK : Natural Killer

NMB : Non Metastatic B

NRAGE : Neurotrophin Receptor Interacting MAGE homologue

NRH2 : Neurotrophin Receptor Homolog 2

NRIF : Neurotrophin Receptor Interacting Factor

ns : non significatif

NT : Neurotrophin

NTRK1 : NeuroTrophic Receptor tyrosine Kinase 1

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PACAP : Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide

PALB2 : Partner And Localizer of BRCA2

PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymerase

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PD-1 : Programmed cell Death-1

PDB : Protein Data Bank

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDZ : Postsynaptic Disc-large Zona

PET : Positron Emission Tomography ou PolyETHylene

PgR : Progesterone Receptor

PH : Pleckstrin Homology

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

PIP2/3 : Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate / Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PKC : Protein Kinase C

PLA : Proximity Ligation Assay

PLC : PhosphoLipase C

PMSF : PhenylMethaneSulfonyl Fluoride

POSTN : Periostine

PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2

PTB : PhosphoTyrosine Binding domain
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PTPN12 : Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 12
PUM1 : PUMilio RNA binding family member 1
PVDF : PolyVinylidene DiFluoride

Q

qPCR : quantitative PCR

R

RAC : RAs-related C3-botulinum toxin
RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RANK : Receptor Activator Of Nuclear Factor Kappa B
RAP : RAs related Protein
RAS : RAt Sarcoma
RB : RetinoBlastoma
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
RE(G) : Réticulum Endoplasmique (Granuleux)
RhoA : Ras homolog gene family, member A
RIP : Regulated Intramembrane Proteolysis
RISC : RNA-induced silencing complex
ROCK1 : Rho-associated protein Kinase 1
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
RPTP : Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase
rRNA : ribosomal RNA
Rsk : Ribosomal protein s6
RT : Reverse Transcription
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

S

SAM : S-Adenosyl Methionine
SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency
SCUBE2 : Signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 2
SD : Standard Deviation
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SEM : Standard Error of the Mean
SERD : Selective Estrogen Receptor Degradier
SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator
SGN : Système de Gradation Nottingham
SGP-2 : Sulfated GlycoProtein-2
SH2 : Src homology-2
SH2D2A : SH2 Domain Containing 2A
SHBG : Sex Hormone Binding Globulin
SHEP1 : SH2 domain-containing Eph receptor-binding Protein 1

SHP2 : Src-Homology 2 containing tyrosine Phosphatase 2
siRNA : small interfering RNA
SMases : SphyngoMyélasses
snRNA : small nuclear RNA
SorCS : Sortilin-related VPS10 domain Containing Receptor
SorLA : Sorting protein-related receptor containing LDLR class A repeats
SOS : Son Of Sevenless
SRC : proto-oncogene SRC (Rous Sarcoma)
STK11 : Serine/Threonine Kinase 11
SV : Sarcoma Virus
SVF : Sérum de Veau Foetal

T

TA : Température Ambiante
TAM : Tumor Associated Macrophage
TBST-T : Tris-Buffered Saline-Tween
TBX3 : T-Box Transcription factor 3
TCGA : The Cancer Genome Atlas network
TE : Tris/HCl, EDTA
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TGF : Transforming Growth Factor
THS : Traitement Hormonal de Substitution
TMA : Tissue MicroArray
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNM : Tumor-Node-Metastasis
TNRC9 : TriNucleotide Repeat-Containing gene 9 protein
TP53 : Tumor Protein 53
TRAF : TNF Receptor Associated Factor
Trk : Tropomyosin receptor kinase
tRNA : transfert RNA

U

UGSF : Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle
UICC : Union Internationale Contre le Cancer
UTDL : Unité Terminale Ducto-Lobulaire
UV : UltraViolet

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
Vps10 : Vacuolar protein sorting 10

W

Wnt : Wingless-related Integration Site

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Développement de la glande mammaire	22
Figure 2 : Anatomie et structure de la glande mammaire	27
Figure 3: Histologie de la glande mammaire.....	28
Figure 4 : Tendances chronologiques des taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein en France	30
Figure 5 : Taux d'incidence et de mortalité par âge pour le cancer du sein en France en 2012	31
Figure 6 : Les facteurs de risque du cancer du sein	35
Figure 7 : Les huit « Hallmarks » du cancer.....	37
Figure 8 : Les origines du cancer	38
Figure 9 : Les altérations génétiques dans le cancer du sein	40
Figure 10 : Les altérations épigénétiques dans le cancer du sein	50
Figure 11 : Le microenvironnement tumoral du cancer du sein	52
Figure 12 : Les différentes théories à l'origine de l'hétérogénéité tumorale du cancer du sein.....	60
Figure 13 : Les stades de développement d'un cancer du sein	62
Figure 14 : Différents types histologiques de cancers du sein invasifs	63
Figure 15 : Les principales thérapies ciblées envisagées pour le traitement du cancer du sein	81
Figure 16 : Représentation schématique du préproNGF	83
Figure 17 : Structures protéiques du NGF et du proNGF	84
Figure 18 : Représentation schématique du récepteur TrkA	88
Figure 19 : Principales voies de signalisation associées à TrkA.....	96
Figure 20 : Représentation schématique de la sortiline	99
Figure 21 : Principales voies de signalisation associées à la sortiline	102
Figure 22 : Représentation schématique du récepteur p75 ^{NTR}	104
Figure 23 : Représentation schématique des principales voies de signalisation induites par p75 ^{NTR}	107
Figure 24 : Les rôles clés du NGF et de son précurseur dans le cancer du sein	114
Figure 25 : Le ciblage de l'axe (pro)NGF dans le cancer du sein	117
Figure 26 : La balance des signalisations du (pro)NGF.....	122
Figure 27 : Une nouvelle interaction entre CD44 et TrkA découverte dans le cancer du sein	124
Figure 28 : Représentation schématique de CD44.....	126
Figure 29 : Les isoformes de CD44	127
Figure 30 : Carte des vecteurs utilisés pour la création des plasmides dans cette étude	142
Figure 31 : Etapes du Proximity Ligation Assay	151
Figure 32 : Quantification du signal PLA en cellules.....	152
Figure 33 : Quantification du signal PLA sur coupes tumorales.....	153
Figure 34 : Profils des isoformes de CD44 par PCR dans différentes lignées cancéreuses mammaires	159
Figure 35 : Séquençage des produits PCR CD44 dans la lignée MDA-MB-231.....	161
Figure 36 : Expression des transcrits (ARNm) des gènes CD44, CD44v3, CD44v6 et NTRK1 dans différentes lignées cancéreuses mammaires.....	163
Figure 37 : Expression des protéines CD44, CD44v3, CD44v6 et TrkA dans différentes lignées cancéreuses mammaires par western blot.....	164
Figure 38 : Expression des protéines CD44, CD44v3, CD44v6 et TrkA dans différentes lignées cancéreuses mammaires par Immunocytochimie	167
Figure 39 : Établissement de lignées COS-7 transfectées avec différents plasmides par électroporation	169
Figure 40 : Le variant 3 de CD44 est nécessaire et suffisant pour la mise en place de l'interaction TrkA/CD44 sous stimulation au NGF dans les cellules COS-7	170
Figure 41 : La stimulation au NGF (16 nM) dans les cellules MDA-MB-231 permet un recrutement de CD44v3 à la membrane et augmente l'interaction entre TrkA et CD44v3	173

Figure 42 : Mise en évidence de l'interaction TrkA/CD44v3 dans différentes lignées cancéreuses mammaires par PLA	175
Figure 43 : Analyse de l'interaction TrkA/CD44v6 par PLA dans différentes lignées cancéreuses mammaires.....	176
Figure 44 : Efficacité des si-ARNs ciblant CD44v3 déterminée par qPCR et tests de clonogénicité ...	178
Figure 45 : Evaluation de l'implication de CD44v3 dans la croissance des lignées cancéreuses mammaires par tests de clonogénicité	179
Figure 46 : CD44v3 est impliqué dans la migration et l'invasion cellulaire induite par le NGF dans la lignée MDA-MB-231	180
Figure 47 : Corrélation entre le marquage PLA TrkA/CD44v3 et la survie globale de patientes atteintes d'un cancer du sein	183
Figure 48 : Détermination des zones de CD44v3 impliquées dans l'interaction avec TrkA sous stimulation au NGF.....	186
Figure 49 : Effets des peptides 1 et/ou 4 sur la mise en place de l'interaction TrkA/CD44 dans les cellules MDA-MB-231 visualisés par PLA	188
Figure 50 : Les peptides mimétiques 1 et 4 bloquent la croissance tumorale induite par le NGF dans les cellules MDA-MB-231.....	189
Figure 51 : Modélisation informatique de l'interaction entre le domaine extracellulaire de TrkA et la séquence protéique du variant 3 de CD44.....	190
Figure 52 : Identification des protéines en interaction avec le récepteur TrkA sous stimulation au proNGF (0,5 nM) par spectrométrie de masse dans les cellules MDA-MB-231_HA-TrkA.....	192
Figure 53 : La stimulation au proNGF conduit à la mise en place d'une interaction ternaire entre la sortiline, TrkA et EphA2 dans la lignée MDA-MB-231_HA-TrkA	194
Figure 54 : Le complexe sortiline/TrkA/EphA2 induit par le proNGF met en place une voie de signalisation indépendante de la phosphorylation de TrkA.....	195
Figure 55 : Analyse des niveaux d'expression de la sortiline (NTR3), d'EphA2 et d'Ephrin-A1	197
Figure 56 : Mise en évidence de l'interaction TrkA/EphA2 dans différentes lignées cancéreuses mammaires par PLA	198
Figure 57 : Evaluation de l'implication d'EphA2 dans la croissance des lignées cancéreuses mammaires par tests de clonogénicité	200
Figure 58 : La présence du complexe TrkA/EphA2 est associé avec une diminution de la survie globale (OS) chez les patientes atteintes d'un cancer du sein.....	202
Figure 59 : Un traitement combiné ciblant à la fois TrkA et EphA2 diminue la croissance tumorale et la formation de métastases	204
Figure 60 : Schéma récapitulatif des voies de résistance aux TKIs mises en évidence dans ces travaux pour les voies de signalisation du NGF (à gauche) et du pro-NGF (à droite) dans les cancers du sein.	222

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Méthodes semi-quantitatives d'évaluation du grade histologique du cancer du sein (Méthode de Scarff, Bloom et Richardson).....	64
Tableau 2 : Détermination du grade histologique par la méthode de Scarff, Bloom et Richardson	65
Tableau 3 : Stades cliniques du cancer du sein basés sur la classification TNM.....	66
Tableau 4 : Les sous-types moléculaires du cancer du sein.	69
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des séquences de siARNs utilisées dans cette étude	140
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées pour la création des plasmides	142
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des amorces PCR utilisées pour la détermination des isoformes de CD44	144
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées en qPCR	145
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés en Western Blot ou Immunoprécipitation	147
Tableau 10 : Récapitulatif des anticorps et conditions utilisés en Immunocytochimie et PLA.....	149
Tableau 11 : Caractéristiques clinico-pathologiques de la cohorte de patientes utilisée dans l'étude TrkA/CD44v3	184

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Modèle d'étude : les cancers du sein

A. La glande mammaire

La glande mammaire est une glande exocrine caractéristique des mammifères femelles assurant la production et la sécrétion du lait. Cette glande est également présente chez les mammifères mâles sous une forme rudimentaire et généralement non fonctionnelle. La glande mammaire femelle est un organe complexe dont les aspects morphologiques et fonctionnels varient tout au long de la vie sous l'influence du système endocrinien.

1. Développement

La glande mammaire est un organe glandulaire unique de par le fait qu'il atteint son développement complet bien après la naissance. Ce développement est défini par des périodes distinctes : la phase prénatale, la croissance pubertaire, la grossesse, la lactation et l'involution (Figure 1). Ces périodes sont strictement régulées par des interactions épithélio-mésenchymateuses, des hormones et des facteurs de croissance. La plupart des informations relatives au développement de la glande mammaire résultent de l'utilisation de modèles murins étendues par analogie à l'Homme.

a. Phase prénatale

Durant la quatrième semaine de croissance de l'embryon, il y a apparition d'une crête mammaire qui correspond à un épaississement bilatéral et linéaire de l'ectoderme depuis l'aisselle jusqu'à l'aine (Figure 1). Cette apparition est dictée par des signaux critiques régulant notamment les acteurs de la voie de signalisation Wnt envoyés par le mésenchyme mammaire sous-jacent à la crête mammaire, qui vont donner lieu à l'épithélium précoce (Robinson *et al.*, 1999). En retour, l'épithélium influence la maturation mésenchymateuse en permettant sa condensation en couches de cellules riches en fibroblastes qui englobera la couche épithéliale (Sakakura *et al.*, 1982). Durant la sixième semaine de croissance embryonnaire, la crête mammaire disparaît et deux bourgeons primaires persistent pour former les aréoles (Figure 1).

INTRODUCTION

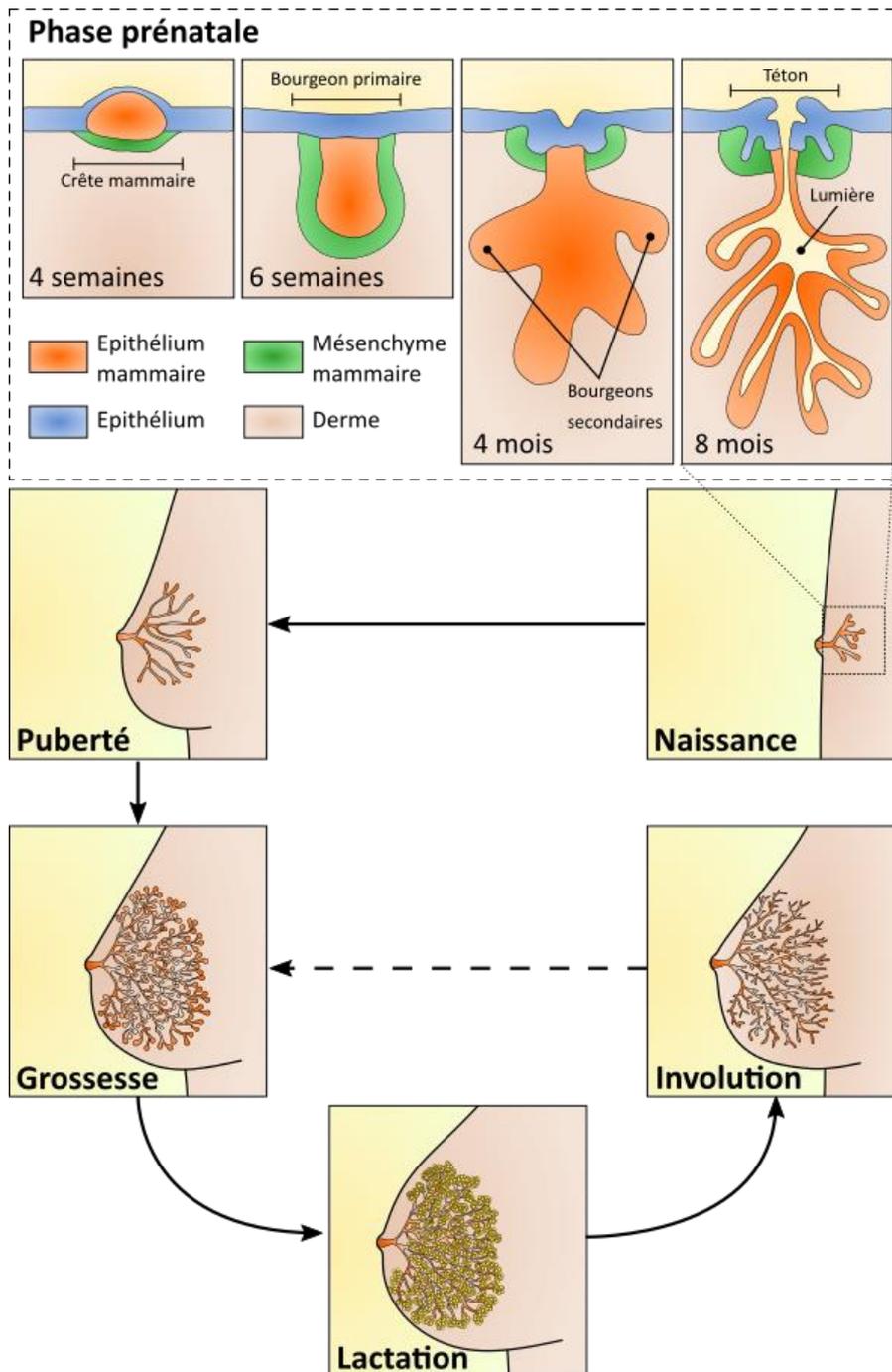


Figure 1 : Développement de la glande mammaire

Durant la phase prénatale, les placodes vont se différencier pour former les ébauches des canaux galactophores. Ces canaux sont formés d'une couche interne de cellules épithéliales traversée par une lumière et d'une couche externe de cellules mésenchymateuses. La glande mammaire restera dans un état rudimentaire quiescent de la naissance jusqu'à la puberté. Les niveaux élevés d'hormones ovariennes associés aux cycles menstruels permettent l'extension des canaux en un réseau complexe surplombé par les unités terminales ducto-lobulaires. Ce n'est cependant qu'après la grossesse et au moment de la lactation que la glande mammaire sera pleinement ramifiée et que les cellules luminales au sein des alvéoles seront différenciées en lactocytes, les cellules productrices de lait. Après une période de sevrage, la glande mammaire subit l'involution marquée par l'apoptose des lactocytes. L'involution est réversible en cas de nouvelle grossesse mais sera permanente au moment de la ménopause.

INTRODUCTION

Ce processus de délimitation des bourgeons mammaires est également dépendant de signaux épithélio-mésenchymateux régulant la voie Wnt. En effet, des protéines telles que TBX3 (*T-box transcription factor 3*) (Jerome-Majewska *et al.*, 2005) et BMP4 (*Bone Morphogenic Protein 4*) (Cho *et al.*, 2006) respectivement exprimées dans le mésenchyme et dans l'épithélium exercent une action antagoniste sur l'expression des protéines de la voie Wnt, mais sont également soutenues par les facteurs de croissance des familles FGF (*Fibroblast Growth Factors*) (Veltmaat *et al.*, 2006) et EGF (*Epidermal Growth Factors*) (Panchal *et al.*, 2007) et leurs voies de signalisations associées. La formation complète du bourgeon primaire définit la fin de la phase embryonnaire. Jusqu'au cinquième mois de grossesse, l'ensemble de ces signaux et de leurs interactions résultent en un remodelage cellulaire précis qui permet l'expansion des bourgeons mammaires en plusieurs masses épithéliales (bourgeons secondaires) qui s'enfoncent dans le mésenchyme sous-jacent (Figure 1). Ces masses épithéliales continuent de s'enfoncer dans le mésenchyme, entourées par une fine couche de cellules fibroblastiques, formant alors 15 à 20 prolongements cylindriques qui se dilatent à leur extrémité pour donner la matrice d'accueil des futurs canaux galactophores. La formation de ces canaux a été montrée comme fortement dépendante au facteur de croissance FGF2 (Ewald *et al.*, 2008). La couche de cellules fibroblastiques qui entoure les ébauches subit une différenciation pour donner les cellules myoépithéliales contractiles. Au cours du septième mois de grossesse, une lumière se met en place dans ces prolongements pour former les ébauches des canaux galactophores. L'acquisition de cette lumière est liée à des phénomènes apoptotiques orchestrés par la protéine BIM (ou BCL2L11, *Bcl-2-like protein 11*), une protéine pro-apoptotique de la sous-famille BH3-only (Mailleux *et al.*, 2007). Les extrémités des canaux subissent une différenciation très partielle en unités lobulo-alvéolaires (Naccarato *et al.*, 2000). Ces ébauches d'acini régresseront dans les quatre semaines après la naissance et cette régression correspond d'ailleurs à une baisse de la sécrétion de prolactine (Russo *et al.*, 1982). Au huitième mois, les lumières formées se rejoignent et débouchent au niveau du mamelon. Les études montrent l'importance de certaines hormones telles que l'insuline, la prolactine et l'aldostérone dans le développement fœtal de la glande mammaire, contrairement aux œstrogènes et à la progestérone qui prendront le pas dans les prochaines phases de développement (Ceriani, 1970a, 1970b).

INTRODUCTION

b. Phase pubertaire

Ainsi, à la naissance, les structures rudimentaires de la glande mammaire sont présentes et sont pratiquement similaires chez l'homme et la femme (Russo et Russo, 2004). Chez l'homme, la glande mammaire persistera à ce stade tout au long de la vie. Chez la femme, une légère augmentation de la ramification des canaux galactophores et la formation de petites unités terminales ducto-lobulaires se produisent pendant l'enfance mais ces modifications restent très sommaires. C'est à la puberté que le développement de la glande mammaire s'accélère de façon significative (Figure 1). En effet, l'apparition du phénomène d'ovulation et des cycles menstruels conduit à la libération de différentes hormones qui vont conduire à ce développement rapide. Ces remodelages sont caractérisés par l'élongation des canaux existants et l'embranchement en canaux secondaires aux extrémités desquelles apparaissent des amas de petits canalicules au bout desquelles se forment les ébauches des alvéoles. Deux types d'hormones tiennent un rôle majeur dans le développement de la glande mammaire au moment de la puberté : l'hormone de croissance (*Growth Hormone*) sécrétée par l'adénohypophyse, et les œstrogènes sécrétés par les ovaires. L'hormone de croissance mène à la sécrétion d'IGF1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) régulant la prolifération cellulaire des cellules épithéliales (Ruan et Kleinberg, 1999). Les œstrogènes ont une action directe sur les cellules épithéliales de la glande mammaire. Cette action est limitée au principal récepteur aux œstrogènes, le récepteur alpha ($Er\alpha$), comme l'ont montré différentes études (Feng et al., 2007; Mallepell et al., 2006). L'activation intracellulaire de ces récepteurs met en place des voies de signalisation conduisant à la sécrétion de facteurs de croissance. Parmi eux, on compte des facteurs des familles de l'EGF (Coleman et al., 1988), du FGF (Lu et al., 2008) et du TGF β (Silberstein et Daniel, 1987) qui vont alors réguler de façon paracrine le développement des cellules avoisinantes, notamment les cellules souches mammaires situées dans le compartiment basal de l'épithélium, menant donc à la prolifération et à la différenciation (Paine et Lewis, 2017; Zolfaroli et al., 2018). Ce développement est dépendant des cycles menstruels et peut donc être défini par des remodelages graduels infimes mais prenant place à chaque cycle et qui continueront jusqu'à l'âge d'environ 35 ans. La puberté est également synonyme d'augmentation significative de la taille de la glande mammaire qui est principalement due non pas au développement des structures décrites ci-dessus mais plutôt

INTRODUCTION

à une augmentation du dépôt de tissus adipeux au sein de la glande qui formera la matrice principale du réseaux de canaux galactophores (Russo *et al.*, 1987).

c. Phase adulte

Le développement complet de la glande mammaire a lieu au moment de la grossesse et de la lactation, car la glande va acquérir sa fonction principale qui est de sécréter le lait. La grossesse est marquée par la formation de nouveaux embranchements de canalicules, le développement de nouvelles alvéoles mais aussi la différenciation des cellules épithéliales alvéolaires en cellules sécrétrices de lait (Figure 1). Deux hormones vont jouer un rôle majeur dans cette évolution : la progestérone (Briskin *et al.*, 1998) et la prolactine (Ormandy *et al.*, 1997). D'autres hormones et facteurs vont également participer tels que l'œstrogène, l'hormone lactogène placentaire, l'EGF, le TGF α , des facteurs paracrines sécrétées par le stroma (Hassiotou et Geddes, 2013) mais également certaines neurotrophines (Colitti, 2015). Durant le deuxième trimestre de grossesse, après la phase de développement des alvéoles, une augmentation progressive des niveaux de prolactine conduit à la différenciation des cellules épithéliales alvéolaires en lactocytes, permettant la synthèse de lait. Ces changements sont accompagnés d'une augmentation significative de la taille de la glande mammaire. Ainsi, à la fin de la grossesse, la glande mammaire a atteint sa maturité structurale et est capable de produire le lait. Il reste cependant quelques modifications a apporté notamment au niveau de la maturation du lait. En effet, trois types de lait maternel vont se succéder durant les premières semaines suivant l'accouchement. Le colostrum sera présent pendant trois à cinq jours, suivi d'un lait dit « de transition » pendant deux à trois semaines qui laissera la place au lait mature. Cette maturation est extrêmement importante pour apporter les besoins immunologiques et nutritifs nécessaires au bon développement de l'enfant (Smilowitz *et al.*, 2014). L'augmentation de la synthèse de lait mais également sa maturation sont liées à la séparation du placenta lors de l'accouchement. Celle-ci provoque une diminution des niveaux de progestérone et d'œstrogènes et donc une levée de l'inhibition de la prolactine (Pang et Hartmann, 2007). La sécrétion de lait sera quant à elle déclenchée par les succions de l'enfant, stimulant la sécrétion d'ocytocine qui provoquera la contraction des cellules myoépithéliales entourant les acini (Crowley, 2015).

L'absence de demande de lait aura pour conséquence l'involution de la glande mammaire. En effet, l'accumulation de lait va tout d'abord induire l'apoptose des cellules

INTRODUCTION

alvéolaires *via* l'augmentation de facteurs pro-apoptotiques tels que SGP-2 (*Sulfated Glycoprotein-2*) ou la caspase 1 (Lund *et al.*, 1996). La disparition des cellules alvéolaires est suivie d'un remodelage de la glande permis par l'action des MMPs, notamment les MMPs-2, -3 et -11 (Strange *et al.*, 1992; Talhouk *et al.*, 1992). Ainsi, les connections entre tissus et la membrane basale disparaissent, ce qui permet de reformer les composants canaux. L'apoptose continue également pendant le remodelage tissulaire à travers l'anoïkis car les interactions entre cellules et matrice extracellulaire sont perdues (Green et Streuli, 2004). Les alvéoles retrouvent un état quiescent jusqu'à la prochaine grossesse et un nouveau développement alvéolaire (Hurley, 1989). Cependant, le mécanisme d'involution de la glande mammaire devient irréversible au moment de la ménopause, correspondant aux diminutions des taux d'œstrogènes, de progestérone et des autres facteurs impliqués dans le renouvellement alvéolaire associé à la perte de follicules ovariens actifs.

2. Anatomie

Le sein est un organe composé d'une glande mammaire entourée de tissus adipeux, le tout soutenu sur les muscles pectoraux par des fibres de soutien que sont les ligaments de Cooper (Figure 2). Le sein comporte en son centre le mamelon entouré par l'aréole, formant à eux deux la plaque aérolo-mamelonnaire. Le mamelon est cylindrique, pigmenté et séparé de l'aréole par un sillon. Il constitue la zone où débouchent les canaux lactifères de la glande mammaire (15 à 20 canaux). L'aréole comporte quant à elle des glandes sébacées, les tubercules de Morgani, qui vont s'hypertrophier lors de la grossesse pour donner les glandes de Montgomery. Ces glandes sécrètent une substance lubrifiante empêchant la déshydratation du mamelon et de l'aréole mais aussi des composés volatils favorisant la nutrition du nouveau-né (Doucet *et al.*, 2009).

La glande mammaire est organisée en une vingtaine de lobes drainés par les canaux galactophores ou canaux de premier ordre. Ces lobes sont eux-mêmes composés de 20 à 40 lobules drainés par des canaux interlobulaires ou canaux de second ordre. Chaque lobule peut contenir de 10 à 100 alvéoles, également appelés acini. L'acinus constitue l'unité sécrétrice de base de la glande. En effet, un acinus se présente sous la forme d'une cavité arrondie drainée par un canalicule débouchant sur un canal intralobulaire ou canal de troisième ordre (Figure 2). Un canal de second ordre associé à un lobule forment une unité terminale ducto-lobulaire

INTRODUCTION

(UTDL). Bien qu'on ait longtemps classifié les différents types de cancers du sein selon leur origine canalaire ou lobulaire, il est maintenant établi que cette classification n'est plus d'actualité car la grande majorité des cancers du sein tiennent leur origine des UTDLs (Wellings et Jensen, 1973).

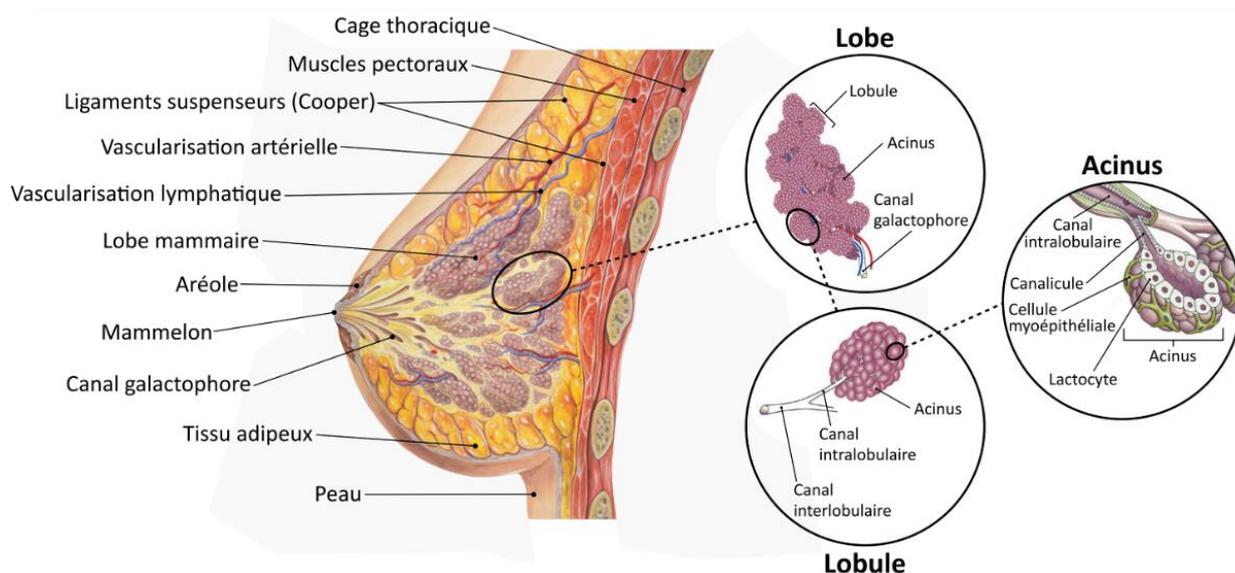


Figure 2 : Anatomie et structure de la glande mammaire

A gauche : représentation schématique d'une coupe sagittale de sein. La glande mammaire est une masse de tissus épithéliaux entourée de tissu adipeux, le tout reposant sur les muscles pectoraux. La glande est soutenue par les ligaments de Cooper. Elle est constituée d'une vingtaine de lobes dont les canaux terminent au niveau du mamelon où sera expulsé le lait maternel. L'aréole entourant le mamelon a pour fonction principale l'hydratation du mamelon grâce à une substance lubrifiante sécrétée par les glandes de Montgomery (adaptée de Medical Illustrations by Patrick Lynch).

A droite : Représentation schématique d'un lobe mammaire. Chaque lobe est constitué de 20 à 40 lobules qui se composent d'une arborescence de 10 à 100 acini (ou alvéoles). Un acinus est l'unité de base de la production de lait et se caractérise par une lumière entourée par les lactocytes, eux-mêmes surplombés par des cellules myoépithéliales qui provoqueront la sécrétion du lait par leur contraction (adaptée de www.santeallaitementmaternel.com et www.humanbiologylab.pbworks.com).

La glande mammaire se compose donc d'un tissu épithélial canalaire au sein d'un tissu conjonctif, lui-même entouré de tissu adipeux (Figure 3). La couche épithéliale est composée de deux couches cellulaires distinctes. La couche intérieure est composée de cellules luminales dont certaines, les cellules composant les acini, ont la capacité de se différencier en lactocytes pendant la lactation. La couche externe est composée de cellules myoépithéliales contractiles qui possèdent des caractéristiques propres aux cellules musculaires lisses. Sous l'action de l'ocytocine, ces cellules myoépithéliales se contractent permettant la sécrétion de lait par les lactocytes et son acheminement à travers les canaux galactophores. La couche myoépithéliale repose sur la membrane basale, composée de laminine et de collagène IV, et contiendrait des

INTRODUCTION

cellules souches mammaires bipotentes responsables de la remarquable capacité de renouvellement et de transformation des tissus mammaires (Visvader, 2009). Le tissu conjonctif mammaire entourant la bicouche épithéliale est un tissu richement vascularisé par les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques mais aussi les fibres nerveuses. Ce tissu peut être divisé en deux catégories : le stroma interlobulaire entourant les UTDLs est plus dense et contient plus de collagène que le stroma intralobulaire entourant les acini. Le stroma intralobulaire, aussi appelé tissu palléal, est lâche et on y trouve des adipocytes, des fibroblastes, des lymphocytes ou encore des macrophages (Arendt *et al.*, 2010).

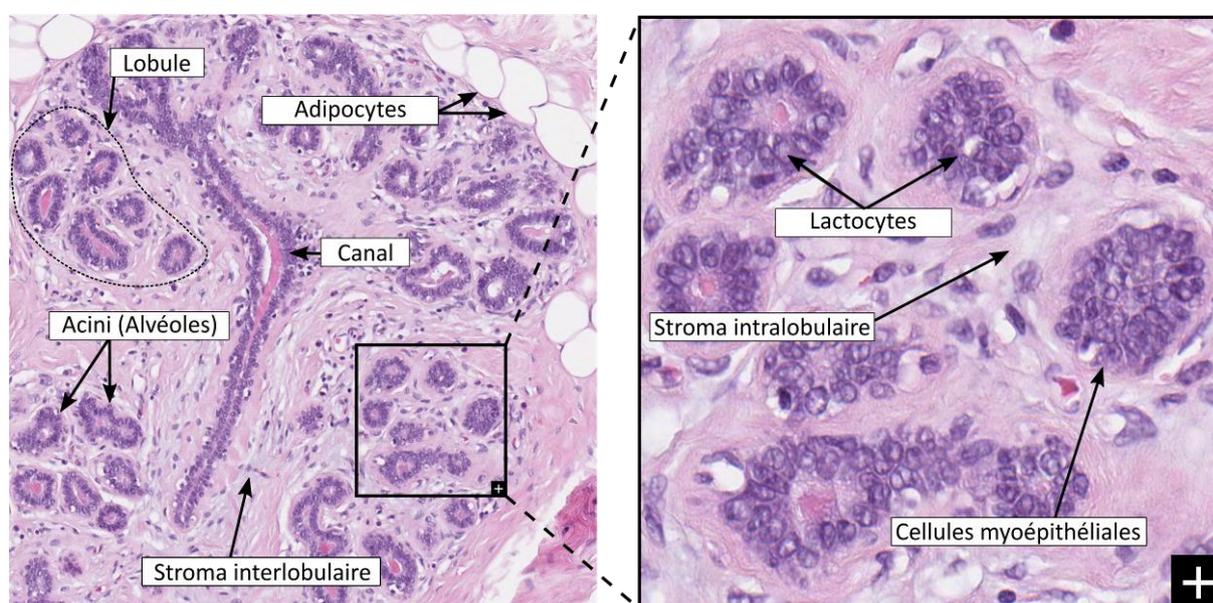


Figure 3: Histologie de la glande mammaire

A gauche : Lobe mammaire post-pubertaire hors lactation. Chaque lobe est délimité par du tissu conjonctif et baigne dans le tissu adipeux (adipocytes que l'on peut voir sur la coupe). Au sein du lobe, on trouve plusieurs lobules (délimités par des pointillés) qui sont entourés par le stroma interlobulaire dense.

A droite : Agrandissement d'un lobule mammaire. Le lobule est composé d'acini baignant dans le stroma intralobulaire lâche. Un acinus se caractérise par la présence d'une assise de cellules épithéliales concentrique, surplombée par la lame basale et les cellules myoépithéliales (adaptée de www.proteinatlas.org)

INTRODUCTION

B. Le cancer du sein

Le cancer du sein est un enjeu médico-social majeur en France car particulièrement fréquent et malheureusement toujours mortel chez les femmes. C'est une maladie dans laquelle de très nombreux facteurs sont impliqués permettant le dérèglement du fonctionnement normal des cellules et leur développement anarchique. C'est ce développement anarchique des cellules qui sera à l'origine du cancer.

1. Epidémiologie

Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué et la première cause de décès par cancer chez les femmes dans le monde. En effet, selon les chiffres les plus récents, on estimait à plus de 2 millions le nombre de nouveaux cas (soit 24,2 % de tous les cancers chez les femmes) et à environ 620 000 le nombre de décès (soit 15 % de tous les décès par cancer chez les femmes) en 2018 (GLOBOCAN 2018 ([Global Cancer Observatory, 2018](#))). Avec près de 60 000 nouveaux cas estimés en France en 2018, le cancer du sein est le deuxième cancer le plus fréquent en France et s'élève à la première place chez la femme que ce soit en France mais aussi dans le monde. C'est également le cancer le plus mortel chez la femme, avec plus de 13 000 décès estimés en France en 2018, ce qui représente près de 20 % des décès féminins par cancer ([Jéhannin-Ligier et al., 2017](#)). Etant beaucoup plus rare chez l'homme où il ne représente qu'environ 1 % des cas, le cancer du sein reste tout de même responsable de près de 8 % de l'ensemble des décès par cancer, tous sexes confondus. La France se situe au huitième rang parmi les pays de l'Union Européenne ayant le plus haut niveau d'incidence et au dixième rang en termes de mortalité ([INCa, Les cancers en France - Editions 2017, 2018](#)).

Le dépistage organisé du cancer du sein a été généralisé en France en 2004 et peut expliquer en partie les évolutions en termes d'incidence et de mortalité. En effet, le taux d'incidence de ce cancer a fortement augmenté entre 1980 et 2005 (+ 1,7 % par an en moyenne) puis a diminué entre 2005 et 2012 à raison de - 1,5 % par an (56,3 cas pour 100 000 personnes-années en 1980, 97,8 en 2005 et 88,0 en 2012) (Figure 4). Cette diminution décrite dans plusieurs pays occidentaux, concernerait principalement les femmes de 50-69 ans ([Molinié et al., 2014](#)). Parmi les facteurs qui pourraient expliquer cette baisse, la saturation du dépistage et l'arrêt progressif de la prescription des traitements hormonaux de la ménopause (THS) ont été avancées. Les THS, Traitements Hormonaux de Substitution, aussi appelés

INTRODUCTION

traitement hormonal de la ménopause, permettent de remplacer les hormones (œstrogène et/ou progestérone) qui ne sont plus produites naturellement par les ovaires après la ménopause. Ce traitement vise à soulager les symptômes de la ménopause et protéger contre la perte de densité osseuse (ostéoporose). Les effets carcinogènes des THMs ont été décrits en 2002 (Rossouw *et al.*, 2002) et ces molécules ont été classés comme carcinogènes en 2005 par l’OMS (*Organisation Mondiale de la Santé*), menant à l’arrêt de leur prescription. Suite à cette diminution du taux d’incidence jusqu’en 2012, on constate une augmentation du taux d’incidence estimé sur les dernières projections de 2017. Selon ces estimations, le taux d’incidence de 2017 dépasserait même celui de 2005 passant de 97,8 à 100,5 (Jéhannin-Ligier *et al.*, 2017). L’évolution de l’incidence des cancers du sein est complexe à analyser car influencée à la fois par les pratiques de prise en charge et les facteurs de risque mais on pourrait cependant expliquer cette augmentation en majeure partie par le dépistage et en moindre proportion par l’augmentation de la population et son vieillissement.

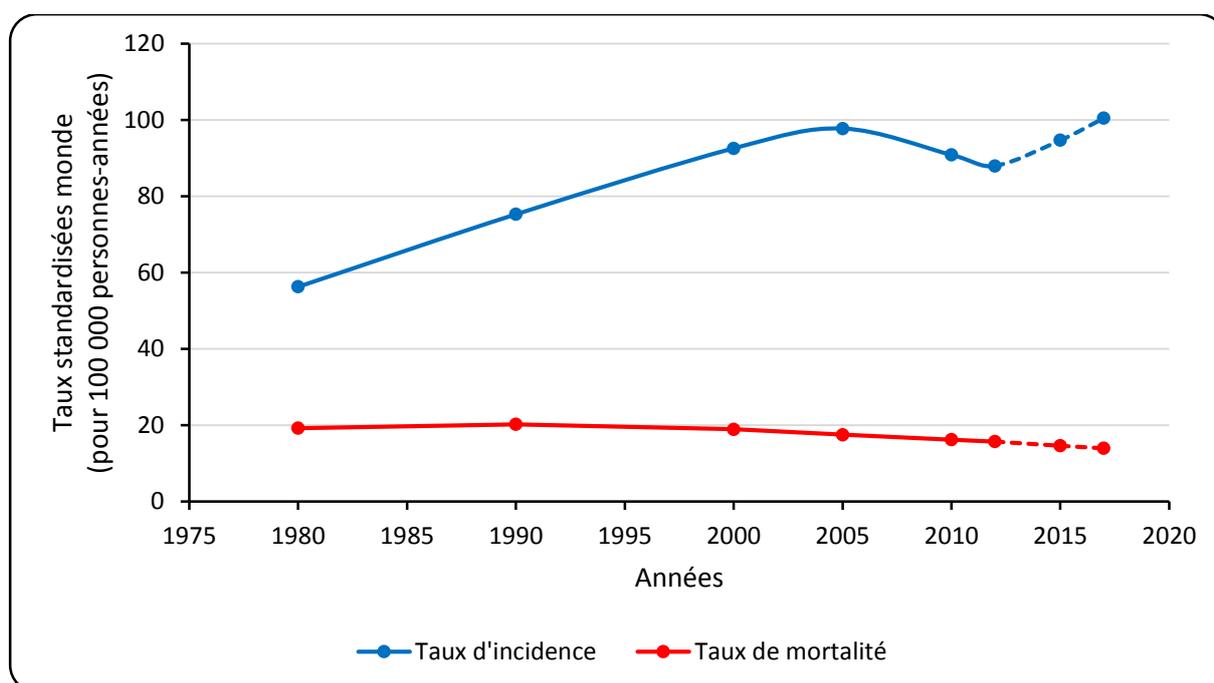


Figure 4 : Tendance chronologique des taux d’incidence et de mortalité du cancer du sein en France

Taux exprimés en nombre de femmes pour 100 000 femmes – années (adaptée de *Estimation nationale de l’incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012*, Réseau Francim, HCL, InVS, INCa, 2013). Les pointillés représentent des projections.

INTRODUCTION

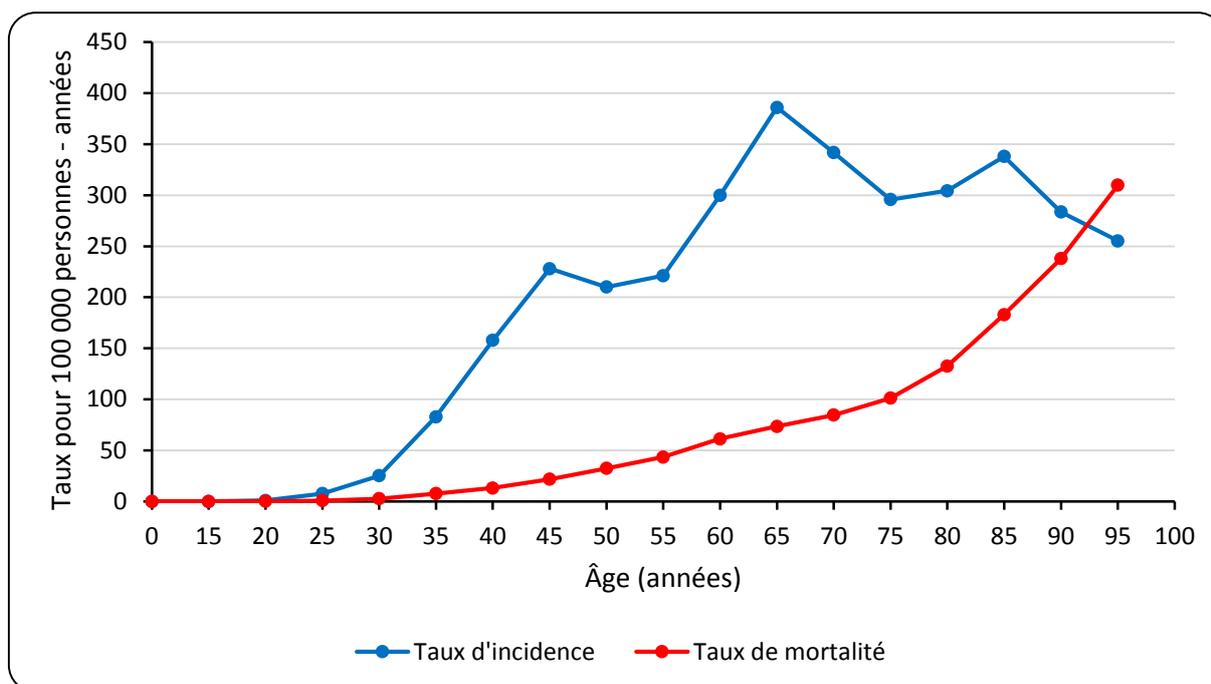


Figure 5 : Taux d'incidence et de mortalité par âge pour le cancer du sein en France en 2012

Taux exprimés en nombre de femmes pour 100 000 femmes – années (adaptée de Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012, Réseau Francim, HCL, InVS, INCa, 2013).

Le taux de mortalité est resté globalement stable jusqu'au début des années 2000 (environ 20 décès pour 100 000 personnes-années), puis a baissé de manière régulière (diminution d'environ 1,4 % par an jusqu'en 2012, 15,7 pour 100 000 femmes) (Figure 4). Les dernières estimations disponibles prévoient d'ailleurs une poursuite de la diminution de la mortalité avec un taux de mortalité qui atteindrait 13,9 pour 100 000 femmes en 2017 (INCa, 2018). Ces chiffres encourageants sont très certainement liés à la politique de dépistage précoce ainsi qu'aux progrès réalisés dans la prise en charge thérapeutique. Le cancer du sein est un cancer de bon pronostic car la survie nette à 5 ans est estimée à 87 % pour les femmes diagnostiquées entre 2005 et 2010. Cette survie nette à 5 ans s'est également améliorée ces dernières années car elle était de 80 % pour les femmes diagnostiquées entre 1989 et 1993. Ces données sont standardisées pour toutes les classes d'âge mais la survie est bien différente en fonction de l'âge des patientes. En effet, près de 71 % des décès par cancer du sein surviennent chez les femmes de 65 ans et plus, la survie nette à 5 ans chez les femmes de 45 à 74 ans est plus élevée (93 %). Dans le même sens, elle est de 90 % chez les femmes de 15 à 44 ans mais chute à 76 % chez les femmes de plus de 75 ans. Ceci est nettement visible sur les

INTRODUCTION

taux d'incidence et de mortalité par classe d'âge (Figure 5). De plus, cette survie est également différente selon le stade plus ou moins avancée de la maladie. Ainsi, les taux de survie à 5 ans pour les patientes diagnostiquées entre 1999 et 2005 sont de 98,3 % pour le stade local et de 83,5 % pour le stade régional (envahissement ganglionnaire) contre 23,3 % pour le stade métastatique (Noone *et al.*, 2018). Ceci confirme la nécessité d'une détection précoce de ce cancer et l'importance de la mise en place du dépistage organisé en France.

2. Etiologie et facteurs de risque

Comme indiqué dans la partie précédente, les cancers du sein touchent principalement les femmes d'un certain âge. Il existe cependant de nombreux autres facteurs de risques, c'est-à-dire un comportement, une substance ou un état qui accroît le risque d'apparition d'un cancer, pouvant être corrélés au cancer du sein (Figure 6). On peut classer ces facteurs de risque en trois grandes catégories : les facteurs liés directement au statut hormonal, ceux liés au mode de vie et aux facteurs environnementaux et enfin ceux liés à l'histoire familiale et aux facteurs génétiques.

a. Statut hormonal et condition des seins

Environ deux cancers du sein sur trois sont hormono-dépendants (Viale, 2012). Ils présentent donc une dépendance aux hormones que sont les œstrogènes et la progestérone. Les effets carcinogènes des œstrogènes pourraient être dus à deux mécanismes (Yue *et al.*, 2013). D'abord, leur signalisation active, *via* les récepteurs aux œstrogènes, module l'expression de certains gènes et augmente la prolifération, ce qui conduirait à une plus forte chance de mutations lors des phases de réplication de l'ADN. Ensuite, un mécanisme indépendant des récepteurs peut également expliquer les effets carcinogènes des œstrogènes. En effet, l'œstradiol, le principal membre des œstrogènes, peut être métabolisé par des enzymes de type cytochrome P450 au sein du tissu mammaire, résultant en la formation de catécholes. Ces catécholes peuvent ensuite être métabolisés pour donner des quinones qui peuvent provoquer des dommages à l'ADN (Cavalieri *et al.*, 2006). L'exposition prolongée aux œstrogènes serait donc un facteur de risque important dans le cancer du sein. Ainsi, nombreuses sont les situations modifiant le statut hormonal qui sont considérées comme facteurs de risques. Les règles précoces (avant l'âge de 12 ans) sont considérées comme un facteur de risque (Titus-Ernstoff *et al.*, 1998) mais une étude prenant en compte

INTRODUCTION

les différents sous-types moléculaires du cancer du sein, est venu contredire les anciens résultats (Li *et al.*, 2013). Malgré cela, les règles précoces restent un facteur de risque avéré probablement dû à une exposition prolongée aux hormones sexuelles. De la même façon, ne pas porter d'enfants, l'absence d'allaitement, la grossesse tardive (après 30 ans) et une ménopause tardive (après 55 ans) augmentent le risque de développer un cancer du sein (Sisti *et al.*, 2016). De manière intéressante, il semblerait que ces facteurs soient différenciellement corrélés en fonction du type de cancer du sein. Par exemple, l'allaitement semble avoir un effet protecteur vis-à-vis des cancers du sein triple-négatifs mais pas des autres types de cancer (Millikan *et al.*, 2008). Par ailleurs, il semblerait que le risque de générer un cancer du sein augmente pendant une courte période après un accouchement, ce qui peut être expliqué par les importantes transformations ayant lieu pendant l'involution des tissus lactogènes. La prise de contraceptifs et de médicaments contenant des hormones sexuelles est également considérée comme un facteur de risque. Parmi ces médicaments, les THS ont montré une augmentation nette des risques de cancer du sein chez les utilisatrices récentes, risque qui décroît avec l'arrêt de leur utilisation (Tamimi *et al.*, 2012). Les contraceptifs oraux contenant des œstrogènes sont également considérés comme facteurs de risques si l'utilisation est récente (inférieure à 5 ans) et prolongée (plus de 15 ans d'utilisation) (Beaber *et al.*, 2014). Les contraceptifs à base de progestérone ne semblent pas présenter de risques (Samson *et al.*, 2016) bien que les contraceptifs à base d'œstrogènes et de progestérone combinés augmentent le risque. Toujours lié à l'exposition aux hormones sexuelles, la taille importante et une forte densité des seins sont également des facteurs de risque (Boyd *et al.*, 1998). La densité correspond à la place occupée par l'épithélium et le stroma mammaire par rapport aux tissus adipeux. Ainsi, on imagine bien que la taille et la densité des seins sont influencées par la quantité d'œstrogènes qui sont à l'origine de la prolifération et du développement des tissus mammaires. Enfin, certains problèmes bénins sont considérés comme des facteurs de risque tels que des abcès, des kystes ou encore des hyperplasies atypiques (Tice *et al.*, 2013).

b. Mode de vie et facteurs environnementaux

Le mode de vie et l'exposition à certains facteurs extérieurs vont avoir un impact important sur les risques de cancer du sein. En effet, il a été montré que les femmes en surpoids et obèses (IMC > 25) ont plus de risques de générer un cancer du sein que les femmes n'ayant pas de surpoids (Neuhouser *et al.*, 2015). De plus, ces patientes ont plus de risques de

INTRODUCTION

générer un type particulier de cancer du sein plus agressif (Biglia *et al.*, 2013). Ce risque serait lié à l'hyperinsulinémie résultant de l'excès de poids. En effet, une forte concentration en IGF (*Insulin Growth Factor*) provoque une diminution des niveaux de SHBG (*Sex Hormone Binding Globulin*) menant donc à une augmentation des niveaux d'oestrogènes. L'excès de poids conduirait également à la diminution des niveaux d'adiponectine, une protéine montrée comme pouvant inhiber la croissance tumorale (Macis *et al.*, 2014), mais également directement sur les niveaux d'oestrogènes car les tissus adipeux sont capables de produire des oestrogènes (Nelson et Bulun, 2001). Enfin, le surpoids joue également sur les niveaux de cholestérol qui vont alors augmenter. Ce haut niveau de cholestérol perturberait la signalisation cellulaire en s'insérant dans les membranes lipidiques mais il a également été montré que le 27-hydroxycholestérol (27HC), un métabolite du cholestérol, pouvait agir en tant qu'oestrogène (Nelson *et al.*, 2014). Ainsi, la consommation de régimes riches en graisses et protéines animales est considérée comme un facteur de risque du cancer du sein (Grasgruber *et al.*, 2018). La pratique d'une activité physique régulière décroît le risque d'avoir un cancer du sein en diminuant les effets du surpoids. L'activité physique permet la diminution de la production d'IGF, la diminution des tissus adipeux (et donc d'oestrogènes) mais aussi l'augmentation de SHBG (Gonçalves *et al.*, 2014). La consommation d'alcool augmente les risques de cancer du sein (Scoccianti *et al.*, 2014). En effet, des carcinogènes tels que l'acétaldéhyde ou le benzène sont retrouvés dans les boissons alcoolisées ou peuvent être générés par le métabolisme de l'alcool (Lachenmeier *et al.*, 2012). L'alcool peut perturber les niveaux d'oestrogènes en impactant sur le métabolisme hépatique des oestrogènes mais également en augmentant la conversion d'androgènes en oestrogènes (Purohit, 2000). L'alcool peut aussi supprimer certaines fonctions immunitaires, augmenter la prolifération cellulaire, inhiber la réparation de l'ADN et promouvoir la migration et l'invasion cellulaire. La consommation de tabac n'a été que récemment identifiée comme facteur de risque du cancer du sein (National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health, 2014). L'exposition à des facteurs environnementaux tels que certains pesticides (dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE)) ou encore une forte exposition aux émissions de gaz de circulation pendant la grossesse augmentent les risques de cancer du sein (Dumalaon-Canaria *et al.*, 2014). Enfin, l'exposition à des radiations ionisantes notamment pour les soins relatifs à des lymphomes de Hodgkins, augmente également les risques de cancer du sein (Dores *et al.*, 2010).

INTRODUCTION

c. Histoire familiale et facteurs génétiques

Les risques d'avoir un cancer du sein sont trois fois plus élevés si l'on possède un parent ayant eu un cancer du sein (Goldgar *et al.*, 1994). Cette forte augmentation du risque peut être expliquée à la fois par des modes de vie similaires au sein d'une même famille mais également par des facteurs génétiques. En effet, on estime qu'environ 10 % des cancers du sein peuvent être attribués à une mutation génétique héréditaire. Ils sont majoritairement dus à des mutations touchant les gènes *BRCA1* et 2 (*Breast Cancer 1 et 2*), des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Une mutation dans l'un ou l'autre gène augmente les risques de cancer du sein par dix (Chen *et al.*, 1999).

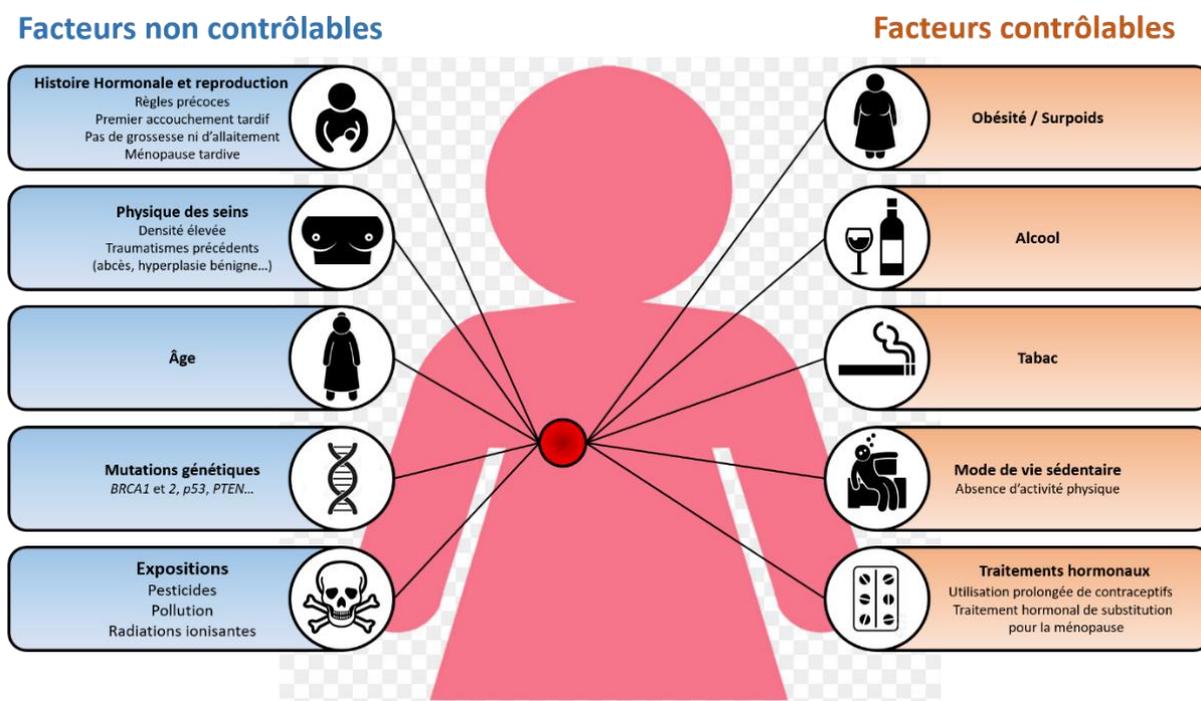


Figure 6 : Les facteurs de risque du cancer du sein

Certains facteurs de risque sont peu ou pas contrôlables tels que l'âge ou les mutations héréditaires. D'autres sont en revanche contrôlables et ceux-ci montrent l'importance d'adopter un mode vie sain afin de réduire les risques de cancer du sein.

D'autres mutations génétiques sont corrélées à une augmentation des risques de cancer du sein telles que des mutations touchant les gènes *P53*, *PTEN*, *ATM*, *BRIP1* ou encore *CHEK2* (Rojas et Stuckey, 2016).

INTRODUCTION

3. Origine cellulaire du cancer du sein

Le cancer est une maladie caractérisée par la présence de cellules anormales se divisant de façon excessive et anarchique, qui ne sont pas coordonnées avec les autres tissus et qui ne répondent pas aux mécanismes de régulation physiologiques. Les cellules saines vont acquérir des capacités et des mécanismes spécifiques permettant un passage vers leur condition tumorale. Le nombre de ces capacités et mécanismes est très vaste mais en 2000, dans une volonté de simplifier la compréhension de la condition tumorale, Hanahan et Weinberg définirent six caractéristiques distinctes et complémentaires permettant la croissance tumorale ainsi que la dissémination métastatique qu'ils appelèrent les « hallmarks » du cancer (Hanahan et Weinberg, 2000). Ainsi, une cellule tumorale peut acquérir une prolifération chronique, échapper aux suppresseurs de croissance, résister à la mort cellulaire, acquérir une immortalité répllicative, induire l'angiogenèse, et enfin activer l'invasion et le processus métastatique. De nouveaux paramètres vinrent s'ajouter à cette définition et en 2011, les deux auteurs s'efforcèrent de mettre à jour leurs précédentes conclusions en ajoutant quatre autres « hallmarks » indispensables à la transformation tumorale (Hanahan et Weinberg, 2011). Cependant, ils firent la distinction entre deux caractéristiques permettant l'acquisition des autres « hallmarks » et deux caractéristiques émergentes et prometteuses dans le domaine des caractéristiques propres à la tumorigenèse. Ainsi, l'instabilité génomique et l'inflammation en faveur de la tumeur permettent, toujours selon Hanahan et Weinberg, l'émergence du cancer, tandis que la plasticité et l'amplification du métabolisme énergétique ainsi que l'échappement à la réponse immunitaire viennent s'ajouter comme capacités tumorales. Un total de dix « hallmarks » a donc été défini mais la nouvelle génération de « hallmarks » a soulevé une différence entre les capacités tumorales et les caractéristiques permettant l'acquisition de ces capacités tumorales et qui sont donc à l'origine du cancer. Plusieurs études ont d'ailleurs tenu à revisiter les conclusions de Hanahan et Weinberg en simplifiant ou en limitant la définition des « hallmarks » (Fouad et Aanei, 2017; Horne *et al.*, 2015). Au vu des dernières publications, on peut avancer que la transformation tumorale est due à l'acquisition de huit « hallmarks » (Figure 7) et que les transformations nécessaires à l'acquisition de ces capacités pro-tumorales sont le résultat d'altérations génétiques et/ou épigénétiques sporadiques ou, plus rarement héréditaires (Zhang *et al.*, 2017).

INTRODUCTION

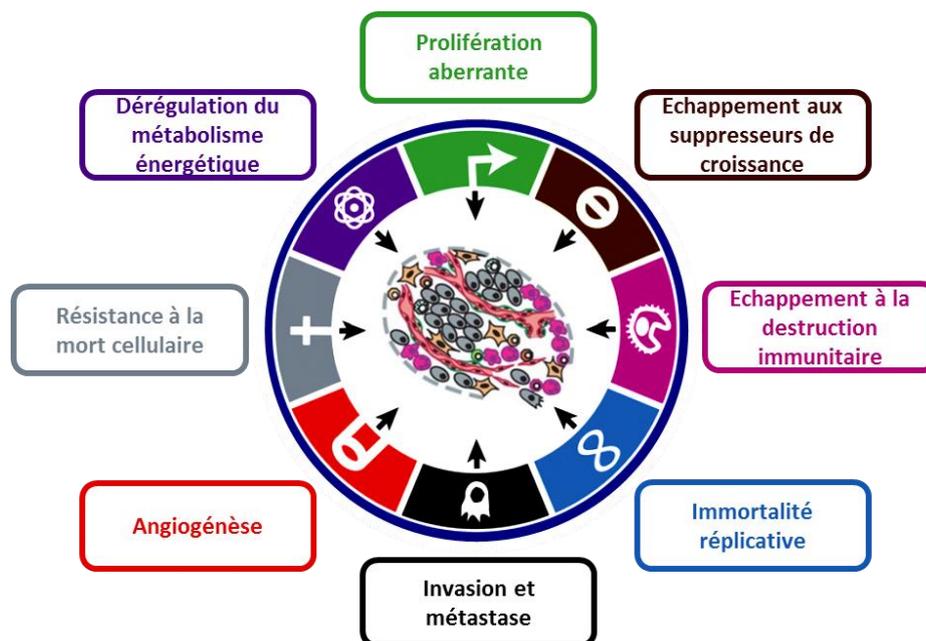


Figure 7 : Les huit « Hallmarks » du cancer
(adaptée de *Hanahan et Coussens, 2012*).

Les altérations génétiques représentent les modifications de la séquence d'ADN telles que des mutations ponctuelles ou des délétions tandis que les modifications épigénétiques représentent les modifications de l'expression génique sans modification de la séquence d'ADN (*Karsli-Ceppioglu et al., 2014; Mulligan, 2018; Virani et al., 2012*). Un autre aspect important à l'origine du cancer est la participation du microenvironnement tumoral qui va mener à l'acquisition des « hallmarks » en influençant à la fois sur l'instabilité génétique et épigénétique mais aussi en promouvant certaines voies de signalisation propres à la tumorigenèse tout au long de la progression tumorale (*Hanahan et Coussens, 2012; Hanahan et Weinberg, 2011; Soysal et al., 2015*). Ainsi, l'émergence d'un cancer du sein sera majoritairement due à l'acquisition de caractéristiques pro-tumorales (« hallmarks ») causée par l'instabilité génomique, l'épigénétique et l'influence du microenvironnement tumoral. Ces trois aspects permettant la tumorigenèse mammaire sont eux-mêmes sous l'influence des facteurs de risque précédemment développés (Figure 8).

INTRODUCTION

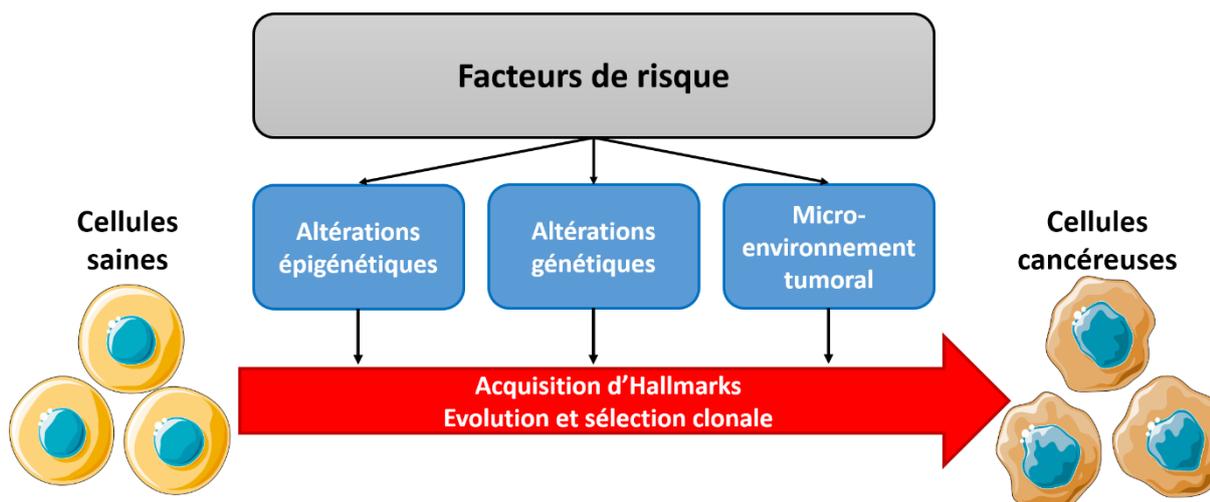


Figure 8 : Les origines du cancer

Les facteurs de risque propres à chaque cancer favorisent les altérations épigénétiques, génétiques et le microenvironnement tumoral, les trois facteurs principaux responsables de l'acquisition des caractéristiques tumorales (« Hallmarks ») (adaptée de Fouad et Aanei, 2017).

Les altérations vont toucher deux grands types de gènes : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. L'activation d'un oncogène favorise le développement du cancer tandis que c'est l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs qui favorise le développement du cancer (Spandidos, 2007).

a. Altérations génétiques

L'amélioration des technologies haut-débit telles que les séquençages nouvelle-génération (*Next-Generation Sequencing : NGS*) et les analyses génomiques à large échelle par microarrays ont considérablement contribué à l'identification des changements génomiques et épigénomiques dans de nombreux types de cancers (Garraway et Lander, 2013; Lee *et al.*, 2016; Nakagawa et Fujita, 2018). Différentes études ont étudié le génome entier de nombreux échantillons de cancer du sein et ont pu en détacher certains gènes fortement impliqués dans la tumorigénèse mammaire (Goncalves *et al.*, 2014; Nik-Zainal *et al.*, 2016; Shiovitz et Korde, 2015). Ces études permettent également de découvrir de plus en plus de gènes moins souvent retrouvés dans l'ensemble des cancers du sein mais tout aussi importants pour notre compréhension des mécanismes moléculaires menant au cancer du sein. Dans le cas du cancer du sein, deux types d'altérations génétiques peuvent se produire :

INTRODUCTION

Le premier type d'altérations génétiques est la modification du nombre de copie de gènes soit par amplification/délétion, soit par réarrangement chromosomique (Ciriello *et al.*, 2013). En effet, les aberrations du nombre de copies (CNA) vont être responsables de 85 % des variations d'expression détectées dans les tumeurs du sein (Curtis *et al.*, 2012; Srihari *et al.*, 2016). Parmi les gènes impliqués dans le développement du cancer du sein les plus touchés par des CNAs, on compte des oncogènes impliqués dans différentes étapes de la signalisation des facteurs de croissance tels que *HER2* (Slamon *et al.*, 1987; Staaf *et al.*, 2011), *EGFR* (Park *et al.*, 2014) et *PIK3CA* (Firoozinia *et al.*, 2014) mais aussi *FOXA1*, un oncogène impliqué dans le remodelage de la chromatine (Kato *et al.*, 2013). Des gènes suppresseurs de tumeur vont également voir leur expression diminuée par des CNAs. Ils peuvent être impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme c'est le cas de *PTEN* (Feilotter *et al.*, 1999) et *RB1* (Bièche et Lidereau, 2000) ou encore dans le remodelage de la chromatine comme par exemple *MLL3* (Rabello *et al.*, 2013).

Le deuxième type d'altérations génétiques qui peut toucher les gènes impliqués dans le développement du cancer du sein est la mutation (Stephens *et al.*, 2012). Ces mutations peuvent toucher les cellules germinales et donc être héréditaires mais elles sont la plupart du temps somatiques et ne se transmettent donc pas à la descendance (Sheikh *et al.*, 2015). Ces mutations peuvent être des mutations non-sens, des mutations faux-sens ou encore des mutations de type *indel* (insertion/délétions). Elles sont principalement observées dans des gènes suppresseurs de tumeurs et résulteront en une perte de fonction du gène (Morganella *et al.*, 2016). On estime que 30 % des cancers du sein sont familiaux et que seulement 10-15 % sont dus à des mutations héréditaires (Laloo et Evans, 2012). Ces mutations héréditaires ont été classées en trois catégories selon les risques de générer un cancer du sein : les gènes de haut risque, de moyen risque et de faible risque. Parmi les gènes de haut risque, on trouve les gènes *BRCA1* et *BRCA2* mais aussi des gènes associés à des syndromes génétiques rares tels que le syndrome de Cowden lié à des mutations dans le gène *PTEN*, le syndrome de Li-Fraumeni causé par des mutations dans le gène *TP53* ou encore le syndrome de Peutz-Jeghers causé par des mutations dans le gène *STK11* (Ellsworth *et al.*, 2010; Stratton et Rahman, 2008). Le nombre de mutations somatiques ainsi que les gènes touchés varient considérablement entre chaque tumeur (Stephens *et al.*, 2012) et il est donc difficile d'établir un profil précis des gènes les plus touchés par ces mutations dans le cancer du sein. Les gènes touchés sont

INTRODUCTION

impliqués dans de nombreux processus cellulaires différents tels que l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, la signalisation des facteurs de croissance ou encore la régulation de la transcription. Parmi la liste impressionnante de gènes retrouvés dans les études, on retrouve principalement *BRCA1/2*, *RB1*, *TP53*, *PTEN*, *AKT1*, *CDH1*, *GATA3* et *PIK3CA* ([The Cancer Genome Atlas Network, 2012](#)).

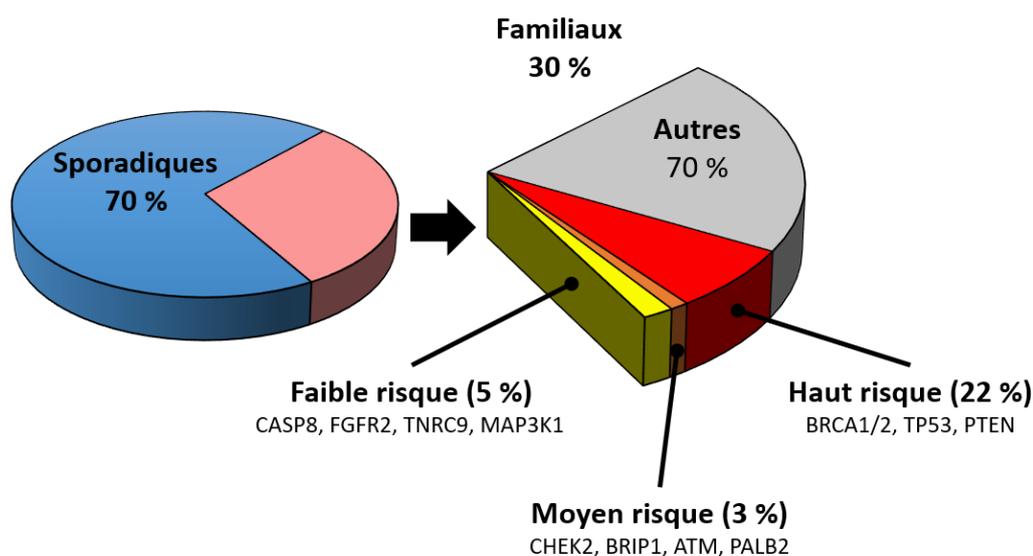


Figure 9 : Les altérations génétiques dans le cancer du sein

La majorité des cas de cancers du sein sont considérés comme sporadiques car ne présentent pas de lien avec une histoire familiale fortement liée au cancer du sein. Une partie des cancers du sein familiaux ont été associés à des gènes dont les altérations génétiques sont synonymes de haut, moyen et bas risque de développer un cancer du sein (adaptée de [Ellsworth et al., 2010](#))

Voici une description des gènes les plus dérégulés dans les cancers du sein selon le rapport le plus récent du Cancer Genome Atlas ([The Cancer Genome Atlas Network, 2012](#)):

- ***BRCA1* et *BRCA2*** : Localisés respectivement en 17q22 et 13q12-13. On estime que 3 à 8 % des cancers du sein sont concernés par les mutations de *BRCA1* et/ou *BRCA2* ([Brody et Biesecker, 1998](#)). *BRCA1* est le premier gène de haut risque à avoir été découvert en 1994 ([Hall et al., 1990](#); [Miki et al., 1994](#)) suivi de *BRCA2* en 1995 ([Wooster et al., 1995, 1994](#)). Une femme porteuse de *BRCA1* muté présente un risque de développer un cancer du sein estimé à 70-80 % contre 50-60 % pour

INTRODUCTION

BRCA2 muté (Roy *et al.*, 2011). Les cancers du sein *BRCA1* et *BRCA2* surviennent chez des femmes plus jeunes que pour les autres cancers du sein (Kuchenbaecker *et al.*, 2017). Ce sont tous les deux des gènes suppresseurs de tumeur qui sont impliqués dans la maintenance de l'intégrité du génome grâce notamment à leur rôle dans la réparation de l'ADN à travers l'exécution de la réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue (O'Donovan et Livingston, 2010). De plus, ils sont impliqués dans le contrôle des points d'accès dans le cycle cellulaire, la régulation de processus mitotiques ou encore l'intégrité de la chromatine (Filippini et Vega, 2013; Kalb *et al.*, 2014). Les cancers du sein *BRCA1* et *BRCA2* sont de mauvais pronostic car peu différenciés et la plupart du temps invasifs (Honrado *et al.*, 2006). Par ailleurs, les mutations *BRCA2* sont plus présentes chez les hommes atteints d'un cancer du sein (Ruddy et Winer, 2013).

- ***PIK3CA*** : Localisé en 3q26. On estime que 8 à 40 % des cancers du sein sont concernés par les mutations de *PIK3CA* (Levine *et al.*, 2005). Ces mutations touchent en grande majorité les exons 9 et 20 du gène codant respectivement pour le domaine hélice et le domaine kinase de la sous unité catalytique p110 α de la kinase PI3K. L'activation de la PI3K est critique pour la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation ou encore la migration cellulaire (Klarenbeek *et al.*, 2013). En effet, cette protéine joue un rôle central dans la signalisation de nombreux facteurs de croissance à travers les voies de l'EGFR, HER2, Met ou encore FGFR (Dirican *et al.*, 2016; P. Liu *et al.*, 2009). Suite aux mutations de *PIK3CA*, l'interaction inhibitrice entre les sous unités p110 α et p85 est bloquée ce qui va provoquer un gain de fonction de la PI3K (Miled *et al.*, 2007). Les mutations *PIK3CA* ont été corrélées avec l'expression des ER et PgR (Pang *et al.*, 2014), et sont synonymes de cancers moins agressifs (Gonzalez-Angulo *et al.*, 2009; Kalinsky *et al.*, 2009; López-Knowles *et al.*, 2014; Pérez-Tenorio *et al.*, 2007).
- ***ERBB2* (ou *HER2*)**: Localisé en 17q12. On estime que 18 à 20 % des cancers du sein sont concernés par une surexpression d'*ERBB2* majoritairement due à une amplification génique (Owens *et al.*, 2004; Slamon *et al.*, 1987). Des mutations activatrices ont été reportées de façon rare (1,6 à 2 %) (Bose *et al.*, 2013; COSMIC, Catalogue of somatic Mutations in Cancer, 2018). *ERBB2* fait partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase EGFR. L'activation des récepteurs tyrosine kinase

INTRODUCTION

est induite par homo- ou hétérodimérisation des récepteurs après fixation de leur ligand. Le récepteur ERBB2 a la particularité d'être « sourd », c'est-à-dire qu'on ne lui connaît pas, à ce jour, de ligands connus. Cependant, il est le partenaire de dimérisation préférentiel pour l'ensemble des récepteurs de la famille EGFR et cette hétérodimérisation avec ERBB2 amplifie grandement la signalisation sous-jacente (Graus-Porta *et al.*, 1997). De plus, la forte concentration en récepteur ERBB2 à la surface des cellules surexprimant celui-ci peut conduire à son homodimérisation indépendamment de la présence de ligand (Schulz *et al.*, 2014). Ainsi, l'activation de l'activité tyrosine kinase d'ERBB2 va mener à l'activation de multiples voies de signalisations sous-jacentes, incluant les voies PI3K/AKT et RAS/RAF/MAPK impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie, l'angiogenèse ou encore l'invasion (Dittrich *et al.*, 2014). HER2 peut également interagir avec d'autres partenaires que les récepteurs de la famille EGFR comme ER ou AR, ce qui pourrait expliquer la résistance à certains traitements dans le cancer du sein (Chia *et al.*, 2011; Giuliano *et al.*, 2013; Naderi et Hughes-Davies, 2008). Les cancers du sein surexprimant ERBB2 sont classés comme sous-type particulier dans la classification moléculaire des cancers du sein et bénéficient de traitements ciblant spécifiquement ERBB2 et ses partenaires (développés dans la partie thérapies du cancer du sein). Les cancers du sein HER2+ sont considérés comme agressifs et sujets à récurrence (Weigelt *et al.*, 2010b).

- **TP53** : Localisé en 17p13. On estime que le gène suppresseur de tumeur *TP53* est altéré dans 20 à 40 % des cancers du sein dépendant de la taille de la tumeur et du grade de la tumeur (Børresen-Dale, 2003). La majorité de ces altérations (environ 70 %) sont des mutations faux-sens (Petitjean *et al.*, 2007). L'implication de *TP53* dans le développement du cancer du sein fut découverte lorsqu'une mutation germinale dans ce gène fut associée au syndrome de Li-Fraumeni (Malkin *et al.*, 1990). Les patients atteints par le syndrome de Li-Fraumeni ont un risque accru de développer plusieurs cancers, le plus fréquent étant le cancer du sein. Cependant, la plupart des altérations de *TP53* observées dans les cancers du sein sont d'origine somatique (Olivier *et al.*, 2006). La protéine codée P53 a pour rôle le maintien de la stabilité génétique de la cellule en réponse à différents stress cellulaires. En effet, en absence de stress, la protéine P53 est dégradée dans la cellule. En

INTRODUCTION

présence de stress cellulaire, son absence de dégradation lui permet de remplir son rôle de facteur de transcription et d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la réparation de l'ADN ou de manière plus générale, un changement de métabolisme, en fonction du contexte cellulaire (Lacroix *et al.*, 2006). Ainsi, une dérégulation du rôle de « gardien du génome » de la protéine P53, par perte de fonction mais aussi gain de fonction, conduit à un développement des cellules cancéreuses (Gasco *et al.*, 2002; Walerych *et al.*, 2012). Les cancers du sein présentant des altérations dans le gène *TP53* sont associés à un mauvais pronostic et semblent être préférentiellement de type hormono-indépendants (Bertheau *et al.*, 2013).

- ***PTEN*** : Localisé en 10q23. On estime que 4 à 60 % des cancers du sein sont concernés par une diminution d'expression du gène suppresseur de tumeur *PTEN* (Iqbal *et al.*, 2012; S. Li *et al.*, 2017). La majorité de ces baisses d'expression est attribuée à la délétion du gène ou encore à des régulations épigénétiques (Bose *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2013). En effet, ce gène n'est retrouvé muté que dans 5 % des cancers du sein ; certaines de ces mutations sont spécifiques du syndrome de Cowden (Kechagioglou *et al.*, 2014). *PTEN* est une phosphatase jouant un rôle dans de nombreux processus cellulaires tels que la croissance, la prolifération, la survie et la maintenance de l'intégrité génomique. Cette protéine a pour fonction la déphosphorylation de PIP3 en PIP2 à la membrane cellulaire, ce qui inhibe l'activation d'AKT et des voies sous-jacentes. Ainsi, une diminution de l'activité de *PTEN* conduit à l'amplification de la voie oncogénique PI3K/AKT (Simpson *et Parsons*, 2001). La baisse d'expression de *PTEN* a été corrélée avec un phénotype agressif de cancer du sein et à la surexpression d'HER2 (Lebok *et al.*, 2015).
- ***MYC*** : localisé en 8q24. On estime qu'environ 15 % des cancers du sein sont concernés par une amplification du gène *MYC* (Deming *et al.*, 2000) et une amplification des niveaux de la protéine correspondante a été reportée dans environ 40 % des cas (Chrzan *et al.*, 2001), indiquant une part importante des régulations transcriptionnelles et traductionnelles. *MYC* est un des facteurs de transcription les plus influents, régulant près de 15 % des gènes humains, et est donc impliqué dans de nombreux processus cellulaires comme la croissance cellulaire, la prolifération, le métabolisme, la différenciation ou encore l'apoptose

INTRODUCTION

(Dang *et al.*, 2006). Celui-ci fonctionne en hétéromère avec son partenaire MAX pour agir comme facteur de transcription sur certaines séquences promotrices (box-E element). Une amplification de *MYC* est synonyme de cancer du sein de mauvais pronostic (Aulmann *et al.*, 2006; Robanus-Maandag *et al.*, 2003).

- **RB1** : Localisé en 13q14. Des aberrations chromosomiques ainsi que des mutations ponctuelles du gène *RB1* ont été reportés pour environ 20 à 30 % des cancers du sein (Bièche et Lidereau, 2000; Bosco et Knudsen, 2007). La protéine RB fonctionne principalement comme cofacteur transcriptionnel en fixant les domaines de transactivation des protéines E2Fs et régule donc le cycle cellulaire. Cependant, RB peut également recruter des facteurs de régulation de la chromatine comme les histones désacétylases ou méthylases pour réprimer l'expression de certains gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose (Iaquinta et Lees, 2007; Morris et Dyson, 2001). Ainsi, dans son état inactif, la protéine RB hypophosphorylée fixe le facteur de transcription E2F et limite l'expression de gènes requis pour la progression du cycle cellulaire. Sa phosphorylation par des kinases dépendant des cyclines va conduire à l'entrée en phase S (Buchkovich *et al.*, 1989). La perte de fonction de RB conduit donc à une amplification du cycle cellulaire (Burkhart et Sage, 2008; Witkiewicz et Knudsen, 2014). Les cancers du sein marqués par une perte de *RB1* sont de mauvais pronostic mais sont aussi associés au sous-type basal-like (Ertel *et al.*, 2010; Herschkowitz *et al.*, 2008).
- **CDH1** : Localisé en 16q22.1. On estime que 80 % des cancers du sein de type lobulaires présentent une perte d'expression d'E-cadhérine, la protéine codée par le gène *CDH1*. Cette perte d'expression a été associée à des mutations, des pertes d'hétérozygotie mais surtout à des régulations épigénétiques telles qu'une hyperméthylation du promoteur de *CDH1* (van der Post *et al.*, 2015; Sarrió *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2015). L'E-cadhérine est une protéine d'adhésion transmembranaire dépendante du calcium. Sa perte d'expression est liée à l'EMT, considérée comme un processus clé de l'agressivité tumorale et de l'invasion cellulaire. Les cancers du sein présentant une perte d'expression de l'E-cadhérine sont la plupart du temps de mauvais pronostic car peu différenciés et invasifs (Horne *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2018).

INTRODUCTION

b. Altérations épigénétiques

Bien que pendant longtemps, la majorité des études portant sur les causes du cancer du sein se soient intéressées aux altérations de la séquence d'ADN, les altérations épigénétiques se sont récemment imposées comme des facteurs clés dans le développement du cancer du sein (Dworkin *et al.*, 2009; Pasculli *et al.*, 2018). Les altérations épigénétiques sont des changements de l'expression génique qui se produisent sans modifications de la séquence d'ADN. Il existe trois types de modifications épigénétiques majeures : la méthylation de l'ADN, la modification des histones et la régulation de l'expression génique par les ARNs non codants (Figure 10).

- La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN correspond à l'ajout d'un groupement méthyl (CH_3) à partir d'une S-adénosylméthionine (SAM) sur les résidus cytosine de la séquence d'ADN. Elle se produit majoritairement dans des régions spécifiques de l'ADN, les îlots CpG, riches en dinucléotides cytosine-phosphate-guanine (CpG). Les DNA méthyltransférases (DNMT) sont les principales enzymes responsables de cette modification épigénétique et on en connaît à ce jour trois ayant une activité méthyltransférase : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B. La méthylation de l'ADN va avoir pour conséquence la régulation de l'expression génique et le maintien de l'intégrité du génome (Dworkin *et al.*, 2009; Lo et Sukumar, 2008; Veeck et Esteller, 2010). En effet, les îlots CpG deviennent hyperméthylés dans les cellules cancéreuses, ce qui a pour conséquence une répression de la transcription de gènes suppresseurs de tumeur, mais ils peuvent également être hypométhylés menant alors à la transcription de gènes normalement réprimés tels que des oncogènes (Jovanovic *et al.*, 2010; Novak *et al.*, 2008). Les analyses à grande échelle du génome, grâce à des techniques telles que des puces Illumina Infinium DNA methylation, permettent de clarifier la distribution génomique et les mécanismes moléculaires spécifiques à la méthylation aberrante de l'ADN dans les cancers du sein (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Ainsi, de nombreuses études ont démontré l'hyperméthylation de promoteurs de gènes ayant des rôles cruciaux dans de nombreux processus cellulaires. On peut citer le gène *CCND2* dans la régulation du cycle cellulaire (Evron *et al.*, 2001), *BRCA1* dans la réparation de l'ADN (Dobrovic et Simpfendorfer, 1997), *BCL2* dans l'apoptose (Loginov *et al.*, 2017), ou encore *TWIST* dans l'invasion et la métastase (Fackler *et al.*, 2003). Cependant, l'hypométhylation de l'ADN est bien plus fréquente que

INTRODUCTION

l'hyperméthylation dans le cancer du sein (trois à cinq fois) (Ruike *et al.*, 2010). Parmi les gènes touchés par une hypométhylation dans le cancer du sein, on peut citer : le gène *FEN1* dans la réparation de l'ADN et l'apoptose (Singh *et al.*, 2008), le gène *CDH3* dans l'invasion (Paredes *et al.*, 2005) ou encore le gène *IL10* dans l'immunité (Son *et al.*, 2010). L'étude des profils de méthylation de l'ADN ouvre de nombreuses perspectives dans l'amélioration de la prise en charge du cancer du sein. En effet, la méthylation de l'ADN se révèle être un bon outil pronostique car de plus en plus d'études montrent une corrélation entre les niveaux de méthylation et le phénotype des cancers du sein. Ainsi, une hypométhylation de l'ADN serait synonyme d'un phénotype basal et agressif de cancer du sein tandis qu'une hyperméthylation a été corrélée au sous-type luminal B (Holm *et al.*, 2010; Stefansson *et al.*, 2015; The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Par ailleurs, il a été montré que 13 à 40 % des cancers du sein sporadiques présentaient une hyperméthylation du promoteur du gène *BRCA1* et que cette hyperméthylation était synonyme de cancer agressif (Esteller *et al.*, 2000; Parrella *et al.*, 2004; Stefansson *et al.*, 2011; Turner *et al.*, 2007). La méthylation de l'ADN peut être ciblée par des traitements spécifiques, les inhibiteurs de DNMT (DNMTi). Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN (Azacytidine, Decitabine et Hydralazine) inhibent les DNMTs en formant un pont covalent avec l'enzyme après incorporation dans l'ADN. Dans le cancer du sein, ils ont montré une activité antitumorale dans des essais précliniques (Lustberg et Ramaswamy, 2011). Cependant, leur bénéfice clinique reste à démontrer et ces inhibiteurs sont actuellement en phase d'essais cliniques (Arce *et al.*, 2006; Connolly *et al.*, 2017).

- **Les modifications d'histones**

Les histones sont des protéines nucléaires associées à l'ADN responsables de la structure de la chromatine et jouent un rôle important dans la régulation de l'expression génique. En effet, la chromatine peut être trouvée en deux états : l'hétérochromatine (fermée) qui ne permet pas la transcription des gènes, et l'euchromatine (ouverte) qui permet la transcription des gènes. Des modifications post-traductionnelles peuvent toucher les histones ce qui affectera la transcription des gènes en déstabilisant la structure de la chromatine et l'accès aux régulateurs transcriptionnels. Ces modifications peuvent être des acétylations, des méthylations, des phosphorylations, des sumoylations ou encore des ubiquitinations (Cortez et Jones, 2008; Kornberg, 1974; Luger *et al.*, 2012). A ce jour, plus de 60 sites de modification ont été identifiés dans les histones (Tan *et al.*, 2011). Les principales

INTRODUCTION

modifications d'histones impliquées et étudiées dans le cancer du sein sont l'acétylation et la méthylation. L'acétylation correspond au transfert d'un groupement acétyle à partir de l'acétyl-CoA sur un groupement amine de résidus lysine. Cette modification va altérer la structure de la chromatine en neutralisant les charges positives des histones ce qui induira une structure d'euchromatine mais l'acétylation des histones peut également être reconnue par des protéines spécifiques contenant un bromodomaine (Mujtaba *et al.*, 2007; Tropberger *et Schneider*, 2010). L'ajout de groupements acétyle est catalysé par les Histone acétyle transférases (HATs) et le processus inverse par les Histone déacétylases (HDACs). La méthylation correspond à l'ajout d'un ou plusieurs groupements méthyle (mono-, di- ou triméthylation) sur les résidus arginine ou lysine de l'histone. L'ajout de groupements méthyle sur les histones est catalysé par les histones méthyltransférases (HMTs) et le processus inverse par les histones déméthylases (HDMTs). Contrairement à l'acétylation, la méthylation des histones peut être associée à la fois à l'euchromatine et à l'hétérochromatine, dépendant de l'acide aminé touché par la modification. Ainsi, la mono- ou triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me1 ou H3K4me3) et la triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me3) sont associées à l'euchromatine (Heintzman *et al.*, 2007, 2009) tandis que la triméthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 (H3K9me3 et H3K27me3) est associée aux régions d'hétérochromatine (Kouzarides, 2007). Dans le cancer du sein, plusieurs études ont montré que, d'une manière globale, la diminution des modifications d'histones était spécifique des cancers du sein et que plus les niveaux de ces modifications étaient faibles, plus le cancer était de mauvais pronostic et de phénotype basal (Elsheikh *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2016). Certaines marques ont d'ailleurs été associées au processus métastatique comme la marque H3K4me3 (Messier *et al.*, 2016). Concernant les enzymes impliquées dans la mise en place de ces marques, certaines études ont également montré l'importance de leur régulation vis-à-vis de la progression et du sous-type tumoral. Par exemple, l'histone acétyl-transférase HMOF voit son expression diminuée dans le cancer du sein (Arun *et al.*, 2016) tandis que l'augmentation d'expression de l'histone déméthylase LSD1 et des HDAC2 et 3 a été corrélée à un phénotype plus agressif de cancer du sein (Lim *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2013). Au vu de ces observations, des thérapies ciblant les modifications d'histone ont été étudiées dans le cancer du sein, en particulier des inhibiteurs d'histone déacétylases. Ces inhibiteurs ont démontré des activités antitumorales en études précliniques et sont en cours d'essais cliniques (Damaskos *et al.*, 2017). Les résultats les plus prometteurs

INTRODUCTION

ont été obtenus avec l'Entinostat en combinaison avec l'Exemestane qui a permis une augmentation de la survie globale en phase II menant à la poursuite en phase III (E2112, NCT02115282) actuellement en cours ([Yardley et al., 2013](#)).

- **Les ARNs non codants**

On classe les ARNs non codants en deux catégories en fonction de leur taille : les petits ARNs non codants ont une taille inférieure à 200 nucléotides tandis que les longs ARNs non codants sont supérieurs à 200 nucléotides et peuvent atteindre jusqu'à 100 kb. Parmi ces deux catégories, il existe de nombreux ARNs non codants de fonctions diverses. Certains sont essentiels pour la machinerie cellulaire classique comme les ARNs ribosomiaux (rRNAs), les ARN de transfert (tRNAs) ou les petits ARN nucléaires (snRNAs). D'autres font office de molécules régulatrices comme les petits ARNs interférant (siRNAs), les microARNs (miRNAs) ou encore les longs ARNs non codant (lncRNAs) ([Di Leva et al., 2014](#); [Gupta et Tripathi, 2017](#); [Patil et al., 2014](#); [Sandhu et al., 2016](#)). En particulier, les miRNAs et les lncRNAs sont maintenant considérés comme des facteurs majeurs de la régulation épigénétique dont les aberrations ont de sévères conséquences sur l'ensemble des étapes de la cancérogénèse ([Piao et Ma, 2012](#)). Il a été observé une diminution globale de l'expression des miRNAs dans les cancers ([Lu et al., 2005](#)) et une surexpression des lncRNAs ([Gupta et Tripathi, 2017](#)) comparé aux tissus sains. Les causes de ces dérégulations dans le cancer sont nombreuses et peuvent être d'origine génétiques (délétions/insertions, mutations) ou épigénétiques. En effet, les études à large échelle dans plusieurs types de cancers ont révélé que plus de 80 % des mutations étaient observées dans des régions non codantes du génome ([Cheetham et al., 2013](#)). Une étude de [Calin et al.](#), a montré que plus de la moitié des miRNAs qu'ils avaient étudié étaient situés dans des régions génomiques fréquemment altérées dans les cancers ([Calin et al., 2004](#)). De plus, il a été montré que l'hyperméthylation des promoteurs d'ARNs non codants était plus fréquente que celle des promoteurs de gènes codant pour des protéines dans les cancers du sein ([Li et al., 2015](#)).

Les miRNAs sont définis comme de petits ARNs non codants (compris entre 18 et 25 nucléotides) dont les séquences sont très conservées et qui vont conduire à la dégradation ou l'inhibition de la traduction *via* la reconnaissance imparfaite des séquences des ARNs messagers. Avant de pouvoir être actif, les miRNAs suivent un processus de maturation complexe qui commence dans le noyau pour finir dans le cytoplasme où ils vont être pris en

INTRODUCTION

charge par les protéines Argonautes, formant alors le complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) (Schwarz *et al.*, 2003). Plusieurs miRNAs ont été mis en évidence comme étant dérégulés dans le cancer du sein et certains auteurs ont d'ailleurs défini des signatures de miRNAs spécifiques du cancer du sein (Iorio *et al.*, 2005) voire même spécifiques des sous-types moléculaires de cancer du sein (de Rinaldis *et al.*, 2013). Les miRNAs peuvent réguler de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, l'apoptose, l'inflammation, l'angiogenèse ou encore l'invasion. Parmi les miRNAs dérégulés dans le cancer du sein, on peut citer le miR-21 dont la surexpression a pour conséquence une augmentation de la croissance tumorale et une inhibition de l'apoptose notamment *via* le ciblage de *PTEN* (Di Leva *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2007; Si *et al.*, 2007). D'autres ont été spécifiquement corrélé au processus métastatique comme c'est le cas du miR-373 et du miR-520c (Huang *et al.*, 2008). De plus, les miRNAs se définissent de plus en plus comme des outils prometteurs pour l'amélioration de la prise en charge des patients atteints par un cancer du sein. Les miRNAs circulants dans le sérum et le plasma ont par exemple été proposés comme marqueurs diagnostiques du cancer du sein (Chan *et al.*, 2013; Heneghan *et al.*, 2010). Certains miRNAs se sont également imposés comme marqueurs pronostiques du cancer du sein comme le miR-21 dont l'augmentation d'expression a été corrélée à un grade histologique élevé et une baisse de survie globale (Markou *et al.*, 2014).

Les longs ARNs non codants représentent la plus grande famille d'ARNs non codants (Djebali *et al.*, 2012). La plupart des lncRNAs sont transcrits par l'ARN polymérase 2 puis subissent des modifications co- et post-transcriptionnelles afin d'acquérir leur fonction. En effet, contrairement aux miRNAs dont la fonction est assurée par la reconnaissance de séquences d'ARNm due à leur séquence primaire, les longs ARNs non codant sont capables de se replier pour former des structures secondaires et tertiaires leur permettant d'interagir avec d'autres molécules et d'assurer leurs fonctions (Cheetham *et al.*, 2013; Huarte, 2015). Les fonctions assurées par les lncRNAs ont un impact sur l'ensemble des processus cellulaires car ils sont impliqués dans le remodelage de la chromatine, l'épissage alternatif ou encore la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes. Tout comme les miRNAs, les lncRNAs sont dérégulés dans le cancer du sein (W. Zhao *et al.*, 2014). On peut citer l'exemple du lncRNA HOTAIR (*HOX Transcript Antisense RNA*) dérégulé dans le cancer du sein où il est surexprimé par rapport aux tissus sains et serait pronostique de la présence de métastase

INTRODUCTION

(Gupta *et al.*, 2010; Sørensen *et al.*, 2013). HOTAIR est impliqué dans le remodelage de la chromatine et va conduire au recrutement du complexe PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) au niveau de promoteurs de gènes inhibant la progression tumorale comme HOXD10 ce qui aura pour conséquence une inhibition de la transcription de ces gènes suppresseurs de tumeur.

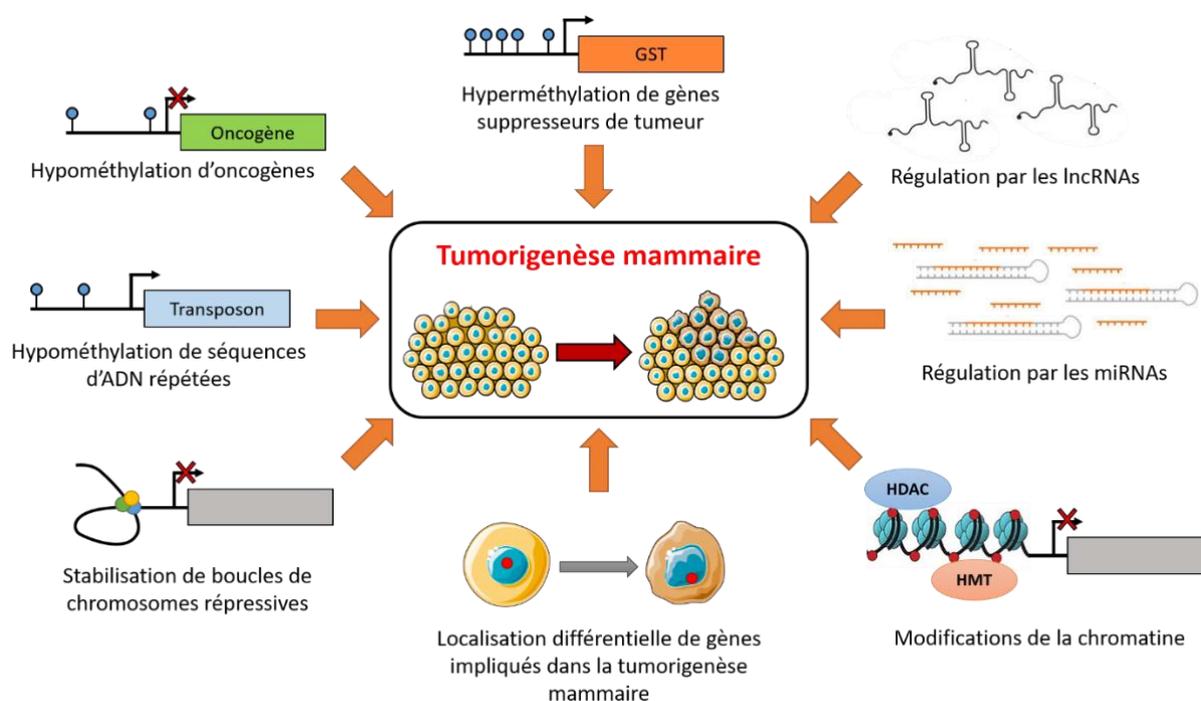


Figure 10 : Les altérations épigénétiques dans le cancer du sein

De nombreuses altérations épigénétiques peuvent participer à la tumorigenèse mammaire en modulant l'expression de gènes clés à travers la méthylation de l'ADN, la modulation de la chromatine ou encore les ARNs non codant. GST : Gène suppresseur de tumeur ; lncRNA : long non coding RNA ; miRNA : micro RNA. (adaptée de Karsli-Ceppioglu *et al.*, 2014).

De la même manière, le lncRNA MALAT1 (*Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*) a été décrit comme surexprimé dans les cancers du sein, d'autant plus dans les métastases en résultant. MALAT1 favoriserait la transcription et l'épissage de gènes protumoraux codant pour des protéines telles que des intégrines ou des protéines de la matrice extracellulaire (Arun *et al.*, 2016). Les lncRNAs peuvent aussi être retrouvés dans les fluides corporels comme le lncRNA RP11-445H22.4 dont la détection dans le sérum a été significativement corrélée avec les patientes atteintes d'un cancer du sein (Xu *et al.*, 2015). Une étude récente a permis de définir des profils d'expression de lncRNAs spécifiques des sous-types moléculaires des cancers du sein. Ainsi, le lncRNA H19, impliqué dans l'EMT et la

INTRODUCTION

régulation de différents miRNAs, serait spécifique des cancers du sein luminal A (Berteaux *et al.*, 2008; Van Grembergen *et al.*, 2016). Par ailleurs, certains lncRNAs ont été défini comme des marqueurs prédictifs de la réponse aux thérapies comme par exemple BCAR4 (*Breast Cancer Anti-Estrogen Resistance 4*) qui a été associé à une faible réponse au Tamoxifène *via* l'activation des récepteurs HER2 et HER3 (Godinho *et al.*, 2010). L'ensemble de ces études laisse à penser que le ciblage des lncRNAs peut être un outil thérapeutique prometteur et de nombreux outils sont d'ailleurs à l'étude afin de réprimer l'expression de certains lncRNAs (Arun *et al.*, 2018). Le lncRNA MALAT1 a par exemple était efficacement réprimé par l'utilisation d'oligonucléotides antisens (ASOs) dans un modèle de souris formant des carcinomes mammaires et cette inhibition a eu pour conséquence une croissance tumorale réduite ainsi qu'une diminution de la formation de métastases (Arun *et al.*, 2016).

c. Microenvironnement tumoral

Les cellules cancéreuses sont influencées par des régulateurs paracrines du stroma environnant. La participation de cette régulation environnante pourrait même être aussi importante dans le comportement tumoral que les altérations des oncogènes et suppresseurs de tumeurs se produisant au sein des cellules tumorales car ces altérations sont fortement influencées par les molécules de la matrice extracellulaire ou par les cellules environnantes elles-mêmes (Liotta *et al.*, 1991). De nombreuses études ont montré l'importance du stroma entourant les cellules cancéreuses dans la tumorigenèse mammaire notamment en mettant en avant les modifications épigénétiques et génétiques touchant ces cellules environnantes. En effet, le rôle de « complice » du microenvironnement tumoral a été démontré dans l'ensemble des étapes de la tumorigenèse mammaire, que ce soit dans l'initiation, la progression ou la métastase. De plus, le microenvironnement tumoral mammaire va participer à plusieurs niveaux de localisation que ce soit au niveau local (intratumoral), régional (dans le sein) ou distant (métastatique). Ce microenvironnement tumoral est constitué d'une matrice extracellulaire (MEC) spécifique et de nombreux types cellulaires différents tels que des fibroblastes, des cellules nerveuses, des cellules adipeuses, des cellules immunitaires et inflammatoires mais aussi des cellules des réseaux sanguins et lymphatiques (Chen *et al.*, 2015; Coleman *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2017). La Figure 11 montre les interactions complexes qui peuvent exister entre ces différents types cellulaires pour

INTRODUCTION

participer à la croissance tumorale, certaines de ces signalisations seront développées par la suite.

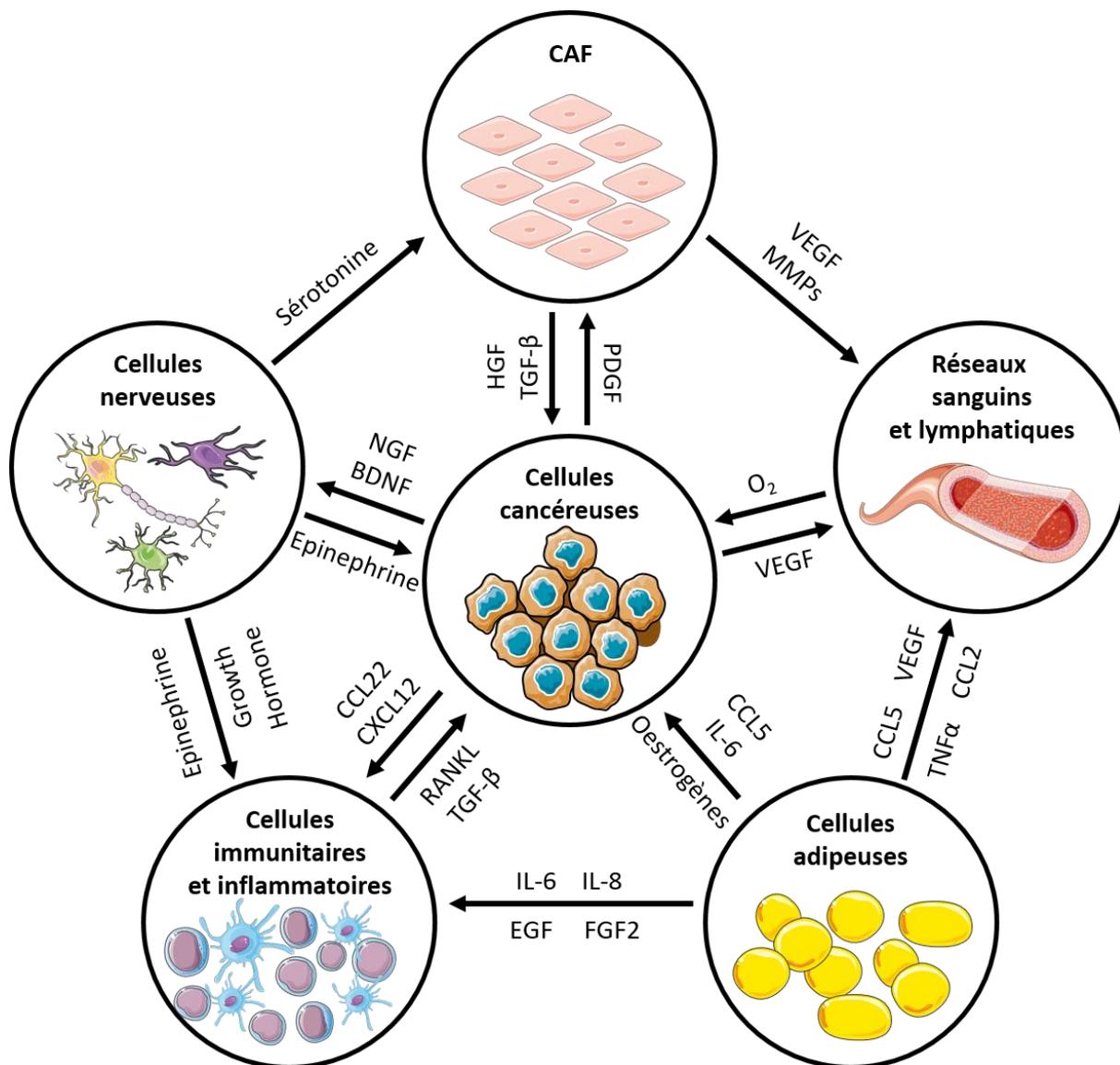


Figure 11 : Le microenvironnement tumoral du cancer du sein

Durant toutes les étapes de la carcinogenèse mammaire, un dialogue complexe se forme entre les cellules cancéreuses et de nombreux types cellulaires présents dans la glande mammaire, via la production de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance. Une partie de ces connexions est représentée dans ce schéma (adaptée de Wang et al., 2017).

Il faut cependant tout d'abord souligner que le microenvironnement tumoral a été montré comme ayant un rôle protecteur de la tumorigenèse et de l'invasion lorsqu'il est dans un état sain. En effet, la communication entre les cellules stromales et épithéliales est

INTRODUCTION

essentielle pour le développement et la différenciation normale de la glande mammaire. Le stroma maintient notamment la polarité des cellules épithéliales et inhibe la croissance cellulaire incontrôlée et la transformation tumorale (Folgueira *et al.*, 2013; Inman *et al.*, 2015; Martins et Schmitt, 2018). Par exemple, les cellules myoépithéliales saines sont reconnues comme des suppresseurs de tumeurs naturels grâce à leur production de membrane basale et leur rôle de barrière physique autour des cellules épithéliales (Barsky et Karlin, 2005). De plus, les cellules myoépithéliales de tissus sains expriment une forte proportion de facteurs inhibiteurs de l'angiogenèse et de l'invasion comparée aux mêmes cellules dans un environnement tumoral. Ces observations illustrent parfaitement les changements d'expression génique qui peuvent se produire dans le microenvironnement tumoral et leur importance dans la tumorigenèse mammaire.

Certaines études ont d'ailleurs étudié les changements d'expression génique entre tissus sain et tumoral en fonction des différents types de cellules et ont pu montrer que le plus grand nombre de gènes dérégulés était trouvé dans les cellules myoépithéliales. Parmi ces gènes dérégulés, les plus surexprimés codent pour les chimiokines CXCL14 et CXCL12 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand 4 et 12*) (Allinen *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2009). Ces chimiokines se fixent sur le récepteur CXCR4 (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 4*) des cellules cancéreuses menant à leur prolifération et leur migration. On estime que ces altérations d'expression dans les cellules du stroma sont principalement dues à des altérations épigénétiques car aucune altération génétique n'a été mise en évidence dans les cellules du microenvironnement tumoral (Qiu *et al.*, 2008). De plus, des changements significatifs dans les profils de méthylation de l'ADN des cellules stromales ont été mis en évidence (Fiegl *et al.*, 2006). La majorité des gènes concernés par ces changements de méthylation codent pour des facteurs de transcription essentiels au développement et à la différenciation. Au vu de ces changements d'expressions significatifs, des panels de gènes dérégulés dans le microenvironnement tumoral se distinguent par leur pouvoir pronostique et prédictif dans le cancer du sein. Finak et ses collègues ont par exemple défini un panel de 26 gènes prédictifs de la survie clinique, indépendamment du sous-type de cancer, en comparant les profils d'expression génique du microenvironnement tumoral de différents patients atteints de cancers du sein (Finak *et al.*, 2008). Plus récemment, une signature basée sur la signalisation du PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) stromal a permis d'identifier que les cellules

INTRODUCTION

possédant cette signature étaient de haut grade et de mauvais pronostic (Frings *et al.*, 2013). Un panel de gènes du microenvironnement tumoral prédictif de la réponse à la chimiothérapie a également été identifié par l'équipe de Farmer (Farmer *et al.*, 2009). Le microenvironnement tumoral est d'ailleurs impliqué dans la résistance aux thérapies du cancer du sein notamment dans la résistance au tamoxifène *via* l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK/ERK par les CAFs (Qiao *et al.*, 2016). Ces résultats confirment encore que le microenvironnement tumoral influence la progression tumorale et la survie des patients et que la « normalisation » de celui-ci pourrait être un atout significatif dans la prise en charge des tumeurs de sein. Pour le moment, les thérapies visant à normaliser le microenvironnement tumoral restent focalisées sur l'utilisation d'inhibiteurs de modifications épigénétiques tels que le 5-Azacytidine (McCuaig *et al.*, 2017; Place *et al.*, 2011).

Le type cellulaire le plus abondamment présent dans le microenvironnement tumoral mammaire est le fibroblaste, que l'on appellera alors CAF (*Cancer-Associated Fibroblast*). Cette sous-population cellulaire va participer à la tumorigenèse mammaire *via* la sécrétion de différents facteurs de croissance, de cytokines, de chimiokines et la dégradation de la matrice extracellulaire (Buchsbbaum *et Oh*, 2016; Tao *et al.*, 2017). Plusieurs hypothèses existent pour expliquer leur origine dans le microenvironnement tumoral incluant le recrutement au niveau du microenvironnement tumoral de cellules dérivées de la moelle osseuse (Direkze *et al.*, 2006), une transition épithélio-mésenchymateuse de cellules cancéreuses ou de cellules du tissu mammaire comme les péricytes, les adipocytes ou les cellules musculaires lisses (Orimo *et Weinberg*, 2007; Radisky *et Radisky*, 2007), ou encore la transformation de fibroblastes normaux suite aux signaux émis par les cellules cancéreuses (Kalluri *et Zeisberg*, 2006). Cette dernière hypothèse semble expliquer l'émergence de la plupart des CAFs notamment *via* l'envoi de signaux épigénétiques par les cellules cancéreuses. Il a par exemple été montré que les cellules cancéreuses étaient capables d'induire la sécrétion d'HGF et la baisse d'expression de cavéolin-1 dans des fibroblastes normaux, les transformant ainsi en CAFs (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2010; Tyan *et al.*, 2011). D'une manière générale, les CAFs se distinguent des autres fibroblastes par une forte expression de facteurs de croissance (FGFs, HGF, TGF- β), de cytokines (GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) et EPR-1 (*Effector Cell Protease Receptor 1*)), des protéines du cytosquelette (α -SMA), des protéines de la matrice extracellulaire (tenascin-C et laminines), , mais aussi d'autres molécules impliquées

INTRODUCTION

dans le cycle cellulaire, les interactions entre cellules et la dégradation de la matrice extracellulaire (McCuaig *et al.*, 2017). Ainsi, les CAFs vont permettre le développement tumoral mammaire à travers de nombreux mécanismes cellulaires tels que l'induction de l'EMT, la régulation du cycle cellulaire, l'inflammation, l'angiogenèse, la métastase ou encore la résistance aux thérapies (Buchsbaum et Oh, 2016; Tao *et al.*, 2017; Xing *et al.*, 2010). Par exemple, il a été montré que les CAFs augmentaient l'invasion cellulaire *via* une dégradation active de la matrice extracellulaire permise par l'expression de molécules diverses telles que la palladine ou certaines MMPs (Brentnall *et al.*, 2012). De la même manière, la sécrétion de périostine (POSTN) par les CAFs semble être un élément essentiel pour la colonisation de niches métastatiques distantes par des cellules cancéreuses (Malanchi *et al.*, 2012). Enfin, il a été montré que la sécrétion d'HGF par les CAFs était un acteur majeur de la résistance aux thérapies, notamment le tamoxifène, *via* l'induction des voies des MAPK et PI3K/AKT (Shekhar *et al.*, 2007). Certaines équipes ont développé des stratégies cliniques basées sur le ciblage spécifique des CAFs telles qu'un vaccin ciblant la protéine FAP (*Fibroblast Activation Protein*) (Loeffler *et al.*, 2006) ou encore la restauration des fonctions de la cavéolin-1 par l'utilisation de peptides mimétiques (Mercier *et al.*, 2008), mais ces résultats encourageants restent préliminaires.

Le système immunitaire peut également jouer un rôle majeur dans la tumorigenèse mammaire. En effet, les cellules immunitaires et inflammatoires telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes ou les macrophages peuvent, tout comme les fibroblastes, être corrompus pour acquérir des capacités tumorigènes (Nowarski *et al.*, 2013; Shalpour et Karin, 2015). En condition normale, les cellules dendritiques jouent un rôle important dans l'induction des réponses anti-tumorales grâce à leur capacité de présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4+ et CD8+ (da Cunha *et al.*, 2014). Cependant, cette capacité nécessite une certaine maturation des cellules dendritiques et le microenvironnement tumoral contient une forte proportion de cellules dendritiques immatures incapables de stimuler l'immunité antitumorale. De plus, les cellules dendritiques immatures détectées dans le microenvironnement tumoral produisent des facteurs proangiogéniques (VEGF, IL-8...) et augmentent la migration des cellules endothéliales (Fainaru *et al.*, 2010; Huarte *et al.*, 2008). Les lymphocytes, et notamment les lymphocytes T qui correspondent à la majorité des lymphocytes infiltrant la tumeur, peuvent également bloquer la réponse antitumorale (Allen

INTRODUCTION

et Louise Jones, 2011). Ils sont recrutés au niveau du site tumorale par les chimiokines CCL22/CCR4, CXCL12/CXCR4 et CCL5 (RANTES)/CCR1 (Gobert *et al.*, 2009). Les lymphocytes T régulateurs exprimant FOXP3 (*Forkhead Box P3*) sont par exemple capables d'inactiver les cellules T CD8+, les cellules NK ou encore les lymphocytes B (Shevach, 2009). De plus, les lymphocytes T régulateurs sécrètent une grande quantité de RANKL (*Receptor Activator Of Nuclear Factor Kappa B Ligand*) qui va alors activer les cellules tumorales mammaires exprimant le récepteur RANK et promouvoir les métastases au poumon (W. Tan *et al.*, 2011). Il a par ailleurs été montré que le tamoxifène pouvait induire l'expression de FOXP3 dans les lymphocytes T régulateurs infiltrant la tumeur, ce qui pourrait être un mécanisme de résistance à la drogue (Joffroy *et al.*, 2010). Les macrophages associés au microenvironnement tumoral, appelés les TAMs (*Tumor-Associated Macrophages*) constituent une population cellulaire particulièrement importante dans le cancer du sein et arborent un phénotype typique qui va promouvoir la croissance tumorale, le remodelage tissulaire, l'angiogenèse mais aussi la suppression de l'immunité adaptative (Candido et Hagemann, 2013). Ils sont recrutés au niveau du site tumoral par des chimiokines tels que CCL2 et vont à leur tour permettre la survie, la dissémination des cellules cancéreuses et l'angiogenèse par la sécrétion d'IL-10, CCL17, CCL18, CCL22 et de TGF- β (Lin *et al.*, 2015; Solinas *et al.*, 2009).

Bien que tortueux et peu efficaces par rapport à leurs homologues sains, les réseaux lymphatiques et sanguins du microenvironnement tumoral sont en constante croissance dans la tumeur, notamment *via* l'angiogenèse, et assurent des rôles majeurs dans la croissance tumorale. En effet, ces réseaux et leurs cellules associées, telles que les cellules endothéliales et les péricytes, vont avoir pour fonctions principales d'éviter l'hypoxie tumorale, d'alimenter la tumeur en nutriments et facteurs divers, de prendre en charge les déchets métaboliques, d'aider les cellules tumorales à échapper à l'immunité anti-tumorale en amenant les cellules spécifiques telles que les cellules dendritiques précédemment décrites, ou encore de permettre la métastase (Wang *et al.*, 2017). Ainsi, la communication entre péricytes et cellules endothéliales est un aspect très important de la vascularisation tumorale et implique la voie de signalisation du PDGF- β . Les cellules endothéliales activées produisent le PDGF- β pour recruter les péricytes exprimant les récepteurs au PDGF- β . En retour, les péricytes vont contribuer à la stabilisation et à la survie des cellules endothéliales formant les nouveaux vaisseaux en sécrétant des facteurs trophiques tels que le VEGF et Ang-1 (*Angiopoietin 1*)

INTRODUCTION

(Birbrair *et al.*, 2014; Hellström *et al.*, 1999; Sundberg *et al.*, 2002). Il semblerait que l'augmentation du nombre de péricytes favorise la croissance tumorale en fournissant un réseau sanguin stable dans le microenvironnement tumoral mais aussi que la désorganisation des vaisseaux et la diminution des péricytes favorisent la métastase, montrant le rôle complexe de ces cellules dans la tumorigenèse mammaire (Ribeiro *et Okamoto*, 2015).

Le concept affirmant que les cellules adipeuses participent à la tumorigenèse est maintenant appelé « adiponcose » (Bifulco *et Pisanti*, 2013). Ainsi, les cellules adipeuses vont participer à la tumorigenèse mammaire en sécrétant de nombreuses cytokines, chimiokines et hormones comme par exemple CCL5 qui induit la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires (D'Esposito *et al.*, 2016) ou encore la leptine et IL-6 favorisant l'EMT et l'activation des voies des CSCs (Wolfson *et al.*, 2015). De plus, un microenvironnement tumoral riche en tissus adipeux fournit un environnement proinflammatoire favorable au développement de la tumeur (Fukumura *et al.*, 2016; Goodwin *et Stambolic*, 2015). De façon intéressante, l'aromatase est fortement liée aux marqueurs des cellules adipeuses dans les cancers du sein post-ménopause. En effet, la majorité des cancers du sein post-ménopause sont hormono-dépendants et expriment donc ER. Or, la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par les cellules adipeuses stimule l'expression d'aromatase qui va convertir les androgènes en oestrogènes favorisant donc la voie de signalisation de cette hormone (Wang *et al.*, 2015). Tous ces éléments justifient que l'obésité soit classée comme facteur de risque du cancer du sein.

Le dernier type cellulaire pouvant jouer un rôle important dans le microenvironnement tumoral est la cellule du système nerveux. En effet, la tumeur peut être favorisée à la fois par des fibres nerveuses infiltrant la tumeur (Huang *et al.*, 2014; C.-M. Zhao *et al.*, 2014), mais aussi par des cellules nerveuses circulantes appelées cellules neuroendocriniennes (Ayala *et al.*, 2008). Par exemple, notre équipe a mis en évidence que les cellules cancéreuses mammaires sécrètent des neurotrophines (NGF (*Nerve Growth Factor*), BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) et NT-4/5 (*Neurotrophin 4/5*)) de façon autocrine, favorisant l'innervation de la tumeur ainsi que la prolifération, la survie et la migration/invasion (Adriaenssens *et al.*, 2008; Demont *et al.*, 2012; Descamps *et al.*, 2001b; Dollé *et al.*, 2004; Hondermarck, 2012). Les neurotrophines montrent d'ailleurs un intérêt thérapeutique car l'utilisation d'anticorps bloquants anti-neurotrophines mène à une réduction significative des

INTRODUCTION

tumeurs mammaires dans un modèle de xénogreffe ([Adriaenssens et al., 2008](#)). Les fibres nerveuses infiltrant la tumeur mammaire vont en retour sécréter des neuropeptides et des neurotransmetteurs tels que la norépinéphrine et l'épinéphrine ou encore la substance P qui vont favoriser la croissance et la métastase des cellules cancéreuses mammaires ([Entschladen et al., 2004](#); [Garcia-Recio et al., 2013](#); [Lüthy et al., 2009](#)).

L'ensemble de ces données démontre le rôle de « complice » du microenvironnement tumoral pour participer à la progression tumorale. Cependant, le microenvironnement tumoral peut également jouer un rôle protecteur et inhiber la progression tumorale. En effet, les travaux de notre laboratoire ont permis de montrer que les cellules épithéliales normales de sein peuvent induire l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires *via* deux mécanismes différents selon les sous-types moléculaires de cancer du sein : une apoptose dépendante de p53 et un arrêt du cycle indépendant de p53 ([Toillon et al., 2002](#)). Une analyse protéomique du milieu conditionné de cellules épithéliales mammaires normales a permis d'identifier l'IGFBP-3 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3*) et la maspin comme les facteurs pro-apoptotiques responsables de cette apoptose des cellules cancéreuses mammaires ([Toillon et al., 2007](#)).

4. Le cancer du sein : un terme, plusieurs entités

Bien que l'on qualifie la maladie par un singulier, le cancer du sein représente plutôt un ensemble hétérogène de tumeurs définies par différentes caractéristiques cliniques, évolutions et réponses aux traitements. En effet, le cancer du sein est marqué par une hétérogénéité à la fois inter-tumorale mais aussi intra-tumorale. Cette hétérogénéité est visible à tous les niveaux que ce soit histologique, clinique, génétique ou épigénétique. Comprendre cette hétérogénéité est critique pour le développement de nouveaux outils thérapeutiques efficaces ([Polyak, 2007](#)).

a. Théories à l'origine de l'hétérogénéité cellulaire du cancer du sein

Il est maintenant admis que des altérations génétiques, épigénétiques et l'influence du microenvironnement tumoral sont à l'origine de la tumorigenèse mammaire. Cependant, une controverse demeure quant à l'origine de l'hétérogénéité cellulaire du cancer du sein, sa progression et ses différentes résistances thérapeutiques ([Shackleton et al., 2009](#)). Actuellement, deux modèles compétitifs existent : le modèle hiérarchique ou modèle des

INTRODUCTION

cellules souches cancéreuses (CSCs), et le modèle stochastique ou modèle d'évolution clonale (Figure 12). Le modèle CSC suggère que la croissance et la progression du cancer est conduit par une petite population de cellules souches cancéreuses et que la tumeur n'est en réalité qu'une caricature du développement tissulaire normal où les cellules souches maintiennent une hiérarchie normale du tissu (Dick, 2008). Les CSCs sont donc au sommet du développement tumoral, seules capables de se renouveler et de se différencier en cellules cancéreuses non souches. De l'autre côté, le modèle d'évolution clonale suggère que n'importe quelle cellule normale peut acquérir des capacités tumorales et que n'importe quelle cellule tumorale ayant un avantage sélectif peut promouvoir la progression tumorale (Polyak, 2007). Les deux modèles expliquent ainsi différemment l'hétérogénéité tumorale mais également l'émergence des résistances thérapeutiques. Les CSCs sont à l'origine plus résistantes dans le modèle hiérarchique tandis que dans le modèle stochastique, la thérapie va conduire à la sélection de clones résistants. Pour autant, il semblerait que ces deux modèles ne soient pas mutuellement exclusifs et s'appliquent dans l'ensemble des cancers y compris le cancer du sein. En effet, de nombreuses études récentes prônent l'émergence d'un nouveau modèle réconciliant les deux précédents. Ce modèle, appelé le modèle CSC plastique, avance l'existence d'une plasticité cellulaire importante permettant aux cellules cancéreuses non souches de se dédifférencier et d'acquérir certaines capacités souches (Chaffer *et al.*, 2011; Iliopoulos *et al.*, 2011; Marjanovic *et al.*, 2013). Ainsi, une expression transitoire de TWIST induit un phénotype de cellule souche dans plusieurs lignées cellulaires de sein (Vesuna *et al.*, 2009), l'EMT conduit à l'apparition de CSCs (Morel *et al.*, 2008) ou encore la sécrétion d'IL6 permet la transformation de cellules non souches cancéreuses en cellules souches cancéreuses (Iliopoulos *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). Dans tous les cas, il est important de réussir à déterminer quel modèle est corrélé avec le comportement clinique de la tumeur afin de pouvoir cibler efficacement les populations cellulaires les plus abondantes et éviter les récurrences.

INTRODUCTION

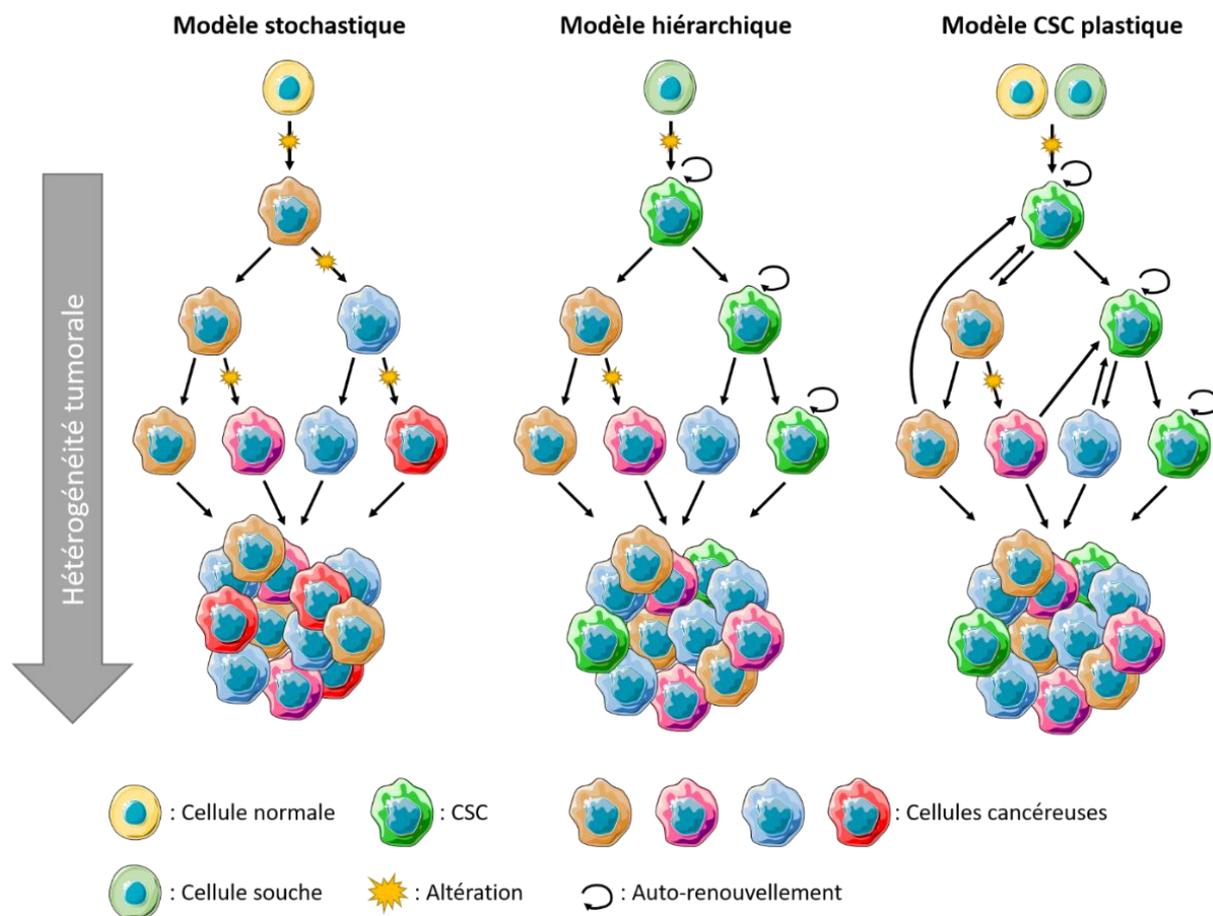


Figure 12 : Les différentes théories à l'origine de l'hétérogénéité tumorale du cancer du sein

Le modèle stochastique, ou modèle d'évolution clonale, suggère que chaque cellule tumorale possède la capacité d'initier et de maintenir la tumeur. Le modèle hiérarchique, ou modèle des CSCs, suggère que les cellules souches cancéreuses résident au sommet du processus de transformation grâce à leurs capacités d'auto-renouvellement et tumorigéniques. Un autre modèle, appelé modèle CSC plastique, suggère une forte plasticité des cellules cancéreuses non souches qui leur permettrait de se différencier en cellule souche cancéreuse.

b. Plusieurs stades de développement

Le cancer du sein peut se présenter sous différentes formes selon le stade de développement de la maladie. Le stade de développement du cancer du sein est déterminé grâce à différents critères anatomo-pathologiques mais aussi et surtout histologiques (Figure 13). L'apparition d'un cancer du sein est tout d'abord associée à l'apparition d'une hyperplasie épithéliale résultant de la prolifération anarchique de cellules épithéliales normales. Si la tumeur reste localisée au tissu où elle est apparue, qu'elle reste bien délimitée et que sa progression est lente, on la qualifiera de tumeur bénigne. Les tumeurs bénignes ont un pronostic favorable car elles ne récidivent pas après exérèse complète et n'entraînent pas la formation de métastases. Les tumeurs malignes correspondent à des stades de

INTRODUCTION

développement tumoral plus avancés. En effet, la tumeur peut continuer sa progression en passant de l'hyperplasie épithéliale au carcinome *in situ* qui correspond à une tumeur maligne qui reste locale, sans destruction de la lame basale, mais dont les cellules sont fortement prolifératives. Il existe deux types de carcinomes *in situ* selon la localisation de la tumeur : le carcinome canalaire *in situ* (CCIS) lorsque la tumeur est localisée dans la lumière du canal galactophore et le carcinome lobulaire *in situ* (CLIS) lorsque la tumeur se situe dans les alvéoles des lobules mammaires (Wellings et Jensen, 1973). La tumeur peut ensuite continuer sa progression pour devenir infiltrante. Pour arriver à ce stade de développement, les cellules doivent acquérir différentes propriétés leur permettant de rompre la membrane basale et d'envahir le tissu conjonctif et les autres tissus environnants. La tumeur est alors qualifiée de carcinome invasif. Selon la classification de 2012 de l'Organisation Mondiale de la Santé, on peut classer ces carcinomes invasifs en deux catégories que sont les carcinomes de type non spécifique (TNS) et les carcinomes de type spécifique (Lakhani *et al.*, 2012). Les carcinomes de type non spécifiques (80 % des cas de cancers du sein) correspondent principalement à l'ancienne catégorie des carcinomes canauxaux invasifs (CCI) mais sont officiellement définis par les carcinomes dont l'absence de caractères morphologiques ne permet pas de les classer dans la catégorie des types spéciaux. Ainsi, dans le dernier rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé, on dénombrait jusqu'à 21 types de tumeurs du sein différents. Suite au développement d'un carcinome invasif, la tumeur peut encore évoluer pour donner un cancer métastatique. Les cellules cancéreuses du site primaire acquièrent la capacité d'envahir les tissus environnants et procèdent à l'intravasation dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Ces cellules peuvent alors être disséminées vers des organes distants. En conséquence, elles doivent parvenir à survivre en absence d'ancrage dans les fluides et se mettent pour cela dans un état de quiescence, en attendant de pouvoir adhérer à la surface des capillaires de l'organe cible, à la suite de quoi elles peuvent procéder à leur extravasation dans le parenchyme de l'organe atteint, proliférer et donner une métastase. Si la cellule métastatique réussit ces étapes complexes, le processus peut de nouveau être répété pour produire des métastases secondaires ou « métastase de métastases » (Scully *et al.*, 2012). Dans le cancer du sein, les organes touchés par les métastases sont principalement les os, le foie, les poumons et le cerveau (Jin et Mu, 2015).

INTRODUCTION

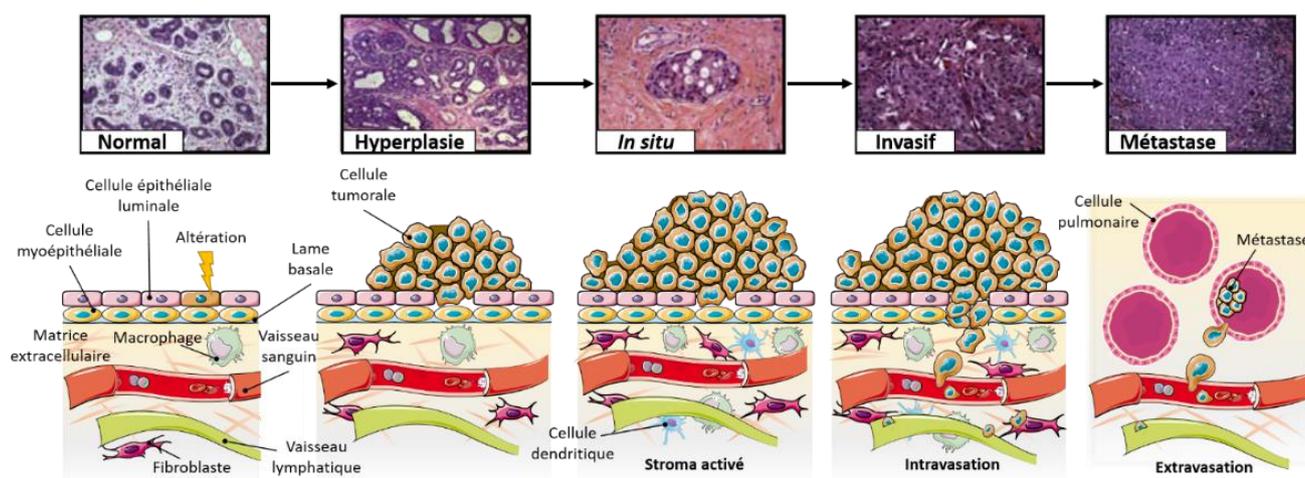


Figure 13 : Les stades de développement d'un cancer du sein

La grande majorité des cancers du sein commence au sein des cellules épithéliales situées dans la lumière des canaux mammaires. Suite à des altérations génétiques, épigénétiques et/ou l'influence du microenvironnement tumoral, ces cellules épithéliales vont proliférer de façon anarchique pour former une masse de cellules cancéreuses bien délimitée appelée hyperplasie. Suite à l'accumulation des altérations précédemment décrites, ces cellules tumorales vont devenir plus agressives pour donner un cancer in situ, toujours cantonné par la lame basale. Le passage de la lame basale par les cellules cancéreuses mammaires définit le stade invasif du cancer du sein, les cellules cancéreuses ne sont plus cantonnées par la lame basale et se disséminent dans d'autres organes via leur intravasation dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Parvenues au niveau de l'organe cible, les cellules cancéreuses effectuent une extravasation pour atteindre l'organe d'où elles pourront éventuellement proliférer et donner une métastase. Les différents stades de développement d'un cancer du sein sont illustrés par : en haut, des coupes histologiques (adaptée de [Rivenbark et al., 2013](#)), en bas, des représentations schématiques (adaptée de [Vargo-Gogola et Rosen, 2007](#))

c. Plusieurs classifications

Historiquement, la classification des cancers du sein s'est tout d'abord basée sur l'expertise histopathologique. Par la suite, l'expression des ER, PR et l'amplification d'HER2 sont venus affiner la classification afin de prédire le pronostic mais aussi la réponse aux traitements endocriniens et à l'anticorps trastuzumab (Herceptin). Plus récemment, le progrès considérable ayant eu lieu dans les analyses moléculaires a profondément amélioré notre compréhension de la biologie des cancers du sein mais aussi la classification. L'ensemble de ces avancées permet le développement de signatures prédictives et pronostiques qui rapprochent la possibilité d'une individualisation des traitements ([Harris, 2018](#)).

INTRODUCTION

- **Classification histopathologique**

Comme décrit brièvement dans la partie précédente, les cancers invasifs de type non spécifique (TNS) sont les cancers du sein les plus fréquents, représentant près de 75 % des cas. Pour être classé dans la catégorie des carcinomes spéciaux, les aspects histologiques spécifiques doivent représenter plus de 90 % de la tumeur. Dans cette catégorie, on compte principalement les carcinomes lobulaires invasifs (CLI) (environ 10 % des cas de cancers du sein) (Li *et al.*, 2005) mais aussi les carcinomes médullaires, neuroendocriniens, tubulaires, apocrines, mucineux, micropapillaires, adénoïdes kystiques ou encore inflammatoires (Dieci *et al.*, 2014; Weigelt *et al.*, 2010b). Quelques exemples de cancers invasifs morphologiquement différents sont présentés en Figure 14.

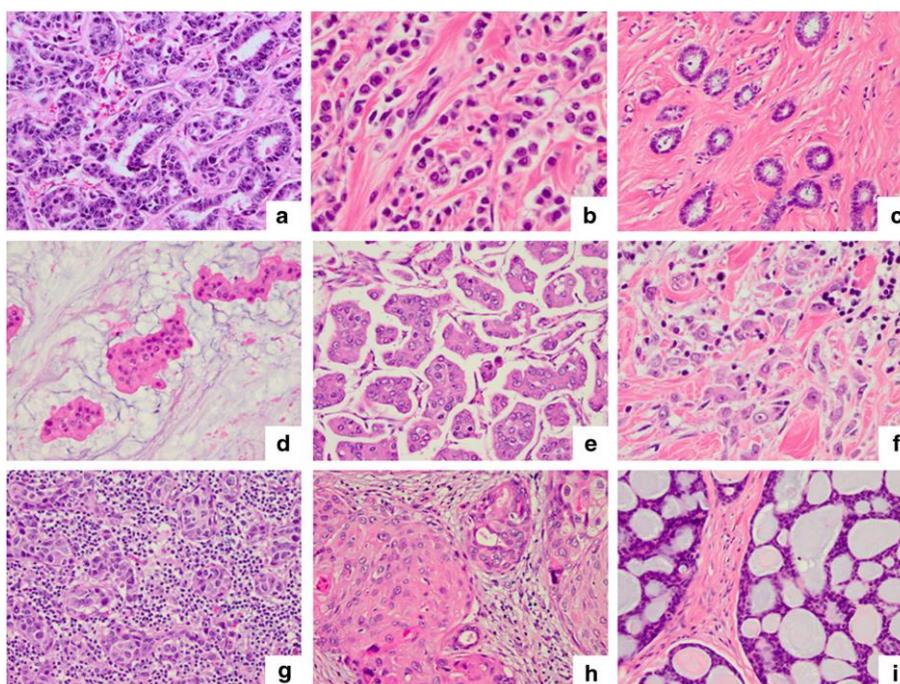


Figure 14 : Différents types histologiques de cancers du sein invasifs

*L'hétérogénéité des cancers du sein est également visible au niveau histologique au sein de cancers situés au même stade de développement (cancers invasifs). (a) Carcinome invasif de type non spécifique, (b) Carcinome lobulaire classique, (c) carcinome tubulaire, (d) carcinome mucineux, (e) carcinome invasif micropapillaire, (f) carcinome lobulaire pléiomorphe, (g) carcinome médullaire, (h) carcinome métaplastique, (i) carcinome adénoïde kystique. Les coupes sont marquées à l'hématoxyline et à l'éosine (issue de Vuong *et al.*, 2014).*

INTRODUCTION

Du point de vue histologique, le système de gradation le plus utilisé est basé sur la classification de Scarff, Bloom et Richardson (Bloom et Richardson, 1957; Scarff et Torloni, 1968), modifié par la suite par Elston et Ellis (Elston et Ellis, 1991), qu'on appelle aussi le système de gradation Nottingham (SGN). Cette classification est basée sur la détermination histologique du degré de différenciation de la tumeur. Les scores sont ainsi déterminés en fonction de la proportion de tubules, du pléomorphisme nucléaire, et du nombre de cellules en mitose dans le champ du microscope par rapport au nombre total de cellule (Vuong *et al.*, 2014) (Tableau 1).

Caractéristiques histologiques	Score 1	Score 2	Score 3
Formation de tubules	Plus de 75 % de la tumeur	10 à 75 % de la tumeur	Moins de 10 % de la tumeur
Pléomorphisme nucléaire	Noyaux réguliers et uniformes	Augmentation modérée en taille et variabilité	Variations marquées
Nombre de mitoses *	0 - 9	10 - 19	> 20

Tableau 1 : Méthodes semi-quantitatives d'évaluation du grade histologique du cancer du sein (Méthode de Scarff, Bloom et Richardson)

** Le nombre de mitoses est donné ici en nombre moyen de cellules en mitose dans un objectif X25 sur 10 champs à la périphérie de la tumeur.*

Ces scores sont alors combinés pour donner le grade histologique de la tumeur noté de 1 à 3 (Tableau 2). Ce système de gradation s'est avéré être un très bon outil pronostique et a d'ailleurs été intégré dans des algorithmes (comme le Nottingham Prognostic Index and Adjuvant ! Online) et directives pour la détermination de chimiothérapie adjuvante (Rakha *et al.*, 2010).

INTRODUCTION

Grade	Score	Description
I	3 - 5	Tumeur bien différenciée, les cellules ne prolifèrent pas activement et ont peu de chances de se disséminer
II	6 - 7	Tumeur moyennement différenciée, caractères histologiques variant entre les grades I et III
III	8 - 9	Tumeur peu ou pas différenciée, les cellules montrent une prolifération active et sont susceptibles de se disséminer

Tableau 2 : Détermination du grade histologique par la méthode de Scarff, Bloom et Richardson

- **Classification TNM**

Le cancer du sein peut être classé en fonction de caractéristiques anatomiques selon la classification Tumor-Node-Metastasis (TNM), basée sur les travaux de Pierre Denoix dans les années 1940. Ainsi, le grade TNM est déterminé en fonction de la taille de la tumeur (mais aussi d'autres aspects comme les relations avec les structures environnantes), les caractéristiques des ganglions lymphatiques régionaux (nombre ou localisation des ganglions impactés) et la présence ou l'absence de métastases distantes. La classification TNM a deux sources différentes : l'une est fournie par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) ([Brierley et al., 2017](#)) et l'autre par le Comité Américain Mixte sur le Cancer (AJCC ; American Joint Committee on Cancer) ([Amin et al., 2017a](#)). La détermination des stades TNM est résumée dans le Tableau 3. Cette classification est régulièrement actualisée et améliorée. En Janvier 2018 notamment, l'AJCC a mis à jour la dernière édition de sa classification (la 8^{ème} édition) pour incorporer dans la détermination du grade le statut des récepteurs hormonaux (ER et PR) et d'HER2 ainsi que l'expression d'un panel de gènes par l'utilisation de tests comme Oncotype DX ou MammaPrint ([Cserni et al., 2018](#)). Cette dernière classification a compliqué la détermination du stade mais s'inscrit dans une volonté de se rapprocher d'une médecine personnalisée ([Amin et al., 2017b](#)).

INTRODUCTION

Stade	Tumeur	Ganglion	Métastases	Description
0	T0 ou Tis	N0	M0	Pas de tumeur primaire ou cancer <i>in situ</i>
I	T1	N0	M0	Tumeur inférieure à 2 cm, pas de ganglions lymphatiques atteints ni de métastases
IIA	T0 T1 T2	N1 N1 N0	M0	Tumeur inférieure à 2 cm avec atteinte mineure des ganglions ou tumeur de 2 à 5 cm sans atteinte ganglionnaire
IIB	T2 T3	N1 N0	M0	Tumeur de 2 à 5 cm avec atteinte mineure des ganglions ou tumeur supérieure à 5 cm sans atteinte ganglionnaire
IIIA	T0/1/2/3	N1/2	M0	Tumeur de taille variable avec atteinte mineure ou modérée des ganglions
IIIB	T4	N0/1/2	M0	Tumeur de taille variable avec extension à la poitrine ou la peau et atteinte ganglionnaire faible à modérée
IIIC	Tout T	N3	M0	Atteinte ganglionnaire importante
IV	Tout T	Tout N	M1	Présence de métastases distantes

Tableau 3 : Stades cliniques du cancer du sein basés sur la classification TNM.

- **Classification moléculaire**

Les marqueurs classiques tels que ER, PR, HER2 ou encore Ki67 furent les premiers facteurs moléculaires à l'origine du regroupement des cancers du sein en sous-groupes moléculaires et sont conventionnellement utilisés en complément des classifications histopathologiques pour la prise en charge et l'établissement du pronostic chez les patients (Cheang *et al.*, 2009; Dowsett *et al.*, 2013; Vallejos *et al.*, 2010). L'expression de ces marqueurs est évaluée par des techniques classiques d'immunohistochimie mais également par la technique d'hybridation *in situ* qui permet notamment la détermination des amplifications géniques. La détection de ces quatre biomarqueurs par IHC (IHC4), est relativement simple et peu coûteuse, ce qui en fait la technique de stratification moléculaire la plus utilisée de par le monde. D'autres marqueurs IHC peuvent compléter la stratification des cancers du sein comme EGFR et CK5/6 (Nielsen *et al.*, 2004). Cependant, bien qu'ayant montré un avantage certain en clinique, ces méthodes d'évaluation ont leurs limites. En effet, l'évaluation des

INTRODUCTION

risques et des traitements suite à ces marquages mène parfois à de mauvais choix de traitements (sous-évaluation ou surévaluation) car la détermination des seuils de positivité par les techniques d'IHC et FISH reste subjective et les méthodes de fixation des tissus et la méthodologie des marquages peuvent grandement faire varier l'interprétation des résultats (Tang *et al.*, 2009; Walker, 2008; Zaha, 2014).

Historiquement, la classification moléculaire commença avec les analyses de perte d'hétérozygotie (LOH ; Loss Of Heterozygosity) et d'hybridation comparative du génome (CGH ; Comparative Genomic Hybridization) dans les années 90 (revue dans (Vuong *et al.*, 2014)). Au début des années 2000, les analyses d'expression par des techniques d'analyse à large échelle, notamment les biopuces à ADN, ont permis d'établir des sous-types moléculaires précis et cliniquement relevant. Ainsi, l'équipe de Perou fut la première à distinguer cinq sous-types distincts de carcinomes mammaires basés sur l'expression génique : Luminal A, Luminal B, HER2+, Basal-like et Normal-like (Hu *et al.*, 2006; Perou *et al.*, 2000; Sørlie *et al.*, 2003, 2001). Ces « sous-groupes intrinsèques » ont été validés par de nombreuses autres études et ont montré une bonne valeur pronostique ainsi que prédictive à la réponse à la chimiothérapie (Prat *et al.*, 2015; Rouzier *et al.*, 2005). Des outils sont d'ailleurs commercialisés pour classer les tumeurs de sein dans les différents sous-groupes comme Prosigna™ qui est basé sur l'expression de 50 gènes (Wallden *et al.*, 2015). Ainsi, les cancers Normal-like présentent des caractéristiques de tissus normaux et sont d'ailleurs sujets à controverse car certains auteurs estiment qu'il s'agit de contaminations par des tissus de glande mammaire normaux. Les cancers de type Luminal A et B expriment ER mais les luminal A sont de meilleur pronostique que les luminal B car présentent une plus faible expression de marqueurs de prolifération. Les tumeurs HER2+ surexpriment le récepteur HER2 et sont de bon pronostique grâce notamment à la découverte des thérapies ciblant HER2 tel que le trastuzumab. La majorité des cancers Basal-like n'expriment pas ER/PR et ne présentent pas de surexpression d'HER2. Ainsi, le terme Triple-Négatif est souvent utilisé pour désigner les cancers Basal-like mais tous les cancers Triple-Négatifs ne sont pas de type Basal-like (Carey *et al.*, 2010). Ces cancers sont considérés comme de mauvais pronostique et présentent d'ailleurs une prise en charge particulièrement élevée de fluorodésoxyglucose (FDG) en imagerie PET (*Positron Emission Tomography*) (Basu *et al.*, 2008). Par ailleurs, ces cancers sont caractérisés par une surexpression de gènes spécifiques des cellules myoépithéliales comme

INTRODUCTION

par exemple les cytokératines de haut poids moléculaires CK5 et CK14, la phospho-cadhérine ou encore l'EGFR (Weigelt *et al.*, 2010a). Ce sous-type est le plus hétérogène et certaines études plus récentes ont d'ailleurs divisé cette catégorie en différents sous-groupes (Lehmann *et al.*, 2016; Masuda *et al.*, 2013). Parmi les différents sous-groupes de cancers basal-like découverts, on compte par exemple les tumeurs LAR (*Luminal Apocrine Receptor*) caractérisées par une forte expression du récepteur aux androgènes ou encore les tumeurs « claudin-low » qui sont caractérisées par un enrichissement en marqueurs de cellules souches cancéreuses et une faible expression des marqueurs de jonction cellulaire tels que la cadherin-1 (*CDH1*) et les claudines (*CLDN*) (Farmer *et al.*, 2005; Prat *et al.*, 2010; Prat et Perou, 2011). Avec le développement des technologies à large échelle, la catégorisation des cancers du sein entre dans une nouvelle ère avec l'apparition d'analyse à différents niveaux : génomique, transcriptionnelle, translationnelle ou encore épigénétique. Récemment, un classement basé sur les analyses génomiques et transcriptomiques de 200 échantillons de cancers du sein a permis de redéfinir dix nouveaux groupes appelés « integrative clusters » (IntClusts) avec des implications cliniques distinctes (Curtis *et al.*, 2012). Par ailleurs, une étude menée par TCGA a intégré les informations de plateformes multiples (nombre de copies ADN, méthylation de l'ADN, séquençage de l'exome, ARNm, miRNA et protéines) pour redéfinir quatre sous-groupes majeurs de cancer du sein : Luminal A, Luminal B, HER2+ et Triple-Négatif (The Cancer Genome Atlas Network, 2012) (Tableau 4).

L'ensemble de ces études a permis le développement de signatures moléculaires distinctes afin de fournir une aide efficace à la détermination du pronostic des patients. Parmi ces tests génomiques, on peut citer Mammaprint (Agendia, Amsterdam, Pays-Bas) qui a été le premier à s'imposer comme signature pronostique. Mammaprint est un test sur un panel de 70 gènes par utilisation de biopuces à ADN et a été approuvé par l'US Food and Drug Administration (FDA) en 2007 pour le pronostic des patientes notamment les possibilités de récurrences de la tumeur. D'autres tests comme le test Veridex 76-gene ou encore le MapQuant Dx (Ipsogen SA, Marseille, France) fonctionnent aussi sur l'utilisation de biopuces à ADN (Paik *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Il existe également des tests basés sur l'utilisation de la technique de qRT-PCR comme l'Oncotype DX et Theros (Ma *et al.*, 2008; Paik *et al.*, 2006). Malgré le peu de gènes en commun dans les différentes signatures, les études montrent une

INTRODUCTION

bonne concordance entre les tests. Par exemple, il n'y a qu'un seul gène en commun (*SCUBE2*) entre MammaPrint et Oncotype DX (Fan *et al.*, 2006).

Sous-type moléculaire	Luminal A	Luminal B	HER2-enriched	Basal-like
Prévalence	50-60 %	10-30 %	10-15 %	10-20 %
Grade histologique	1/2	2/3	2/3	3
Statut IHC	ER+, PR+, HER2-, Ki67-	ER+, PR+, HER2+/-, Ki67+	ER-, PR-, HER2+, Ki67+	ER-, PR-, HER2-, Ki67+
Caractéristiques génomiques	Génome "silencieux"	Instabilité génomique modérée ; amplification de <i>CDN1</i> , <i>MDM2</i> ; perte d' <i>ATM</i> ; Amplification focales	Forte instabilité génomique ; amplification d' <i>HER2</i> , <i>CDN1</i> .	Forte instabilité génomique ; amplifications focales ; perte de <i>RB1</i> , <i>BRCA1</i> .
Mutations	<i>PIK3CA</i> , <i>MAP3K1</i> , <i>GATA3</i> , <i>FOXA1</i>	<i>TP53</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>PTEN</i>	<i>TP53</i> , <i>PIK3CA</i>	<i>TP53</i>
Méthylation de l'ADN	-	Hyperméthylation	-	Hypométhylation
Pronostique	Favorable	Intermédiaire	Défavorable	Défavorable
Recommandation de traitements (néo)adjuvants	Thérapie endocrinienne seule	Thérapie endocrinienne +/- chimiothérapie +/- thérapie anti-HER2	Chimiothérapie + thérapie anti-HER2	Chimiothérapie

Tableau 4 : Les sous-types moléculaires du cancer du sein.

(adapté de Dai *et al.*, 2015 ; Lam *et al.*, 2014 ; The Cancer Genome Atlas, 2012 ; Vuong *et al.*, 2014)

INTRODUCTION

5. Diagnostic et traitements du cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie complexe caractérisée par de nombreux facteurs morphologiques, cliniques et moléculaires et c'est pourquoi son traitement nécessite une coordination étroite entre différentes disciplines médicales et paramédicales. En effet, une fois le diagnostic effectué, le traitement d'un cancer du sein va associer, en fonction du type de cancer, la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie ou encore l'utilisation de thérapies ciblées. La prise en charge et le traitement des cancers du sein subit ces dernières années une évolution progressive vers un traitement personnalisé afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique tout en réduisant les effets secondaires indésirables ([Abreu et al., 2014](#)).

a. Détection et diagnostic

La détection d'un cancer du sein à un stade peu avancé de son développement peut permettre de le soigner plus rapidement mais aussi de limiter les séquelles liées à certains traitements ([Dépistage du cancer du sein | Institut National Du Cancer, 2018](#)). Ainsi, il est important de considérer certains signes pouvant être causés par un cancer de sein tels que l'apparition d'une grosseur ou d'un épaissement au niveau du sein ou sous l'aisselle, un changement de taille ou de forme, une modification au niveau de l'aréole (rétraction, changement de coloration, suintement ou écoulement) ou encore une modification de la peau (rougeur, œdème ou aspect de peau d'orange). Il est d'ailleurs recommandé d'effectuer un examen clinique des seins tous les ans dès l'âge de 25 ans qui permettra à un médecin ou un personnel du milieu médical, par palpation, de vérifier la présence d'éventuelles anomalies. De plus, un historique du mode de vie et des précédentes maladies de la patiente sera pris en compte.

Afin de confirmer précisément la présence d'un cancer du sein, plusieurs tests différents peuvent être effectués. Des images des tissus internes du sein peuvent être obtenues par des techniques d'imagerie telles que la mammographie par rayons X (radiographie), l'échographie ou encore l'imagerie par résonance magnétique (IRM). La mammographie reste la technique la plus utilisée, les autres étant utilisées de façon complémentaire. Cette technique a d'ailleurs été récemment améliorée pour donner la tomosynthèse ou mammographie 3D permettant la visualisation des tissus mammaires en 3D

INTRODUCTION

(Helvie, 2010). Des analyses de sang peuvent également permettre la détection de marqueurs tumoraux tels que le CA 15-3 (*Cancer Antigen 15-3*) et le CEA (*Carcino-Embrionic Antigen*) (Shao *et al.*, 2015). Enfin, une biopsie (prélèvement chirurgical sous anesthésie locale ou régionale) peut être effectuée pour diagnostiquer un cancer du sein. Cet examen a pour but de prélever des cellules provenant du tissu suspect qui seront ensuite examinées sous microscope par un anatomopathologiste pour vérifier la présence d'un cancer. Les biopsies sont d'ailleurs nécessaires à l'établissement précis du diagnostic et à la détermination du type de cancer du sein.

Une fois la présence du cancer du sein confirmée, celui-ci doit être gradé comme nous l'avons déjà vu dans la précédente partie sur la classification des cancers du sein. Mais les déterminations histopathologiques et moléculaires ne suffisent pas à la gradation complète du cancer du sein. En effet, des tests doivent être effectués pour déterminer si des cellules cancéreuses se sont disséminées dans le sein ou dans d'autres organes. Une biopsie du ganglion sentinelle permet de savoir si les cellules cancéreuses se sont disséminées et s'il est nécessaire d'enlever les ganglions axillaires. En effet, le ganglion sentinelle est le premier ganglion à recevoir le drainage lymphatique de la tumeur et donc potentiellement le premier à accueillir d'éventuelles cellules métastatiques. On le détecte en injectant un colorant (bleu patenté) et/ou une substance radioactive (technétium-99 m (Tc-99 m)) près de la tumeur (Giuliano *et al.*, 1994). Des scanners peuvent également être utilisés comme la radiographie de la poitrine, le CAT scan (*Computer-Assisted Tomography*) ou encore la Tomographie par émission de positons (TEP ; PET scan). Cette dernière technique consiste à injecter dans les veines une petite dose de glucose couplée à une molécule de Fluor 18 radioactive (18-FDG ; 18-Fluoro-DésoxyGlucose) qui sera détectée par le scanner TEP. Les cellules tumorales étant plus actives métaboliquement captent plus de glucose que les cellules normales et sont donc détectées par le scanner TEP.

b. Traitements des cancers du sein

Le choix du traitement dépend de différents facteurs tels que le type de cancer du sein, l'envahissement des ganglions ou encore la présence de métastases entre autres, des facteurs qui sont déterminés lors du diagnostic du cancer. Le traitement adéquat est établi par une Concertation Oncologique Multidisciplinaire (COM) où se réunissent des médecins de différentes

INTRODUCTION

disciplines. Les traitements sont donc individualisés et cette individualisation de traitements s'améliore d'année en année grâce au profilage moléculaire.

- **La chirurgie**

La chirurgie est la plupart du temps le premier traitement appliqué après le diagnostic d'un cancer du sein. Dépendant du type de cancer, la chirurgie pourra être soit partielle (tumorectomie : ablation chirurgicale de la tumeur), soit radicale (mastectomie : ablation complète du sein). Une ablation des ganglions axillaires touchés peut éventuellement être pratiquée. De même, une chirurgie pour enlever les métastases ayant atteints d'autres organes peut aussi être envisagée. Suite à la chirurgie et selon le type de cancer, un traitement par radiothérapie ou par chimiothérapie peut être prescrit afin d'éviter une éventuelle récurrence loco-régionale ou à distance ([Maughan et al., 2010](#)).

- **La radiothérapie**

Grâce à la radiothérapie, l'utilisation de rayons X ou de faisceaux d'électrons pouvant endommager l'ADN des cellules ciblées, il est possible d'éliminer spécifiquement les cellules cancéreuses. Deux méthodes existent pour effectuer une radiothérapie : la première est la radiothérapie externe où les rayons sont produits par un appareil situé à l'extérieur du corps, la deuxième consiste à implanter temporairement de fins tubes contenant la source des rayons au niveau du sein. La radiothérapie peut être utilisée dans le traitement de la plupart des grades de cancer du sein car son efficacité pour diminuer la récurrence a été largement prouvée ([Clarke et al., 2005](#)). De manière plus rare, la radiothérapie peut être préconisée pour diminuer la taille de tumeur inopérable avant la chirurgie. Les rayons utilisés pour la radiothérapie sont dirigés vers une zone spécifique du sein et les effets secondaires sont donc limités à un niveau local (irritations) dans la majorité des cas. Cependant, une période prolongée d'irradiation peut faire apparaître une fatigue générale ou un gonflement du sein. De nouvelles techniques de radiothérapie font leur apparition comme par exemple la protonthérapie qui, contrairement aux radiothérapies conventionnelles, focalise un faisceau de protons sur la lésion ce qui minimise les dommages occasionnés aux tissus environnants mais aussi augmente l'homogénéité d'irradiation dans la tumeur ([Orecchia et al., 2015](#)).

INTRODUCTION

- **La chimiothérapie**

La chimiothérapie est la thérapie conventionnelle pour les femmes présentant une atteinte ganglionnaire ou une tumeur de plus d'un centimètre. C'est également la stratégie de traitement utilisée pour les cancers invasifs ne présentant pas de thérapies ciblées comme les cancers triple-négatifs. La chimiothérapie regroupe plusieurs types de drogues qui vont avoir pour effet de détruire préférentiellement les cellules cancéreuses dans l'ensemble de l'organisme. Ainsi, comparée à la chirurgie et la radiothérapie, la chimiothérapie n'est pas un traitement loco-régional car elle agit sur l'ensemble de l'organisme, bien que préférentiellement sur les cellules cancéreuses. Les drogues de chimiothérapie fonctionnent par ciblage de la prolifération et de la division cellulaire à différents niveaux. Ainsi, les cellules cancéreuses étant plus actives que les cellules normales, celles-ci seront plus fortement impactées par la chimiothérapie. Ces drogues peuvent être utilisées en traitement seul mais sont la plupart du temps utilisées en association avec d'autres drogues. La chimiothérapie peut être néo-adjuvante (avant le traitement principal, souvent la chirurgie) ou adjuvante (après le traitement principal). Il existe différents types de chimiothérapie utilisés dans le traitement du cancer du sein ([Esposito et al., 2014](#)) :

Les antimétabolites : analogues de certains métabolites qui vont être utilisés à la place des métabolites normaux et donc interférer avec leur rôle de base. Par exemple, le 5-fluorouracile (5-FU), un analogue de la pyrimidine, va être métabolisé et pris en charge par la thymidilate synthétase ce qui empêchera cette enzyme d'effectuer son travail normal qui est de méthyler l'uracile en thymine. Ceci va alors provoquer une inhibition de la synthèse d'ADN. De plus, il peut être incorporé dans les ARNs à la place de l'uracile. Parmi les antimétabolites utilisés dans le traitement du cancer du sein, on compte également le méthotrexate, la capécitabine ou encore la gemcitabine (Institut National du Cancer).

Les anthracyclines : composés s'intercalant entre les paires de bases azotés de l'ADN et qui pourraient également empêcher l'activité de la topoisomérase 2, bloquant donc la synthèse d'ADN. Dans le traitement du cancer du sein, on utilise la doxorubicine et son dérivé, l'épirubicine ([Conte et al., 2000](#)).

Les agents alkylants : composés possédant un groupe alkyl qui va être incorporé à certaines bases de l'ADN provoquant une liaison de deux nucléotides adjacents et donc,

INTRODUCTION

perturbant la réplication de l'ADN. De plus, l'alkylation de la guanine peut également conduire à son excision provoquant des cassures de l'ADN. Le cyclophosphamide est le seul agent alkylant autorisé pour le traitement du cancer du sein (O'Shaughnessy, 1999). D'autres composés ont été testés en phases d'essais cliniques mais n'ont pas donné de résultats significatifs sur l'amélioration de la survie des patientes comme ce fut le cas avec le témozolomide, bien que des effets encourageants aient été obtenus dans le cas de traitements de métastases au cerveau (Trudeau *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2014).

Les poisons du fuseau mitotique : composés ciblant la tubuline cytoplasmique dont la polymérisation est nécessaire à la construction du fuseau mitotique et donc à de nombreux processus cellulaires vitales tels que la mitose ou la maintenance de la morphologie cellulaire. Il existe plusieurs types de poisons du fuseau en fonction de leur structure, origine, sites de liaison sur la tubuline et conséquences sur les microtubules. Les alcaloïdes de la pervenche (Vinorelbine) empêchent la polymérisation des microtubules, les taxanes (paclitaxel et docétaxel) stabilisent de façon définitive la tubuline, et l'Eribuline inhibe la croissance des microtubules en piégeant la tubuline dans des agrégats non productifs (Nabholtz et Gligorov, 2005).

- **Les thérapies ciblées**

Les thérapies ciblées ont pour particularité de cibler préférentiellement les biomarqueurs et aberrations spécifiques du cancer. Ainsi, ce type de traitement cherche à éliminer les cellules cancéreuses ou à bloquer leur croissance tout en limitant les dommages aux cellules saines. Les récentes avancées en matière de profilage moléculaire du cancer du sein ont permis l'émergence de nombreuses thérapies ciblées agissant à différents niveaux dans les cellules cancéreuses de sein et permettant de se rapprocher d'une thérapie personnalisée en fonction du type de tumeur propre à chaque patiente. Cependant, certaines de ces thérapies ciblées peinent à démontrer leur efficacité en clinique suite à l'émergence de résistances permises par la plasticité exceptionnelle des cellules cancéreuses. Il est donc impératif de poursuivre la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer de nouvelles thérapies ciblées contrant ces résistances aux anciennes thérapies (Khamisipour *et al.*, 2016; Tsimberidou *et al.*, 2014) (Figure 15). Les thérapies ciblées présentées ci-après sont classées en fonction de la classe moléculaire de la tumeur ciblée.

INTRODUCTION

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

Le récepteur α aux œstrogènes est considéré comme l'un des biomarqueurs les plus importants dans le cancer du sein et représente le principal déterminant pour le choix d'un traitement par l'hormonothérapie. Ainsi, l'hormonothérapie sera administrée aux patientes présentant un cancer de type luminal (A et B) afin de contrer la signalisation dépendante de ce récepteur. Il existe différents types de drogues d'hormonothérapie en fonction de la molécule ou de la voie ciblée.

Les SERMs (*Selective estrogen receptor modulators*) représentent un groupe de molécules ayant des activités oestrogéniques agonistes ou antagonistes et fonctionnent en se liant au récepteur aux œstrogènes, empêchant la fixation des œstrogènes et perturbant sa signalisation pro-tumorale. Les SERMs actuellement disponibles et approuvés par la FDA sont le tamoxifène, le toremifène ainsi que le raloxifène ([Abreu et al., 2014](#)). Les SERDs (*Selective Estrogen Receptor Dergraders*) sont des molécules se liant au récepteur aux oestrogènes et causant sa dégradation. Un seul SERD est actuellement utilisé dans le traitement des cancers du sein, le fulvestrant ([Ciruelos et al., 2014](#)). Les inhibiteurs d'aromatase (AIs) bloquent la synthèse des oestrogènes à partir des androgènes *via* l'inhibition de l'activité de l'aromatase, ce qui a pour conséquence une réduction des niveaux d'oestrogènes. Trois AIs sont actuellement approuvés pour le traitement des cancers du sein : le letrozole, l'anastrozole et l'exemestane. Les AIs ont montré une efficacité accrue par rapport au tamoxifène dans le traitement des patientes post-ménopauses ([den Hollander et al., 2013](#)). De nombreuses études ont également montré l'intérêt de l'utilisation des AIs pour la prévenir l'apparition d'un cancer du sein ([Cuzick, 2003](#); [Goss et al., 2007](#); [Zhang et al., 2011](#)). Enfin, des analogues de l'hormone responsable de la libération de l'hormone lutéinisante (LHRH : *Luteinizing Hormone Releasing Hormone*) sont également utilisés en hormonothérapie. Ces molécules (goséréline et leuprolide) suppriment la production d'hormones par les ovaires et sont utilisées en combinaison avec la chimiothérapie afin de prévenir la perte de fonction des ovaires ([Moore et al., 2015](#)). L'ensemble de ces drogues fonctionnant de différentes manières sur la signalisation des oestrogènes, elles sont généralement combinées ou utilisées en complément d'une chimiothérapie ([Reinert et Barrios, 2015](#); [Tong et al., 2018](#)). Récemment, un nouveau type d'hormonothérapie a démontré des effets encourageants sur la survie des patientes atteintes de cancer du sein par l'utilisation d'inhibiteurs de la stéroïde sulfatase. La stéroïde

INTRODUCTION

sulfatase est une enzyme régulant la conversion de stéroïdes sulfatés inactifs en stéroïdes actifs et en stéroïdes oestrogéniques (Purohit *et al.*, 2011). Il a été démontré que les tumeurs de type luminal présentaient une augmentation de l'expression et de l'activité de cette enzyme, ce qui en fait une cible prometteuse pour tenter de réduire les niveaux d'oestrogènes chez ces patientes (Stanway *et al.*, 2007). Ainsi, la combinaison d'irosustat, un inhibiteur de première génération de la stéroïde sulfatase, et d'un inhibiteur d'aromatase, a été évaluée lors d'un essai clinique de phase 2 et a montré un bénéfice clinique significatif (Palmieri *et al.*, 2017). Malgré ces résultats satisfaisants, les essais n'ont pas été poursuivis suite aux résultats décevants de cet inhibiteur administré en monothérapie.

Les cancers du sein de type luminal, en particulier métastatiques, peuvent développer des résistances à l'hormonothérapie suite, par exemple, à des altérations génomiques touchant les récepteurs aux oestrogènes et/ou à la suractivation d'autres voies de signalisation dépendantes des facteurs de croissance (Augereau *et al.*, 2017). Ainsi, parmi les thérapies ciblées émergentes dans le traitement des cancers du sein luminal, les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4/6 ; *Cyclin-Dependent Kinases 4 and 6*) se révèlent prometteurs. Les CDK4/6 régulent la progression du cycle cellulaire en phase G1/S grâce à leur interaction avec la cycline D1 permettant la phosphorylation de la protéine Rb, un corépresseur des facteurs de transcription de la famille E2F. Ces facteurs de transcription contrôlent de nombreux gènes nécessaires à la transition G1/S et au passage en mitose (Augereau *et al.*, 2017; Knudsen et Witkiewicz, 2017; Shah *et al.*, 2018). Deux inhibiteurs des CDK4/6 ont récemment été approuvés par la FDA pour le traitement de patientes atteintes d'un cancer hormonodépendant en combinaison avec un inhibiteur d'aromatase : le Palbociclib (février 2015) et le Ribociclib (mars 2017) (Duso *et al.*, 2018; Finn *et al.*, 2016). Les inhibiteurs de la protéine mTOR se sont également avérées être une bonne option de thérapies ciblées. En effet, la protéine mTOR joue un rôle central dans de nombreux processus cellulaires en tant qu'effecteur important de la voie de signalisation PI3K (Zarogoulidis *et al.*, 2014). Ainsi, l'Everolimus a été approuvée en juillet 2012 par la FDA pour le traitement de cancers hormonodépendants en combinaison avec l'exemestane, suite à un échec des traitements au letrozole ou anastrozole (Baselga *et al.*, 2012). De nombreuses molécules ciblant d'autres mécanismes sont en cours d'essais cliniques (phases 3) telles que des inhibiteurs de PI3K, comme l'alpelisib (NCT02437318) et le tselisib (NCT02340221), ou

INTRODUCTION

encore des inhibiteurs d'histone déacétylases comme l'Entinostat (NCT02115282) (Dickler *et al.*, 2018; Perez, 2016; Yardley *et al.*, 2013).

✓ Les cancers du sein HER2+

L'introduction des thérapies ciblant HER2 depuis une quinzaine d'années a permis d'améliorer considérablement la survie des patientes atteintes par ce type de cancer du sein. En effet, la médiane de survie globale de ces patientes est passée d'environ 20 mois à 5 ans (Baselga *et al.*, 2012). Actuellement, toutes les thérapies ciblées approuvées par la FDA et utilisées pour le traitement des cancers HER2+ sont basées sur le ciblage du récepteur HER2 grâce à des anticorps monoclonaux ou à des inhibiteurs de tyrosine kinase. Ainsi, les anticorps monoclonaux Trastuzumab et Pertuzumab se fixent sur le domaine extracellulaire d'HER2 permettant le blocage de son hétérodimérisation et de son activation. Le lapatinib, un inhibiteur de tyrosine kinases ciblant à la fois HER2 et EGFR, fut approuvé par la FDA en 2007 puis l'ado-trastuzumab emtansine, un agent composé d'un anticorps trastuzumab couplé à un inhibiteur de microtubules, fut approuvé en 2013 (Abreu *et al.*, 2014; Figueroa-Magalhães *et al.*, 2014). Actuellement, les recommandations pour le traitement d'un cancer du sein HER2+ sont un traitement néoadjuvant avec une combinaison de chimiothérapie et une thérapie ciblant HER2, suivi d'une chirurgie, d'une radiothérapie et enfin de 12 mois de thérapies ciblant HER2 (Wuerstlein et Harbeck, 2017).

Malgré les thérapies ciblant HER2 développées ces dernières années, la résistance à ces thérapies reste un problème conséquent qui a conduit au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'outrepasser les résistances innées ou acquises aux traitements actuels. Actuellement, de nouvelles drogues ou combinaisons de traitements sont en cours d'évaluation à différents stades d'essais cliniques. Des inhibiteurs de kinases intracellulaires montrent actuellement des résultats encourageants comme les inhibiteurs de PI3K buparlisib et pilaralisib qui ont montré une bonne efficacité en combinaison avec le lapatinib ou le trastuzumab dans des essais cliniques de phase 1 chez des tumeurs HER2+ avancées (Guerin *et al.*, 2017; Saura *et al.*, 2014). L'inhibiteur de mTOR, l'Everolimus, utilisé en combinaison avec le trastuzumab et le paclitaxel a montré un bénéfice clinique uniquement chez les patients atteints d'un cancer HER2+ et hormonoindépendant (Hurvitz *et al.*, 2015). De nouveaux inhibiteurs ciblant la famille des récepteurs HER sont également en cours d'investigation. C'est le cas du Neratinib, un inhibiteur irréversible des récepteurs HER1, HER2

INTRODUCTION

et HER4, qui a significativement amélioré la survie des patientes atteintes par un cancer du sein HER2+ lorsqu'il fut administré après une chimiothérapie et une thérapie adjuvante à base de trastuzumab en essai clinique de phase 3 (Chan *et al.*, 2016). Parmi les autres stratégies thérapeutiques en développement pour les cancers HER2+, on compte également les inhibiteurs de Farnesyl transférase qui vont empêcher l'insertion à la membrane et la localisation juxtamembranaire de la protéine Ras en inhibant sa farnésylation, comme le Lonafarnib qui a montré un avantage en essai clinique de phase 1 lorsqu'il est utilisé en combinaison avec le trastuzumab et le paclitaxel (Milojkovic Kerklaan *et al.*, 2013). Enfin, un peptide immunogène dérivé du domaine extracellulaire d'HER2, le Nelipepimut-S, a été utilisé comme vaccin pour prévenir la récurrence clinique chez des patientes à haut-risque (Mittendorf *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2018).

✓ Les cancers du sein Triple-négatifs

Les cancers du sein triple-négatifs sont plus agressifs et plus difficiles à traiter comparés aux cancers du sein de type luminal et HER2+. En effet, à l'heure actuelle, il n'existe aucune thérapie ciblée approuvée pour le traitement des cancers du sein triple-négatifs. Seul le bevacizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) permettant d'inhiber la néovascularisation de la tumeur et le processus métastatique, fut approuvée en 2008 par la FDA pour le traitement en première ligne de cancers HER2 négatifs en combinaison avec le paclitaxel (Berrada *et al.*, 2010; Mayer *et al.*, 2014). Cependant, cette indication fut retirée en 2011 dû au manque d'efficacité de cette molécule. Les stratégies thérapeutiques actuelles reposent donc sur l'utilisation de la chimiothérapie.

Le manque de biomarqueurs et donc de thérapies ciblées font de ce type de cancer du sein le cancer du sein ayant le plus mauvais pronostic. Ainsi, il est impératif de poursuivre la recherche de thérapies ciblées pour ce type de cancers afin de permettre une meilleure prise en charge des patientes et notamment la diminution des effets secondaires induits par la chimiothérapie. Parmi les stratégies les plus prometteuses, on compte tout d'abord les inhibiteurs de PARP (*Poly(ADP-Ribose) Polymérase*) qui ont montré un bénéfice clinique chez des patientes atteintes d'un cancer du sein triple-négatif et portant une mutation germinale *BRCA1/BRCA2* (Bryant *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2004). En effet, l'enzyme PARP répare les cassures simple-brins de l'ADN tandis que les gènes *BRCA1* et *BRCA2* codent pour des protéines qui réparent les cassures double-brins par recombinaison homologue. L'inhibition

INTRODUCTION

de PARP va mener à l'accumulation de cassures simple-brins résultant en l'apparition de cassures double-brins. Les cellules cancéreuses portant une mutation dans les gènes *BRCA* sont incapables de réparer les cassures double-brins ce qui conduit à la mort cellulaire. La combinaison d'un inhibiteur de PARP et des gènes *BRCA* mutés mènent donc à une élimination accrue des cellules cancéreuses (Fong *et al.*, 2009; Geenen *et al.*, 2018; Sonnenblick *et al.*, 2015). Ainsi, dans un essai clinique de phase 3, l'Olaparib a permis d'augmenter la survie sans progression de 2,8 mois et de diminuer le risque de progression ou de mort de 42 % par rapport à une chimiothérapie standard (Robson *et al.*, 2017). Trois autres inhibiteurs sont en cours d'essais cliniques de phase 3 : le Talazoparib (NCT01945775), le Veliparib (NCT02163694) et le Niraparib (NCT01905592).

Le récepteur EGFR est surexprimé dans les cancers du sein triple-négatifs ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle. De nombreux essais cliniques de phase 2 ont évalué l'intérêt du cetuximab en combinaison avec le cisplatine pour le traitement des cancers métastatiques triple-négatifs et ont montré que l'ajout du cetuximab augmentait la survie globale et la survie sans progression par rapport au cisplatine seul (Baselga *et al.*, 2013; Carey *et al.*, 2012). Une réponse plus favorable pourrait être corrélée avec des tumeurs présentant une faible expression de la chaîne B de la cristalline alpha, une forte expression de *PTEN* et une perte d'expression de *KRAS* (Tomao *et al.*, 2015). La signalisation sous-jacente à l'EGFR (et à d'autres RTKs) a également fait l'objet d'un ciblage thérapeutique dans les cancers triple-négatifs notamment avec le Dasatinib, un inhibiteur de kinases multiples incluant SRC, qui a été testé en essai clinique de phase 2 en tant que monothérapie (Finn *et al.*, 2011). Cet essai clinique a montré que le Dasatinib en tant qu'agent seul avait un bénéfice clinique limité tandis que la combinaison du dasatinib avec le cetuximab et le cisplatine a montré une augmentation d'apoptose, une diminution de la migration cellulaire et de l'invasion dans les lignées cellulaires (Kim *et al.*, 2013). Ainsi, il serait intéressant de tester le dasatinib non pas en monothérapie mais en combinaison avec d'autres drogues dans de futurs essais cliniques.

Tout comme l'ado-trastuzumab emtansine utilisé pour le traitement des cancers du sein HER2+, un anticorps monoclonal couplé à une drogue antimétabolite a montré des résultats encourageants pour le traitement des cancers du sein triple-négatifs. Le Glematumumab Vedotin (GV) est un anticorps monoclonal ciblant la glycoprotéine NMB (*Non Metastatic B*) et couplé à un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline, la

INTRODUCTION

monométhyl auristatin E (MMAE) (Rose *et al.*, 2017). La glycoprotéine NMB est surexprimée dans 40 % des cancers du sein triple-négatifs et son activité a été liée à une augmentation de la migration, de l'invasion et du processus métastatique dans les cellules cancéreuses mammaires (Maric *et al.*, 2015; Rose *et al.*, 2010a, 2010b). Lors d'un essai clinique de phase 2, une augmentation des survies globales et sans progression a été observée chez les patientes atteintes d'un cancer du sein triple-négatif et présentant une surexpression de la glycoprotéine NMB (Yardley *et al.*, 2015). Un autre essai clinique de phase 2 comparant les effets de cette thérapie ciblée à la capécitabine pour le traitement de patientes atteintes d'un cancer du sein triple-négatif et exprimant la glycoprotéine NMB a été lancé en Novembre 2013 (NCT01997333). Cet essai a malheureusement été interrompu en avril 2018 au vu du manque de bénéfice clinique de la molécule comparée à la chimiothérapie (Fitzhugh, 2018). Enfin, l'immunothérapie s'avère également être une stratégie clinique prometteuse pour le traitement des cancers du sein triple-négatifs notamment *via* le ciblage du récepteur PD-1 (*Programmed cell Death 1*) présent à la surface des lymphocytes T activés. En effet, PD-1 empêche l'auto-immunité dirigée contre les cellules tumorales en se fixant à son ligand PD-L1, ce qui inhibe la réponse immunitaire menée par les cellules T (Iwai *et al.*, 2002). Ainsi, le Pembrolizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre PD-1, a démontré un bénéfice clinique durable en monothérapie chez des patientes atteintes d'un cancer du sein triple-négatif métastatique et ayant été préalablement traitées (Adams *et al.*, 2017).

Grâce au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, la courbe de mortalité du cancer du sein est en diminution ces dernières décennies. Cependant, la récurrence métastatique reste un problème majeur avec peu d'options thérapeutiques existantes. Certaines thérapies ciblées semblent prometteuses mais beaucoup présentent des résultats peu convaincants, notamment dans les cancers triple-négatifs. Ces résultats décevants peuvent être expliqués par l'hétérogénéité existant au sein du sous-type moléculaire triple-négatif. Il est important de sélectionner le sous-type adapté à chaque thérapie afin de maximiser les effets bénéfiques de la thérapie ciblée et donc s'orienter vers une thérapie personnalisée en combinant les outils de profilages moléculaires et les nouvelles thérapies ciblées (Abreu *et al.*, 2014; Trop *et al.*, 2014). Par ailleurs, des mécanismes de résistance innée ou acquise peuvent expliquer l'échec thérapeutique de certaines thérapies ciblées et il est

INTRODUCTION

également nécessaire de poursuivre la recherche de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles voies à cibler pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patientes métastatiques.

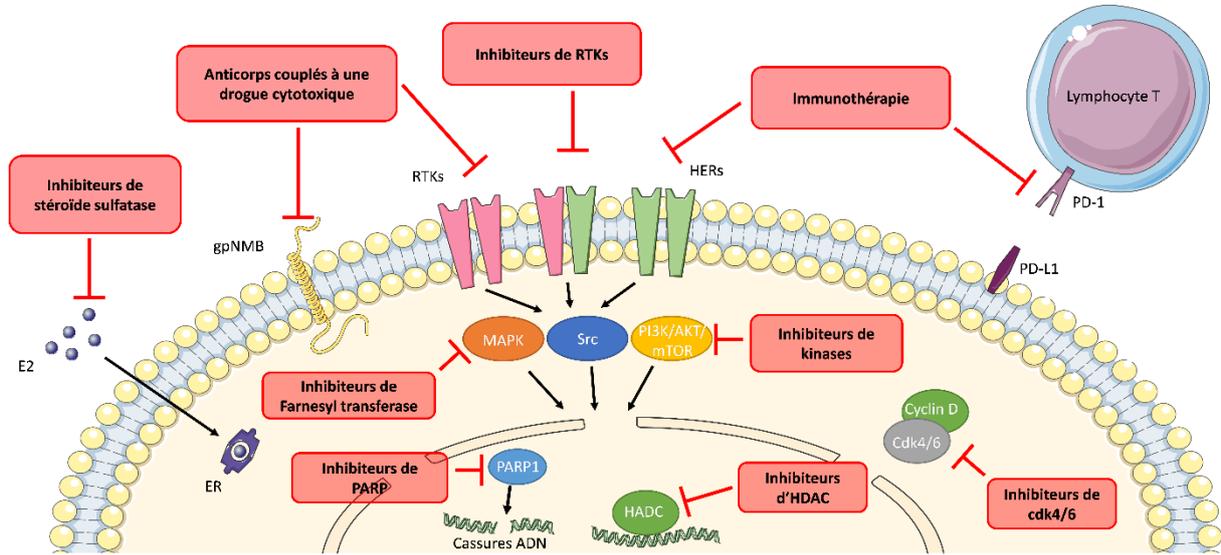


Figure 15 : Les principales thérapies ciblées envisagées pour le traitement du cancer du sein

De nouvelles options thérapeutiques prometteuses sont en cours d'essais cliniques afin de proposer un ciblage efficace des différentes voies oncogéniques du cancer du sein. En effet, bien que certaines voies aient déjà été préalablement ciblées comme en hormonothérapie ou le ciblage des RTKs et kinases intracellulaires, des résistances à ces traitements sont constatées. Ainsi, il est nécessaire de proposer de nouvelles drogues alternatives même dans des domaines déjà explorés afin d'outrepasser ces résistances. D'autres voies sont également à l'étude telles que l'inhibition des protéines nucléaires PARP ou des HDACs.

INTRODUCTION

II. Le (pro)NGF dans le cancer du sein

Le Nerve Growth Factor et ses paralogues (BDNF, NT-3 et NT-4/5) forment la famille de facteurs de croissance appelés les neurotrophines. Bien que leurs rôles soient bien décrits dans le développement du système nerveux, il est de plus en plus évident que les neurotrophines, et notamment le NGF et son précurseur, le proNGF, ont un rôle dans le développement de plusieurs types de cancer, notamment dans le cancer du sein. Des traitements ciblant les neurotrophines et leurs voies de signalisation ont d'ailleurs fait l'objet d'études cliniques mais des voies de résistance semblent limiter l'efficacité de ces traitements ciblées.

A. Le NGF et son précurseur

Le NGF a été la première neurotrophine découverte, il y a maintenant plus de 50 ans, grâce à la découverte de ses effets sur le développement neuronal dans des embryons de poulet (Bueker, 1948; Levi-Montalcini et Hamburger, 1951). La protéine fut par la suite purifiée (Cohen, 1960) et reconnue comme un membre de la famille des neurotrophines qui comprend également le brain-derived neurotrophic factor (BDNF), la neurotrophin-3 (NT-3) et la neurotrophin-4/5 (NT-4/5) (Chao, 2003). Pour la découverte du premier facteur de croissance, Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen furent récompensés par l'attribution du prix Nobel de médecine en 1984.

1. Synthèse et maturation du (pro)NGF

Le gène codant pour le NGF est localisé sur le chromosome 1 chez l'homme, précisément en position 1p13.2 (Gene ID : 4803, NCBI). Celui-ci est constitué de trois exons mais l'ARNm transcrits sera issu d'un seul exon codant. Deux transcrits majeurs peuvent conduire, par épissage alternatif, à la formation de deux formes de pré-proNGF de 27 et 34 kDa (Edwards *et al.*, 1988; Fahnstock *et al.*, 2004) (Figure 16). Le pré-ARNm code pour un peptide signal qui redirige le complexe de traduction au niveau du réticulum endoplasmique granuleux (REG) (Martoglio, 2003). En conséquence, la protéine est séquestrée dans le REG et le clivage du peptide signal résulte en la création du proNGF qui va alors spontanément former des homodimères de proNGF grâce à des liaisons hydrogènes (Trabjerg *et al.*, 2017). Deux formes de proNGF de 25 et 32 kDa ont à ce jour été mis en évidence, qui sont ensuite glycosylées pour donner une forme principale d'environ 40 kDa (Al-Shawi *et al.*, 2007). Parmi

INTRODUCTION

ces glycosylations, on compte deux sites de N-glycosylations (Asn⁶⁹ et Asn¹¹⁴) ainsi que trois sites potentiels de O-glycosylations (Ser⁹⁰, Thr⁹¹ et Thr¹⁰⁰) (Trabjerg *et al.*, 2017). Pour former le NGF mature (de 13,2 kDa), le proNGF va être clivé soit en intracellulaire, soit en extracellulaire (Lessmann *et al.*, 2003). Lorsque le clivage est intracellulaire, il est effectué par la famille de convertases subtilisin-kexin et notamment la furine (Bresnahan *et al.*, 1990; Seidah *et al.*, 1996, 1999). Lorsqu'il est extracellulaire, il est effectué par des protéases telles que la plasmine ou les MMP-3 et 7 (Le et Friedman, 2012; Lee *et al.*, 2001). Que le clivage soit intra- ou extracellulaire, il est effectué au niveau de la même séquence consensus (R-X-K/R-R) (Lim *et al.*, 2007). Deux domaines d'acides aminés dibasiques présents dans le propeptide pourraient également avoir un rôle important pour le clivage protéolytique (Suter *et al.*, 1991). D'autres études ont montré l'importance de la proséquence dans le clivage protéolytique, la maturation et la sécrétion du NGF notamment *via* la participation de deux sites de N-glycosylations (Rafieva *et al.*, 2012; Rafieva et Gasanov, 2016).

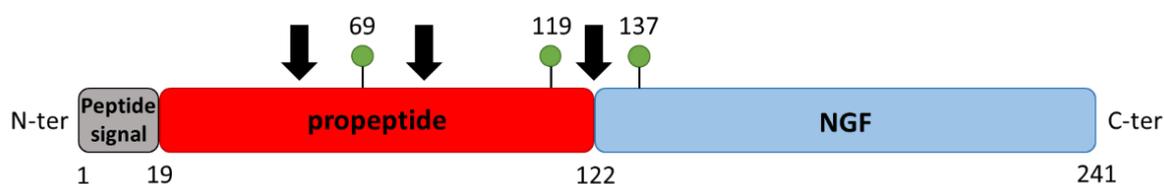


Figure 16 : Représentation schématique du préproNGF

Le préproNGF est constitué d'un peptide signal (en gris), d'un propeptide (en rouge) ainsi que de la partie mature du NGF (en bleu). Les sites impliqués dans le clivage protéolytique sont indiqués par des flèches noires. Les sites potentiels de N-glycosylation sont indiqués par les motifs \uparrow (adaptée de Rafieva *et al.*, 2012). N-ter : extrémité N-terminale, C-ter : extrémité C-terminale.

2. Structures protéiques du (pro)NGF

La structure du NGF a été déterminée par radiocristallographie en 1991 (McDonald *et al.*, 1991), révélant un repliement protéique unique (Figure 17.A). Le monomère de NGF possède une forme allongée dont la partie centrale est composée de deux paires de feuillets β antiparallèles et tordus ($\beta 1$ - $\beta 4$). Un côté de la protéine contient trois boucles en épingle à cheveux tandis que l'autre côté est composé d'un nœud cystéine, formé par trois ponts disulfures, qui stabilise la conformation de la protéine. Dans sa conformation biologiquement active, deux monomères sont arrangés d'une manière parallèle et non covalente afin de

INTRODUCTION

former un homodimère de 26 kDa portant le nom de β -NGF (Figure 17.B) (Wiesmann et de Vos, 2001). Les tentatives de cristallisation du proNGF sont à ce jour restées infructueuses, ce qui est probablement dû à sa structure très flexible (Paoletti *et al.*, 2006) (Figure 17.C). Cependant, d'autres types d'analyses ont permis de montrer que la structure du propeptide seul est irrégulière en absence de sa partie mature mais pourrait avoir un rôle de chaperonne du proNGF natif en interagissant avec sa partie mature (Kliemann *et al.*, 2007, 2004). Cependant, d'autres études ont démontré que les formes natives et matures du proNGF n'existaient que sous forme de dimère (Rattenholl *et al.*, 2001). Dans cette conformation active, la présence du propeptide aurait pour conséquence une modulation de l'affinité entre le proNGF mature et les récepteurs Trks notamment *via* le masquage du W²¹ situé au niveau de la séquence du NGF mature (Kliemann *et al.*, 2007) expliquant la faible affinité du proNGF pour les récepteurs Trks. De façon similaire, la modification structurale de la partie mature du proNGF par le propeptide permettrait son interaction avec le récepteur p75^{NTR} (Pimenta *et al.*, 2014). Enfin, la séquence même du propeptide serait à l'origine de l'interaction entre le proNGF et la sortiline (Nykjaer *et al.*, 2004).

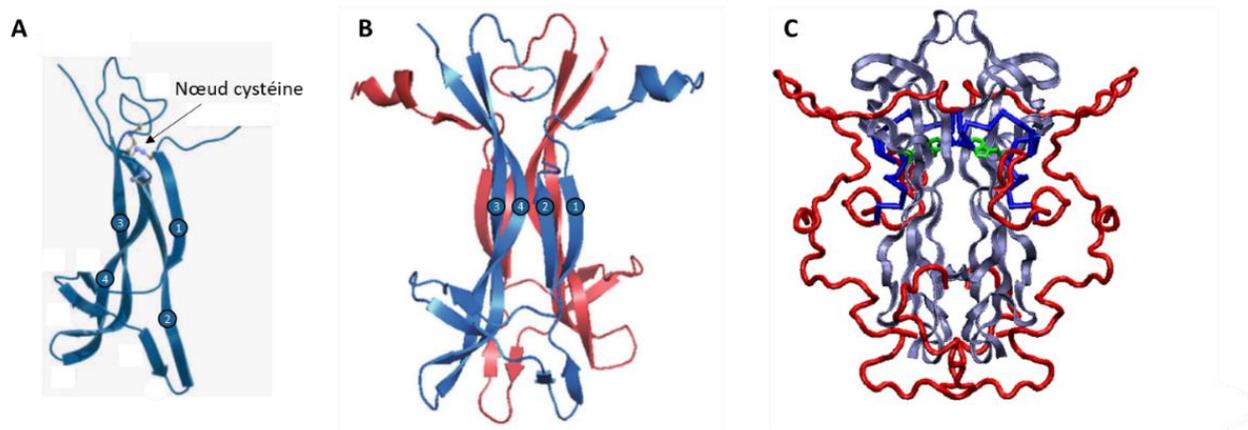


Figure 17 : Structures protéiques du NGF et du proNGF

A : Monomère de NGF composé de 4 feuillets β (notés de 1 à 4) et d'un nœud cystéine indiqué par une flèche noire (adaptée de Wiesmann et De Vos, 2001). B : Dimère de NGF constitué par deux protomères de NGF (un rouge et un bleu). On peut noter les positions des quatre feuillets β précédemment annotés en A (adaptée de Zhang *et al.*, 2011). C : Dimère de proNGF avec en violet les parties matures du NGF, et en rouge les parties propeptidiques. Les annotations bleues et vertes constituent la zone d'interaction entre les deux protomères (adaptée de Paoletti *et al.*, 2011).

INTRODUCTION

3. Expression et rôles physiologiques du (pro)NGF

NGF mature : En tant que membre de la famille des neurotrophines, le NGF est un facteur de croissance principalement associé au développement des systèmes nerveux central et périphérique (Barde, 1990). Initialement, Le NGF fut purifié en tant que facteur capable de réguler la survie de neurones en culture (revue dans Levi-Montalcini, 1987). Il est produit par les cellules accessoires du système nerveux, telles que les astrocytes et les oligodendrocytes, qui vont à leur tour réguler la survie et la différenciation des neurones. Celui-ci est donc retrouvé dans de nombreux organes car son niveau d'expression est dépendant de l'innervation de l'organe cible (Korsching, 1993). Ainsi, on le retrouve en forte quantité dans le cœur et la rate qui sont deux organes fortement innervés et son expression reste 20 fois plus élevée dans le cerveau par rapport aux autres organes (Shelton et Reichardt, 1986; Yamamoto *et al.*, 1996). Le NGF peut également être produit par des cellules non neuronales telles que les cellules épithéliales, les cellules immunitaires, les kératinocytes ou encore les cellules musculaires lisses (Lambiase *et al.*, 2004; Micera *et al.*, 2003). Ainsi, le NGF est considéré comme un facteur pléiotrope car il a été montré comme participant à de nombreux mécanismes aussi bien durant l'embryogenèse que pendant l'âge adulte. Par exemple, le NGF agit en tant que facteur neurotrophique essentiel à l'innervation des organes, notamment du cœur où il a été montré qu'une surexpression du NGF obtenue dans une souris transgénique conduisait à une augmentation à la fois de la taille et du nombre de neurones (Hassankhani *et al.*, 1995). Le NGF participe également à la réparation tissulaire, à l'inflammation ou encore à l'angiogénèse (Glebova et Ginty, 2004; Micera *et al.*, 2007; Nico *et al.*, 2008; Schenck *et al.*, 2017). De plus, le NGF est activement étudié pour ses rôles dans l'induction de la douleur et de l'hyperalgésie *via* les récepteurs nociceptifs (ou nocicepteurs) et des thérapies anti-NGF sont actuellement à l'étude pour contrer ces effets (Denk *et al.*, 2017; Petty *et al.*, 1994).

proNGF : Le précurseur du NGF fut longtemps considéré comme n'ayant aucune activité biologique, servant uniquement à la bonne mise en conformation du NGF mature (Edwards *et al.*, 1988; Suter *et al.*, 1991). Cependant, les données surprenantes montrant que l'activation du récepteur p75^{NTR} pouvait être effectuée par le NGF et provoquer l'apoptose des cellules neuronales en absence de la signalisation de Trk amenèrent à reconsidérer ces précédentes informations (Bamji *et al.*, 1998; Frade et Barde, 1999). Ce n'est qu'au début des années 2000 que le proNGF fut découvert comme ligand spécifique de p75^{NTR} provoquant l'apoptose des

INTRODUCTION

cellules neuronales (Ibáñez, 2002; Lee *et al.*, 2001; Teng *et al.*, 2010). Cette découverte a permis d'expliquer le paradoxe des effets pro-survie et proapoptotique alloués précédemment au NGF mais aussi la diversité des mécanismes dans lesquelles les neurotrophines pouvaient être impliquées. Suite à ces observations, le proNGF fut retrouvé dans de nombreux tissus (Hempstead, 2014) et s'est même avéré être la forme la plus abondante du NGF dans le cerveau, après détection par Western Blot (Fahnestock *et al.*, 2001). De nombreux études ont validé l'effet du proNGF sur l'apoptose des cellules neuronales et celui-ci est d'ailleurs impliqué dans de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Fahnestock *et al.*, 2001; Pedraza *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2004), l'encéphalopathie spongiforme (Stoica *et al.*, 2008) ou encore la maladie de Parkinson (Chen *et al.*, 2008). De la même manière, une augmentation de l'expression de proNGF a été reportée dans les neurones sympathiques des tissus âgés, faisant du proNGF un acteur majeur de la perte neuronale liée à l'âge (Bierl et Isaacson, 2007). Des thérapies ciblant les voies du proNGF, notamment des antagonistes de l'interaction proNGF/p75^{NTR} ont d'ailleurs été proposées afin de prévenir cette mort neuronale (Massa *et al.*, 2006). Outre son effet proapoptotique sur les neurones, le proNGF peut également avoir le même effet sur d'autres types cellulaires tels que les cellules musculaires lisses (Campagnolo *et al.*, 2014; Urban *et al.*, 2013) ou encore les cellules NK (*Natural Killers*) (Rogers *et al.*, 2010). De manière surprenante, le proNGF semble également avoir des effets neurotrophiques, bien qu'ils soient plus faibles que pour sa forme mature (Fahnestock *et al.*, 2004). Cette observation a récemment été expliquée par une modulation des niveaux de récepteurs associés au NGF et à son précurseur, notamment TrkA et p75^{NTR}, qui permettrait la mise en place de différents complexes préférentiels aboutissant à des signalisations opposées (Ioannou et Fahnestock, 2017). Ainsi, le complexe sortiline/proNGF/TrkA permettrait la survie cellulaire tandis que le complexe sortiline/proNGF/p75^{NTR} conduirait à la mort cellulaire. L'ensemble de ces informations démontre l'existence d'une balance complexe entre NGF et proNGF contrôlant le développement de différents types cellulaires, en particulier le système nerveux sympathique, dans de nombreux organes. Cette balance semble être finement régulée par un contrôle de la synthèse, de la sécrétion, du clivage du proNGF mais aussi des niveaux de récepteurs associés au (pro)NGF à la membrane.

INTRODUCTION

B. Les récepteurs du (pro)NGF

A ce jour, trois récepteurs mettent en place les signalisations associées au NGF et à son précurseur : le récepteur commun à l'ensemble des (pro)neurotrophines : p75^{NTR}, le récepteur de haute affinité au NGF : TrkA, et le récepteur de haute affinité au proNGF : la sortiline.

1. Le récepteur du NGF : TrkA

a. Découverte

TrkA fut le premier membre de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase Trk à être découvert en 1986 (Martin-Zanca *et al.*, 1986). Les auteurs mirent alors en avant l'existence, dans le cancer du côlon humain, d'un oncogène résultant de la fusion des séquences d'une partie intracellulaire d'un récepteur encore inconnu et de la partie extracellulaire de la tropomyosine, qu'ils nommèrent en conséquence *trk* (*tropomyosin receptor kinase*). C'est en 1989 que la caractérisation précise de cet oncogène fut effectuée et que la protéine résultante, gp140Trk, fut reliée au récepteur de haute affinité au NGF dont la présence était soupçonnée à l'époque (Kaplan *et al.*, 1991; Martin-Zanca *et al.*, 1989). La découverte et la caractérisation des autres membres de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase TrkB et TrkC permis ensuite de désigner la protéine gp140Trk comme le premier membre de cette famille et celle-ci fut alors renommée TrkA (Huang et Reichardt, 2003).

b. Structure

Le récepteur TrkA appartient à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Il est codé par le gène *NTRK1* (*Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1*) situé sur le chromosome 1 humain en position 1q23.1 (NCBI, Gene ID : 4914). Le gène *NTRK1* a été initialement décrit comme possédant 17 exons et s'étendant sur environ 23 kb (Martin-Zanca *et al.*, 1989). Cependant, une étude récente a mis en évidence l'existence de 4 nouveaux exons (nommés A à D) situés en 5' du gène humain *NTRK1* et l'agrandissant à une taille de 67 kb (Luberg *et al.*, 2015). D'après cette même étude, le gène *NTRK1* serait chevauché entièrement par le gène *INSRR* (*Insulin Receptor Related Receptor*) et partiellement par le gène *SH2D2A* (*SH2 Domain Containing 2A*). L'équipe de Luberg met ainsi en évidence l'existence de nouveaux sites d'initiation de la transcription ainsi que de nouveaux profils d'épissage

INTRODUCTION

alternatif pour le gène *NTRK1*, suggérant l'existence de nombreuses isoformes (développé dans la partie II.B.1.c. : Les isoformes de TrkA).

L'isoforme contenant l'ensemble des exons du récepteur TrkA, appelée TrkA-II, est un récepteur transmembranaire de 796 acides aminés organisé en un domaine extracellulaire de 413 acides aminés, un domaine transmembranaire de 26 acides aminés et un domaine intracellulaire de 357 acides aminés. Son poids moléculaire est de 140 kDa une fois que la protéine est pleinement glycosylée (Figure 18).

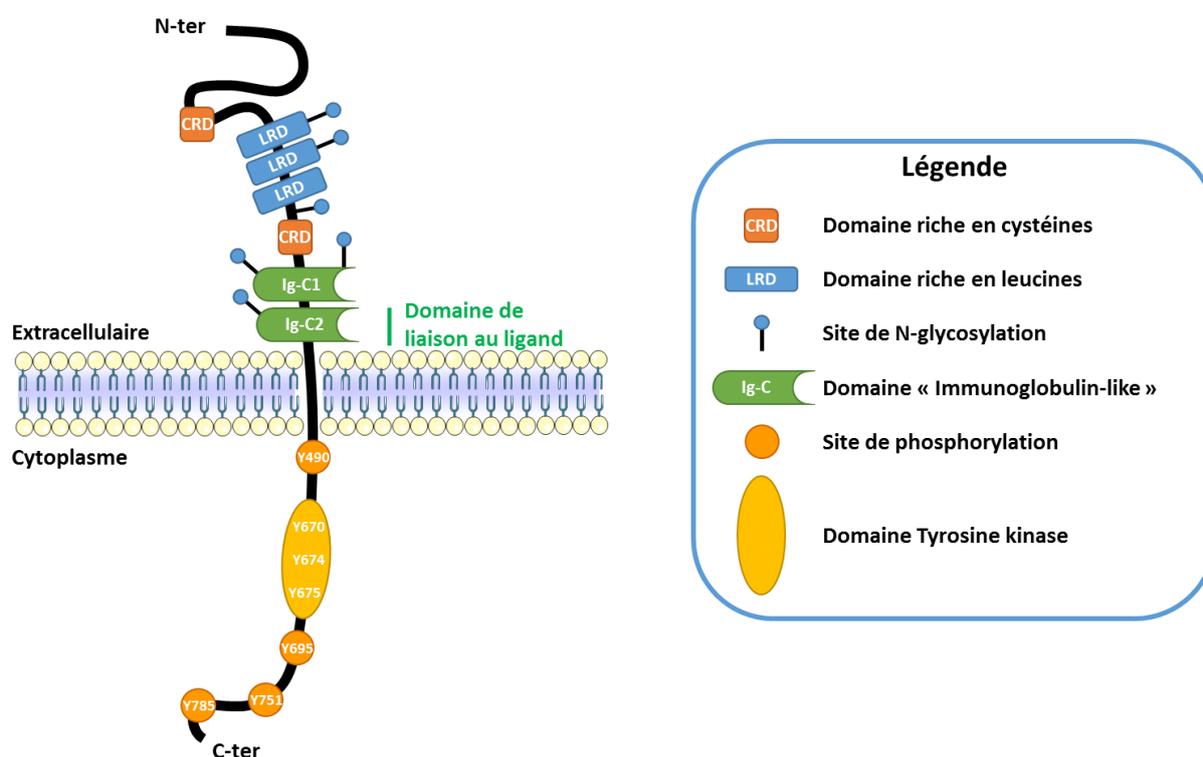


Figure 18 : Représentation schématique du récepteur TrkA

Le récepteur TrkA est constitué d'une partie extracellulaire contenant 3 domaines riches en leucines (LRD) entourés de deux domaines riches en cystéines (CRD) ainsi que deux domaines « Immunoglobulin-like » (Ig-C1 et 2) proches de la membrane. L'ensemble de ces domaines et les N-glycosylations présentes participent à la régulation de la fixation du ligand mais seul le domaine Ig-C2 interagit physiquement avec le NGF. La partie transmembranaire est importante pour l'adressage du récepteur à la membrane ainsi que pour la transduction du signal. La partie cytoplasmique est responsable de l'activation du récepteur car elle contient l'activité catalytique du récepteur représentée par un domaine tyrosine kinase et par plusieurs autres tyrosines phosphorylables. Les numéros de tyrosines mentionnées dans ce schéma correspondent à celles de l'isoforme TrkA-I.

INTRODUCTION

Cinq sous-domaines composent le domaine extracellulaire du récepteur TrkA : une région constituée de 3 motifs riches en leucines appelée LRD (*Leucine Rich Domain*) ou TrkA-D2, deux régions riches en cystéines nommées TrkA-D1 et –D3 situées de part et d'autre de la région TrkA-D2, et deux régions « Immunoglobulin-like » nommées Ig-C1 et Ig-C2, ou TrkA-D4 et -D5, situées dans la partie juxtamembranaire du récepteur (Schneider et Schweiger, 1991). L'ensemble des régions qui composent la partie extracellulaire de TrkA participerait à la fixation du ligand et à la régulation de son activation (Arevalo *et al.*, 2001; MacDonald et Meakin, 1996). Plus précisément, la modélisation par cristallographie de l'ectodomaine de TrkA associé au NGF a montré que le domaine D5 est le seul domaine qui interagit physiquement avec le NGF (Wehrman *et al.*, 2007). Même si le domaine D4 n'interagit pas physiquement avec le NGF, les études ont montré qu'il était nécessaire à l'expression, à la mise en conformation ainsi qu'à l'adressage du récepteur TrkA à la membrane plasmique (Holden *et al.*, 1997; Urfer *et al.*, 1995). L'importance de ces deux domaines « Immunoglobulin-like » est encore souligné par le fait qu'ils seraient nécessaires pour la prévention de l'auto-activation du récepteur en absence de ligand, en stabilisant les formes monomériques de TrkA (Arevalo *et al.*, 2000). Par ailleurs, 13 sites potentiels de N-glycosylation existent au sein de la partie extracellulaire du récepteur TrkA mais seulement 6 ont pu être identifiés lors de la modélisation du complexe NGF/TrkA par cristallographie (Wehrman *et al.*, 2007). L'absence de glycosylation du récepteur conduit à une autophosphorylation du récepteur, à une activité kinase constitutive ainsi qu'à une incapacité à être dirigée à la membrane (Jullien *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 1999).

Le domaine transmembranaire a un rôle de stabilisation du récepteur TrkA à la membrane ainsi que dans la transduction du signal car il a été montré que l'introduction d'une mutation dans ce domaine altère l'activation de la voie de signalisation passant par ERK (Monshipouri *et al.*, 2000). Quant au domaine intracellulaire, il est défini par la présence d'un domaine tyrosine kinase et de différentes tyrosines qui constituent des sites potentiels de phosphorylation. Au sein du domaine kinase, trois tyrosines (Y⁶⁷⁰, Y⁶⁷⁴ et Y⁶⁷⁵) permettent la trans-autophosphorylation de TrkA (Cunningham *et al.*, 1997). En dehors du domaine kinase, la tyrosine 490 localisée en juxtamembranaire et les tyrosines 695, 751 et 785 sont essentielles pour la transmission du signal intracellulaire car elles déterminent le recrutement de protéines adaptatrices spécifiques (Bradshaw *et al.*, 2013; Obermeier *et al.*, 1993a, 1993b;

INTRODUCTION

[Stephens et al., 1994](#)). De plus, d'autres tyrosines pourraient aussi intervenir dans l'internalisation et le transport de TrkA comme cela a été montré avec la tyrosine 701 ([de Pablo et al., 2008](#)).

c. Les isoformes de TrkA

Le gène *NTRK1* est la cible d'épissage alternatif ce qui résulte en la synthèse de différentes isoformes protéiques. Pendant longtemps, seules 3 isoformes humaines (TrkA-I, -II et -III) et deux isoformes présentes chez le rat (TrkA-L0 et -L1) ont été décrites. TrkA-II est l'isoforme résultant de la transcription de l'ensemble des exons. L'exon 9 est épissé dans l'isoforme TrkA-I, ce qui lui enlève une séquence de 6 acides aminés entre le domaine Ig-C2 et le domaine transmembranaire. L'isoforme TrkA-II est majoritairement exprimée dans les tissus neuronaux et la forme TrkA-I dans les tissus non-neuronaux. Ils ne semble pas y avoir de différences entre les deux isoformes dans la liaison au NGF ([Barker et al., 1993](#)). Cependant, la liaison de la neurotrophine NT-3 est significativement supérieure pour l'isoforme TrkA-II suggérant un rôle dans la sélection du ligand pour l'exon 9 ([Clary et Reichardt, 1994a](#)). Pour l'isoforme TrkA-III, ce sont les exons 6,7 et 9 qui sont épissés donnant naissance à une isoforme dans laquelle il manque le premier domaine « Immunoglobulin-like » ainsi que plusieurs sites de N-glycosylations. En conséquence, TrkA-III est incapable de fixer le NGF mais est cependant constamment autophosphorylée et activée. L'épissage alternatif qui donne naissance à l'isoforme TrkA-III est augmenté en cas d'hypoxie. Ainsi, cette isoforme est exprimée dans les progéniteurs neuronaux, dans les neuroblastomes de stade avancé et dans le thymus, un organe physiologiquement hypoxique ([Tacconelli et al., 2007, 2004](#)). Contrairement aux deux premières isoformes, TrkA-III n'est pas insérée dans la membrane plasmique mais plutôt séquestrée dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et participerait à l'instabilité génétique ([Farina et al., 2009](#)). Chez le rat, l'exon 9 peut également être épissé et il existe deux isoformes supplémentaires appelées TrkA-L0 et -L1 auxquelles il manque respectivement trois LRDs ou deux ([Barker et al., 1993; Dubus et al., 2000](#)).

Comme brièvement annoncé précédemment, un article plus récent a mis en avant une complexité accrue concernant les isoformes de TrkA ([Luberg et al., 2015](#)). En effet, l'équipe de Luberg montre que le gène *NTRK1* s'étendrait sur environ 67 kb, soit presque le triple que la taille du gène précédemment reportée. L'article suggère également l'existence de nombreuses autres isoformes non caractérisées et en décrit d'ailleurs certaines. Ainsi, une des

INTRODUCTION

isoformes dont ils rapportent l'existence, nommée TrkA_K, possède la particularité d'être clivée à la membrane ce qui résulte en la libération d'un fragment cytosolique semblant être transporté au sein du noyau. Le rôle de ce fragment reste cependant à déterminer.

d. Signalisations physiologiques de TrkA

- Activation et transduction du signal :

Il est couramment admis que les récepteurs à activité tyrosine kinase sont activés par leur dimérisation qui se produit grâce à la liaison de leur ligand (Lemmon et Schlessinger, 2010). Plus précisément, il a été démontré que la dimérisation des récepteurs n'est pas l'élément activateur de la signalisation mais plutôt un changement conformationnel des domaines intracellulaires permis suite à la fixation des ligands. Ce réarrangement des domaines cytoplasmiques conduirait au déclenchement de la cascade de signalisation intracellulaire en libérant la *cis*-autoinhibition du domaine kinase permettant alors la *trans*-autophosphorylation du récepteur, c'est-à-dire la phosphorylation d'un monomère par un autre et *vice-versa* (Finger *et al.*, 2009; Moriki *et al.*, 2001; Tao et Maruyama, 2008; Ullrich et Schlessinger, 1990). Ainsi, dans le cas du récepteur TrkA, la fixation du dimère de NGF sur le dimère de TrkA permet la « rotation » des domaines cytoplasmiques et la phosphorylation des premières tyrosines 670, 674 et 675 contenues dans le domaine kinase (Cunningham *et al.*, 1997). Les tyrosines secondaires 490, 695, 751 et 785 sont ensuite phosphorylées par *trans*-autophosphorylation (Bradshaw *et al.*, 2013; Stephens *et al.*, 1994).

Suite à l'activation du récepteur TrkA, des protéines effectrices sont recrutées au niveau des tyrosines phosphorylées afin d'assurer la transduction du signal. Ces protéines adaptatrices peuvent interagir soit directement avec les phosphotyrosines grâce à leur(s) domaine(s) SH2 (*Src homology-2*) et/ou PTB (*PhosphoTyrosine Binding domain*) (Pawson, 2004; Schlessinger et Lemmon, 2003), soit indirectement *via* leur interaction avec des protéines d'amarrages (« *docking proteins* ») qui sont phosphorylées par le récepteur (Lemmon et Schlessinger, 2010). Ces protéines adaptatrices incluent notamment FRS2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2*), IRS1 (*Insulin Receptor Substrate 1*) et la protéine « *scaffold* » Gab1 (*GRB2 Associated Binding protein 1*). Ces adaptateurs sont particulièrement importants dans la régulation de la signalisation sous-jacente car ils modulent la sélectivité et la durée du signal (Brummer *et al.*, 2010).

INTRODUCTION

Trois voies de signalisation principales sont associées à l'activation du récepteur TrkA par le NGF : la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), la voie PI3K/AKT et la voie PLC –PKC (*PhosphoLipase C – Protein Kinase C*) (Figure 19). Selon le contexte cellulaire, ces voies vont conduire à la survie et la différenciation (Huang et Reichardt, 2003).

- La voie des MAPK

L'activation de la voie des MAPK induite par l'activation de TrkA par le NGF est essentielle pour la différenciation et la survie des neurones et le choix entre ces deux effets biologiques va dépendre des protéines effectrices recrutées et de l'activation transitoire ou prolongée des acteurs de cette voie (Marshall, 1995). L'activation transitoire de la voie des MAPK nécessite le recrutement de la protéine SHC au niveau de la Y⁴⁹⁰. Après sa phosphorylation, SHC recrute la protéine adaptatrice GRB2, en complexe avec SOS (*Son of sevenless*), un GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) pour RAS (Dikic et al., 1995; Khosravi-Far et Der, 1994; Nimnual et al., 1998). La présence de Ras activée va conduire à l'activation de différentes protéines telles que PI3K, RAF ou encore p38MAPK (Huang et Reichardt, 2003; Xing et al., 1998). Quelle que soit la protéine impliquée à cette étape, la voie aboutira sur l'activation du facteur de transcription CREB (*Cyclic Adenosine 3,5-Monophosphate Response Element-Binding Protein*) impliqué dans la régulation de gènes dont les produits sont essentiels pour la différenciation et la croissance neuronale (Deak et al., 1998; Lonze et al., 2002; Xing et al., 1996). Si la cascade passe par RAF, les kinases MEK sont activées et activent à leur tour ERK1/2 qui vont activer la kinase RSK (*Ribosomal protein s6 kinase*) menant à la phosphorylation de CREB (English et al., 1999). La p38MAPK quant à elle active MAPK2 qui phosphoryle CREB (Xing et al., 1998).

L'activation prolongée de la voie des MAPK nécessite une internalisation du dimère de TrkA via la formation d'endosomes de signalisation (Howe et al., 2001; Howe et Mobley, 2004; Wu et al., 2001). Ces endosomes de signalisation sont essentiels pour le transport rétrograde du complexe NGF/TrkA permettant de mettre en place la signalisation au niveau du corps cellulaire des neurones (Grimes et al., 1996). L'endosome de signalisation est transporté jusqu'au corps neuronal par les microtubules grâce notamment à la participation de la dynéine (Heerssen et al., 2004). Suite à l'internalisation du complexe, la protéine FRS2 se lie à la tyrosine 490 et induit le recrutement de protéines telles que CRK et la Guanine nucleotide-releasing factor 2 qui vont activer la sérine thréonine kinase B-RAF (Grewal et al., 1999; Kao

INTRODUCTION

et al., 2001; Wu *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2002). La signalisation passant par B-RAF va également passer par l'activation des MAPKs et l'activation du facteur de transcription CREB (Riccio *et al.*, 1999). Le recrutement de CRK pourrait également passer par la protéine ARMS (*Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning*) plutôt que par FRS2 (Arévalo *et al.*, 2004). De façon intéressante, la phosphatase SHP2 (*Src-Homology 2 containing tyrosine Phosphatase 2*) peut également être recrutée et participer à l'activation prolongée de la voie des MAPK et plus particulièrement de la MAPK ERK5 (Rosário *et al.*, 2007). Cette voie aboutit notamment à l'activation du facteur de transcription MEF2D (*MADS box transcription Enhancer Factor 2 polypeptide D*) qui régule l'expression de gènes anti-apoptotiques comme BCL-W (Pazyra-Murphy *et al.*, 2009). Ainsi, l'activation prolongée de la voie des MAPKs aboutit à la survie neuronale plutôt qu'à la différenciation médiée par la voie transitoire.

- La voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT est essentielle pour promouvoir la survie des cellules neuronales. Après activation du récepteur TrkA par le NGF, la protéine SHC reconnaît la tyrosine 490 phosphorylée (Dikic *et al.*, 1995) et permet la formation d'un complexe avec les protéines GRB2, GAB-1 et la PI3K (Holgado-Madruga *et al.*, 1997; Korhonen *et al.*, 1999). Le recrutement de la PI3K au niveau de TrkA pourrait également être direct grâce à l'interaction de la sous-unité régulatrice p85 avec la tyrosine 751 de TrkA (Ohmichi *et al.*, 1992). La suite de la cascade de signalisation est l'activation de la protéine kinase AKT par la PI3K ce qui permettra la régulation soit de la survie neuronale par l'inhibition des actions pro-apoptotiques des protéines BAD et FORKHEAD (Brunet *et al.*, 2002; Datta *et al.*, 1997), soit de la différenciation en phosphorylant la sous-unité inhibitrice I κ B (*Inhibitor of kappa B*) ce qui mènera à la libération de NF- κ B et à sa translocation dans le noyau (Foehr *et al.*, 2000).

La voie PI3K/AKT peut également résulter de l'activation de TrkA sans la participation du NGF. En effet, les RCPGs (*Récepteur Couplé aux Protéines G*) peuvent participer à l'activation du récepteur TrkA indépendamment du NGF comme cela a été montré par l'utilisation d'agonistes de RCPGs tels que l'adénosine ou le peptide PACAP (*Pituitary adenylate cyclase activating peptide*) (Jeanneteau et Chao, 2006).

INTRODUCTION

- La voie PLC/PKC

La voie PLC/PKC est mise en place par le recrutement de la PLC- γ 1 au niveau de la tyrosine 785 du récepteur TrkA activé (Obermeier *et al.*, 1993a; Stephens *et al.*, 1994; Vetter *et al.*, 1991). La PLC- γ 1 va alors hydrolyser le PIP2 (*Phosphatidyl Inositol 4,5-biPhosphate*) pour donner naissance à deux messagers secondaires que sont l'IP3 (*Inositol 1,4,5-triPhosphate*) et le DAG (*DiAcylGlycerol*). La génération d'IP3 va conduire à la libération cytoplasmique de Ca^{2+} suite à sa fixation au niveau de son récepteur situé à la membrane du RE. Cette augmentation de la concentration calcique intracellulaire a pour conséquence l'activation des kinases dépendantes du calcium PKC et CAMK (Ca^{2+} /CALMODULIN-regulated protein Kinase). Quant au DAG, il active directement la PKC en lien avec l'augmentation de la concentration calcique dans le cytoplasme (Kim *et al.*, 2000; Singer *et al.*, 1997). La voie PLC/PKC peut directement agir sur la transcription des gènes impliqués dans la différenciation neuronale *via* l'activation du facteur de transcription CREB par les CAMK (Curtis et Finkbeiner, 1999), ou elle peut aussi interagir avec les autres voies activées par la signalisation NGF/TrkA. En effet, des études ont montré que la PKC interagit avec la voie des MAPK en phosphorylant les kinases MEK de manière indépendante de RAS (Corbit *et al.*, 1999; Wooten *et al.*, 2000) ou alors en stimulant des GEFs en amont de RAS et RAP1 (Rong *et al.*, 2003). Par ailleurs, une autre étude a permis de démontrer que la voie PLC/PKC pouvait être activée par l'activation de la protéine SRC recrutée au niveau de la tyrosine 490 de TrkA par l'intermédiaire de l'adaptateur FRS2 (Wooten *et al.*, 2001).

e. Régulation de l'activité de TrkA

De nombreux mécanismes permettent de réguler la signalisation de l'axe NGF/TrkA aussi bien pour augmenter son activité que pour la stopper. En effet, certains mécanismes responsables d'un contrôle positif de l'activité de TrkA ont déjà été abordés précédemment tels que la transactivation par les récepteurs RCPG conduisant à l'activation de la voie PI3K/AKT en absence de NGF ou encore la formation d'endosomes de signalisation permettant un contrôle spatiotemporel de l'activité de TrkA (Grimes *et al.*, 1996). Ce dernier mécanisme nécessite l'internalisation du complexe NGF/TrkA et peut également permettre le rétrocontrôle de son activité, en fonction du contexte cellulaire. Le complexe NGF/TrkA est internalisé soit par la voie classique dépendante des clathrines (Beattie *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 2001) ou par macropinocytose médiée par la protéine PINCHER (Philippidou *et al.*, 2011;

INTRODUCTION

(Valdez *et al.*, 2005). Le mécanisme de régulation est inconnu mais les deux processus semblent nécessiter les fonctions de la GTPase dynamine (Valdez *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2003) et pourraient être facilités par l'activation des voies PLC- γ 1 (Bodmer *et al.*, 2011) et PI3K (Kuruville *et al.*, 2000). Différents endosomes peuvent ainsi être formés et aboutissent à des voies différentes. Les endosomes précoces peuvent suivre une voie de recyclage, une voie de dégradation où ils fusionnent avec des lysosomes ou encore les voies de signalisation précédemment décrites (Barford *et al.*, 2018; Grimes *et al.*, 1996). Le destin de ces endosomes est finement régulé par leur composition et notamment par les protéines endosomales de la famille des petites GTPases RAB. Les endosomes précoces sont marqués par la présence de RAB5, les endosomes de recyclage sont marqués par RAB11 et les endosomes de signalisation par RAB7 (Grosshans *et al.*, 2006). Une étude récente a montré que la protéine CORONIN-1 était nécessaire à la signalisation tardive des endosomes NGF/TrkA notamment en empêchant la fusion de ces endosomes avec les lysosomes dans le corps neuronal (Suo *et al.*, 2014). Le destin de ces endosomes peut également être influencé par l'ubiquitination de TrkA. Par exemple, la poly-ubiquitination de TrkA effectuée par l'E3 ubiquitine ligase TRAF6 au niveau de la lysine 485 est impliquée dans la mise en place de cascades de signalisation mais aussi dans la dégradation du récepteur (Geetha et Wooten, 2008). De même, la mono-ubiquitination de TrkA par NEDD4-2 (*Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4-2*) au niveau de la lysine 547 favorise la dégradation du récepteur (Georgieva *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011).

Outre l'importance des endosomes de signalisation pour réguler l'activité de TrkA, d'autres mécanismes sont essentiels à la régulation de cette activité comme le recrutement de phosphatases telles que SHP-1 (Montano, 2009) ou certains membres de la famille des RPTP (*Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase*) (Shintani et Noda, 2008), le clivage du récepteur (Ancot *et al.*, 2009), ou encore l'interaction avec d'autres récepteurs membranaires. Ce dernier mécanisme sera approfondi dans la partie III.A. : Interactions entre les récepteurs du (pro)NGF.

Les principales voies de signalisation associées au récepteur TrkA décrites précédemment sont schématisées en Figure 19.

INTRODUCTION

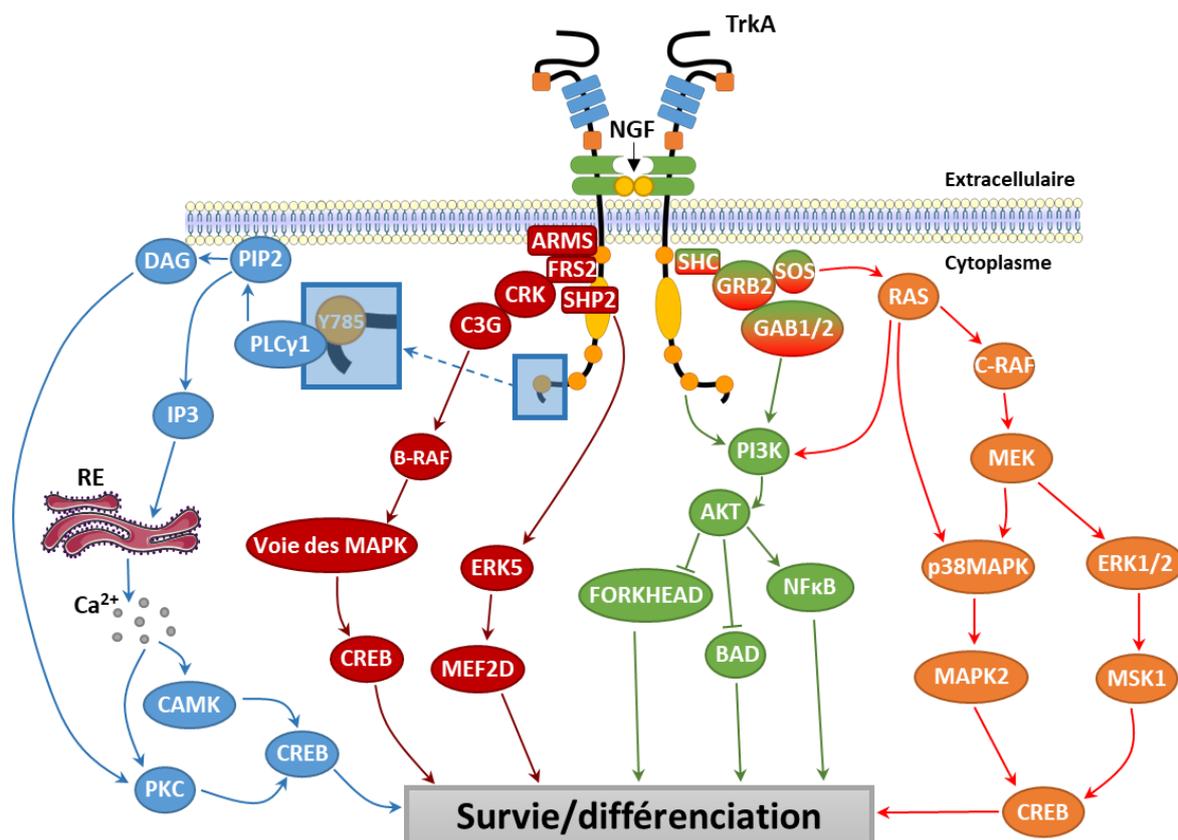


Figure 19 : Principales voies de signalisation associées à TrkA

La fixation d'un dimère de NGF sur un homodimère de TrkA en extracellulaire permet d'activer la signalisation sous-jacente de TrkA. En effet, la fixation du NGF conduit à un réarrangement des domaines cytoplasmiques du dimère, ce qui permet la trans-autophosphorylation du récepteur et le recrutement de protéines adaptatrices. Suivant les protéines recrutées et le contexte cellulaire, trois grandes voies menant à la survie et à la différenciation sont décrites : la voie PI3K/AKT (en vert), la voie des MAPK (en orange pour la voie transitoire et en rouge pour la voie prolongée) et la voie PLC/PKC (en bleu). ARMS : Ankyrin repeat-Rich Membrane Spanning protein ; BAD : Bcl2-antagonist of cell death ; C3G : Rap guanine nucleotide exchange factor 1 ; CAMK : Calcium/Calmodulin-regulated protein kinase ; CREB : Cyclic AMP-Responsive Element Binding Protein ; DAG : DiAcylGlycerol ; ERK5 : Extracellular signal-regulated kinase 5 ; FRS2 : Fibroblast growth factor receptor substrate 2 ; GAB1/2 : Grb2-associated-binding protein 1/2 ; GRB2 : Growth factor receptor-bound protein 2 ; IP3 : Inositol 1,4,5 triPhosphate ; MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase ; MEF2D : Myocyte-specific Enhancer Factor 2 ; MEK : MAPK/ERK kinase ; MSK1 : Mitogen and Stress activated protein Kinase 1 ; NFκB : Nuclear Factor kappa B ; PI3-K : PhosphoInositide 3-Kinase ; PIP2 : PosphatidylInositol 4,5 bisPosphate ; PKC : Protein Kinase C ; PLCγ : PhosphoLipase C gamma ; RE : Réticulum Endoplasmique ; SHC : Src homology-2 containing protein ; SHP2 : Src-Homology-2 containing tyrosine-protein Phosphatase ; SOS : Son Of Sevenless.

INTRODUCTION

2. Le récepteur du proNGF : la sortiline

a. Découverte

La sortiline fut découverte par trois équipes différentes en 1997 et 1998. Dans un premier temps, elle fut identifiée par l'équipe de Petersen dont le travail portait sur les mécanismes responsables de l'adressage des LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*) (Petersen *et al.*, 1997). Ensuite, ce fut l'équipe de Lin qui identifia une glycoprotéine de 110 kDa (GP110) composant les vésicules de recyclage produites en réponse à l'insuline et qui, après séquençage, détermina qu'il s'agissait de la sortiline (Lin *et al.*, 1997). Enfin, l'équipe de Mazella identifia le récepteur de la neurotensine (NTR3) qui s'est avéré être la sortiline (Mazella *et al.*, 1998).

b. Du gène à la protéine

Le gène *SORT1* codant pour la sortiline est constitué de 23 exons et s'étend sur 88 kb en position 1p13.3 (NCBI, gene ID : 6272). Son ARNm s'étend sur 7 kb et sa traduction donne naissance à une protéine de 832 acides aminés. La sortiline est exprimée dans de nombreux tissus comme le cerveau, le cœur, les os, le foie, les neurones ou encore les seins (Kjolby *et al.*, 2015). Ce récepteur fait partie de la famille des protéines à domaine Vps10 (*Vacuolar protein sorting 10*), ou famille des sortilines, qui inclue également SorLA (*Sorting protein-related receptor containing LDLR class A repeats*), SorCS1, 2 et 3 (*Sortilin-related VPS10 domain containing receptor 1, 2 et 3*) (Willnow *et al.*, 2008).

Après élimination de son peptide signal (33 acides aminés), la sortiline se présente sous la forme d'une pro-protéine contenant un propeptide de 44 acides aminés jouant un rôle essentiel dans le transport du pro-récepteur à travers la voie de synthèse, jusqu'à son clivage dans le réseau trans-Golgien par la furine (Munck Petersen *et al.*, 1999; Westergaard *et al.*, 2004). Le clivage du propeptide est essentiel pour permettre au récepteur de fixer ses ligands. La protéine mature constituée de 755 acides aminés possède une partie extracellulaire de 681 acides aminés, une partie transmembranaire de 21 acides aminés ainsi qu'une partie intracellulaire de 53 acides aminés (Figure 20).

La partie extracellulaire de ce récepteur est principalement constituée d'un domaine Vps10. Ce domaine est lui-même composé de deux régions individuelles : un domaine β -propeller qui contient 10 hélices β et un domaine composé de 10 cystéines conservées

INTRODUCTION

formant 5 ponts disulfures : le module 10CC (Hermey, 2009; Quistgaard *et al.*, 2014, 2009). De plus, les études structurales effectuées sur la sortiline ont montré l'existence d'au moins deux sites de N-glycosylations. Ces mêmes études ont permis de déterminer que le domaine β -propeller forme un « tunnel » dans lequel les ligands de la sortiline viennent se loger, comme cela a été montré pour la neurotensine (Quistgaard *et al.*, 2009). Trois résidus (YIL) situés en C-terminal de la neurotensine sont en interaction avec les hélices 5 et 6 du β -propeller dans lesquelles la sérine 283 semble permettre la formation de ponts hydrogène avec la séquence YIL de la neurotensine (Jansen *et al.*, 2007). Ce résidu n'est cependant pas impliqué dans la prise en charge des proneurotrophines car sa mutation en acide glutamique n'a aucun effet sur leur fixation à la sortiline. En revanche, il semblerait que les proneurotrophines, dont le proNGF, se fixent à une séquence linéaire exposée en surface du domaine β -propeller située entre les acides aminés 163 et 174 (Serup Andersen *et al.*, 2010).

La partie cytoplasmique du récepteur est composée de trois séquences importantes dans le recrutement de protéines de signalisation mais aussi dans le transport intracellulaire et l'endocytose (Nielsen *et al.*, 2001). Ainsi, le motif Y⁷¹⁵SVL⁷¹⁸ est impliqué dans l'endocytose du récepteur, le motif D⁷⁴⁷SDED⁷⁵¹ dans le recyclage du récepteur et le motif dileucine L⁷⁵²L⁷⁵³ est impliqué dans l'internalisation du récepteur mais aussi dans le trafic intracellulaire de protéines cytoplasmiques (Finan *et al.*, 2011; Nielsen *et al.*, 2001).

INTRODUCTION

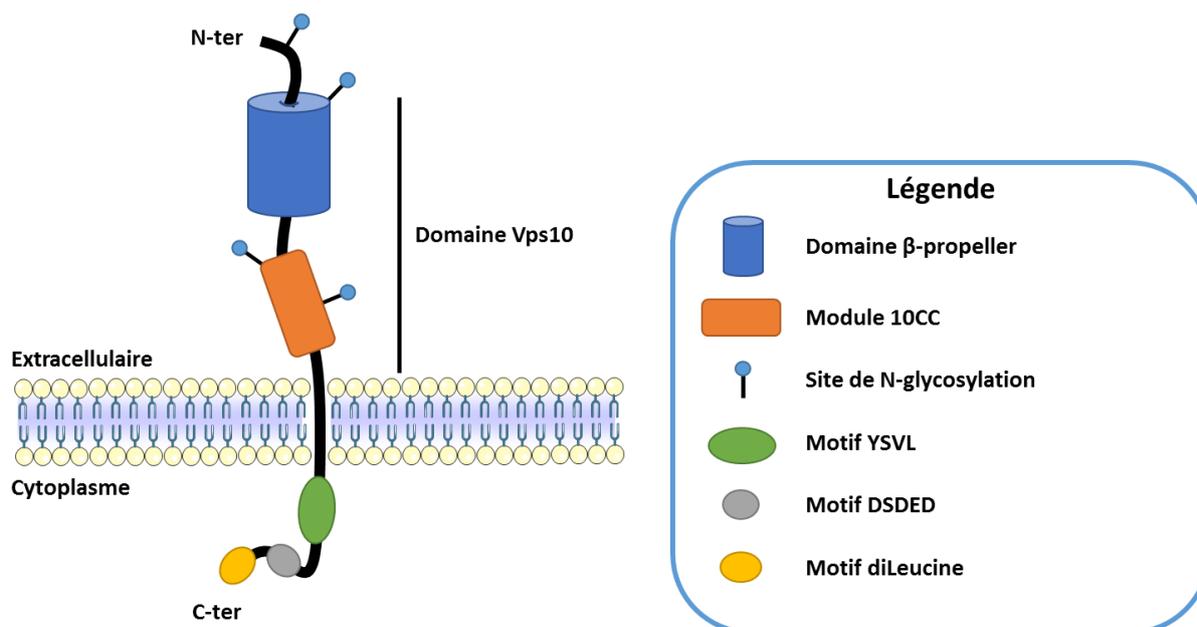


Figure 20 : Représentation schématique de la sortiline

La sortiline est un récepteur constitué d'un domaine extracellulaire représenté presque exclusivement par un domaine Vps10, caractéristique de la famille des protéines Vps10p. Ce domaine est composé d'un domaine β -propeller, caractérisé par la présence de 10 hélices β , et d'un module 10CC caractérisé par la présence de 10 cystéines conservées formant 5 ponts disulfures particulièrement importants pour la structure du domaine extracellulaire. Vient ensuite une partie transmembranaire de 21 acides aminés et une partie cytoplasmique courte de 53 acides aminés comprenant 3 séquences importantes pour la signalisation intracellulaire et l'internalisation du récepteur : un motif $Y^{715}SVL^{718}$, un motif $D^{747}SDED^{751}$ et un motif dileucine $L^{752}L^{753}$.

c. Signalisations physiologiques de la sortiline

Du fait de la structure primaire de la sortiline et notamment de la petite taille de sa queue cytoplasmique, les activités de surface de ce récepteur passent par l'interaction avec des partenaires membranaires, soulignant son rôle de co-récepteur. Cependant, la présence de la sortiline à la surface cellulaire ne représente que 10 % de son expression. En effet, la fraction restante correspond à la sortiline présente au niveau du réseau trans-golgien et est responsable de la fonction majeure de la sortiline qui est la régulation du trafic intracellulaire (Figure 21) (Petersen *et al.*, 1997).

- Rôles dans le trafic intracellulaire

La sortiline facilite l'endocytose dépendante des clathrines grâce à son interaction avec la protéine AP2 (*Activating protein 2*) au niveau de sa queue cytoplasmique (Morinville *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2001). Cette internalisation est importante pour la régulation de

INTRODUCTION

nombreux ligands de la sortiline dont les proneurotrophines (Nykjaer et Willnow, 2012) mais aussi certaines lipoprotéines telles que la progranuline (Hu *et al.*, 2010) ou l'apolipoprotéine E (Carlo *et al.*, 2013). L'internalisation des lipoprotéines par la sortiline semble d'ailleurs être un processus majeur dans beaucoup de maladies cardiovasculaires (Goettsch *et al.*, 2018; Strong *et al.*, 2014).

La sortiline régule le transport antérograde (de l'appareil de Golgi vers les endosomes) par son interaction avec les protéines adaptatrices GGA-1,-2 et -3 (*Golgi-localizing Gamma-adaptin ear factor homology domain, ADP-ribosylation factor-binding protein*) (Nielsen *et al.*, 2001; Takatsu *et al.*, 2001) mais aussi la protéine AP1 (Canuel *et al.*, 2008). *Via* ce processus, la sortiline permet l'adressage des protéines vers les lysosomes. En effet, la sortiline permet d'apporter les protéines lysosomales cathépsines D et H ou encore la sphingomyélinase au sein des lysosomes (Canuel *et al.*, 2008; Lefrancois *et al.*, 2003). De plus, l'équipe d'Evans a montré que la sortiline pouvait être clivée par la protéase extracellulaire ADAM10 (*A Disintegrin And Metalloproteinase Domain 10*) permettant de libérer l'ectodomaine de la sortiline qui semble participer à la régulation de la dégradation du BDNF (Evans *et al.*, 2011). De manière intéressante, la sortiline pourrait également être essentielle à la sécrétion des proneurotrophines et notamment à l'adressage de ces dernières aux vésicules de sécrétion car l'inhibition de la sortiline résulte en une diminution de la quantité de proBDNF sécrétée par les neurones (Chen *et al.*, 2005). Enfin, la sortiline est retrouvée dans les exosomes où elle participe à l'adressage de protéines comme l'alcaline phosphatase (Goettsch *et al.*, 2016) ou certains récepteurs tyrosine kinase (Wilson *et al.*, 2014). Une étude récente a montré que la sortiline était capable de s'homodimériser *via* la formation d'un pont disulfure situé au niveau de la cystéine 783 et que cette dimérisation serait nécessaire pour son adressage dans les exosomes (Itoh *et al.*, 2018).

La sortiline participe au transport rétrograde (des endosomes vers l'appareil de Golgi) *via* son interaction avec les rétromères, notamment les protéines VPS (*Vacuolar Protein Sorting*) 26 et 35, dans la partie cytoplasmique du récepteur (Canuel *et al.*, 2008; Mari *et al.*, 2008; Seaman, 2004). De manière intéressante, il a été montré que la palmitoylation du récepteur était nécessaire à ce transport rétrograde et à l'interaction avec les rétromères (McCormick *et al.*, 2008). L'homodimérisation de la sortiline montrée par l'équipe d'Itoh empêcherait d'ailleurs cette palmitoylation ce qui expliquerait l'adressage de la sortiline vers

INTRODUCTION

les exosomes plutôt que vers d'autres compartiments intracellulaires (Itoh *et al.*, 2018). Enfin, la sortiline est associée au trafic des vésicules de transport du glucose *via* son interaction avec GLUT4 (*Glucose transporter type 4*) dans les cellules adipeuses et les cellules musculaires murines en réponse aux stimuli de régulation par l'insuline (Ariga *et al.*, 2008; Shi et Kandror, 2005).

- Rôle de co-récepteur

Mis à part les signalisations propres à son rôle dans le trafic intracellulaire, les signalisations sous-jacentes à la sortiline sont mal connues (Nykjaer et Willnow, 2012). En effet, les signalisations attribuées à la sortiline dépendent probablement de son interaction avec d'autres récepteurs membranaires. Ainsi, la sortiline participe à la mort neuronale en interagissant avec le récepteur p75^{NTR} (Nykjaer *et al.*, 2004) mais peut aussi contribuer à la survie cellulaire *via* son interaction avec le récepteur TrkA (Clewes *et al.*, 2008). Le détail de ces interactions est approfondi dans la partie III.A. : Interactions entre les récepteurs du (pro)NGF.

- Les effets de la neurotensine

Le rôle de la sortiline dans la migration cellulaire a été rapportée dans les cellules microgliales suite à la fixation de son ligand : la neurotensine (Martin *et al.*, 2003). Cette voie de signalisation dépendrait de l'activation des protéines ERK1/2 et AKT, ce qui mènerait à la formation de filopodes suite à la réorganisation de l'actine F. Par ailleurs, d'autres études ont montré l'implication de cette même voie de signalisation dans la sécrétion de chimiokines (Dicou *et al.*, 2004) et la maturation des terminaisons dendritiques du cortex cérébral (Gandou *et al.*, 2010).

Les principales voies de signalisation associées à la sortiline sont schématisées dans la Figure 21.

INTRODUCTION

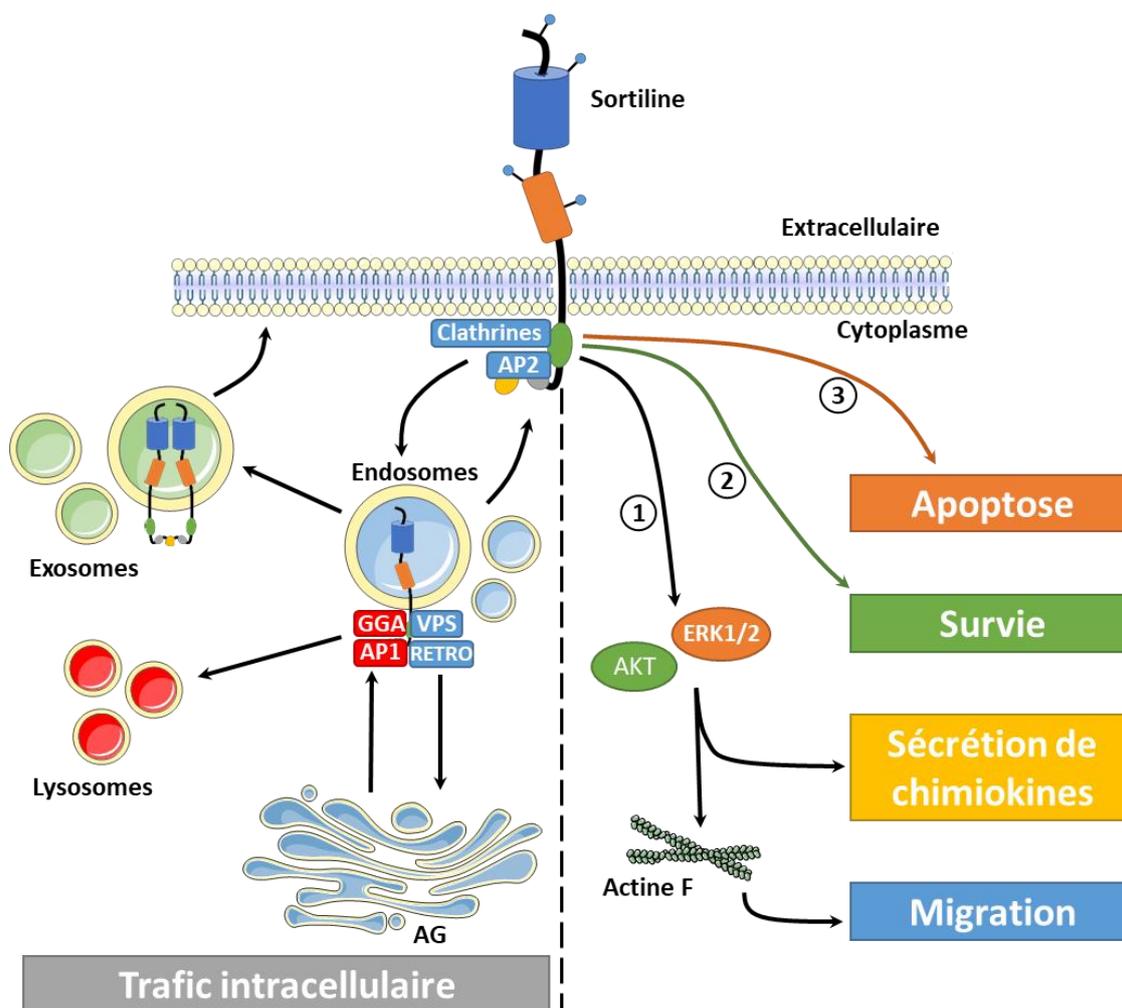


Figure 21 : Principales voies de signalisation associées à la sortiline

La sortiline joue un rôle majeur dans le trafic intracellulaire via différents processus tels que l'internalisation, le transport rétrograde ou l'adressage aux lysosomes ou exosomes. Elle met en place des voies de signalisation via la fixation de la neurotensine (①) et peut également interagir avec des récepteurs tels que TrkA ou p75^{NTR} pour mettre en place des voies de signalisation associées à la fixation de neurotrophines (respectivement ② et ③). AP : Adaptator Protein ; GGA : Gamma Adaptin Protein ; VPS : Vascular Protein Sorting ; AG : Appareil de Golgi.

3. Le récepteur p75^{NTR}

a. Découverte

Le premier récepteur des neurotrophines fut découvert en 1973 (Herrup et Shooter, 1973) et on lui donna le nom de NGFR (*Nerve Growth Factor Receptor*), l'étude s'étant focalisée uniquement sur la fixation du NGF- β qui était la seule neurotrophine caractérisée à l'époque. Les auteurs déterminèrent alors une constante de dissociation (K_d) égale à $1,2 \times 10^{-10}$ M. En 1979, deux sites d'interaction distincts furent découverts pour ce récepteur : l'un de

INTRODUCTION

basse affinité ($K_d = 2,3 \times 10^{-11}$ M) et l'autre de haute affinité ($K_d = 1,7 \times 10^{-9}$ M) (Sutter *et al.*, 1979). Deux hypothèses furent émises pour expliquer ces deux affinités différentes : deux récepteurs différents en jeu ou deux conformations différentes du même récepteur. C'est le clonage et séquençage du récepteur de basse affinité en 1986 (Chao *et al.*, 1986) qui a confirmé la première de ces hypothèses. Ce récepteur de basse affinité prit le nom de LNGFR (*Low affinity Nerve Growth Factor*). Suite à la découverte des autres membres de la famille des neurotrophines, il s'est avéré que l'ensemble des neurotrophines et leurs précurseurs se fixaient au LNGFR (Chao et Bothwell, 2002; Rodriguez-Tébar *et al.*, 1990; Rodríguez-Tébar *et al.*, 1992; Rydén *et al.*, 1995). Compte tenu de ces informations et de son poids moléculaire de 75 kDa, ce récepteur prit le nom de p75^{NTR} (NTR : *Neurotrophins Receptor*) (Large *et al.*, 1989).

b. Du gène à la protéine

Le récepteur p75^{NTR} est codé par un gène de 6 exons nommé *NGFR* localisé au niveau du chromosome 17 chez l'homme (Gene ID : 4804, NCBI). Sa transcription résulte en la création d'un ARNm de 3,4 kb et sa traduction en une protéine de 427 acides aminés pour 45 kDa (sans glycosylations). Après élimination du peptide signal, la protéine atteint une taille de 399 acides aminés. Cette protéine est composée de trois domaines : un extracellulaire de 222 acides aminés, un transmembranaire de 19 acides aminés et un intracellulaire de 158 acides aminés (Figure 22) (Grob *et al.*, 1985; Roux et Barker, 2002).

Le domaine extracellulaire contient quatre domaines riches en cystéines, caractéristiques des membres de la superfamille du TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) (Baldwin *et al.*, 1992). Ces domaines CRD (*Cysteine-rich domains*) contiennent chacun trois ponts disulfures impliqués dans la mise en conformation du récepteur ainsi que dans la liaison aux ligands (Chan *et al.*, 2000; Shamovsky *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1994). En effet, p75^{NTR} est capable de fixer l'ensemble des neurotrophines avec une faible affinité et leur précurseur respectif avec une haute affinité (Lee *et al.*, 2001). Les neurotrophines et leurs précurseurs se fixent sur les boucles variables au sein des domaines CRD de p75^{NTR} *via* leur partie mature. Pour le NGF en particulier, les résidus Lysines 32, 34 et 95 jouent un rôle clé dans l'interaction avec ce récepteur (Shamovsky *et al.*, 1999). La glycosylation du récepteur, composée par un site de N-glycosylation localisé dans le CRD1 ainsi que trois sites de O-glycosylation localisés dans le domaine juxtamembranaire, serait également importante dans la liaison des ligands

INTRODUCTION

et jouerait un rôle dans l'adressage du récepteur à la membrane (Large *et al.*, 1989; Monlauzeur *et al.*, 1998; Yeaman *et al.*, 1997).

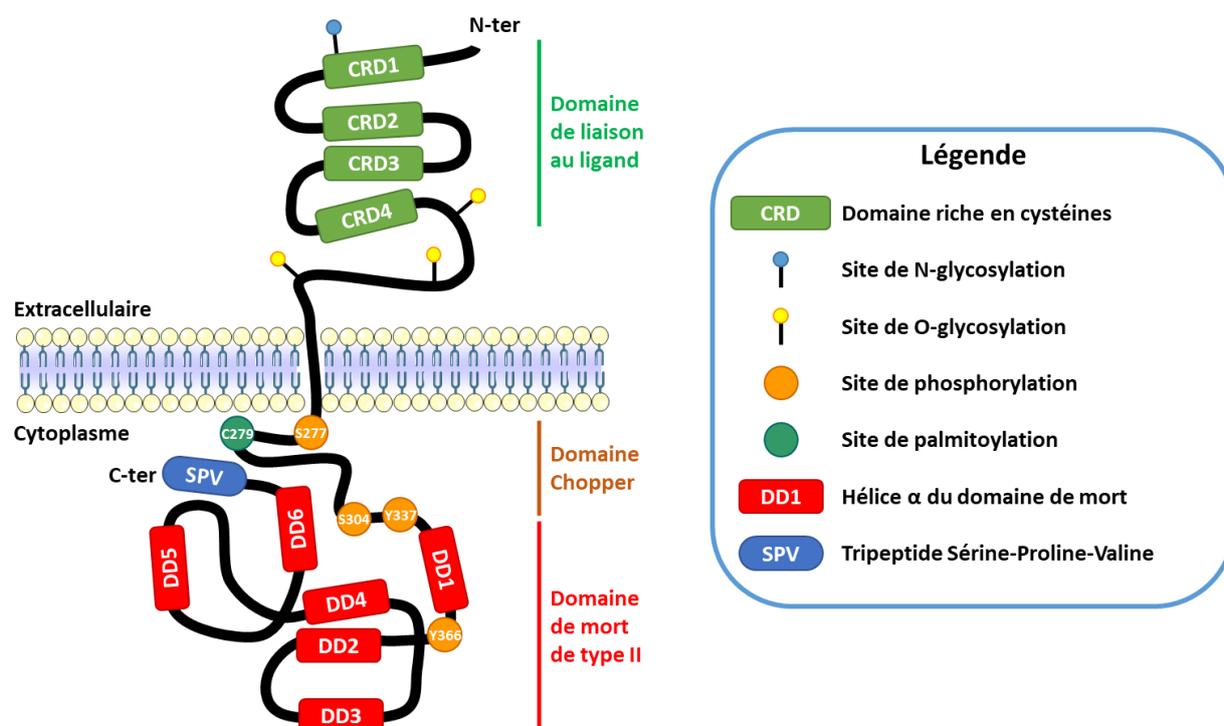


Figure 22 : Représentation schématique du récepteur p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} est constitué d'une partie extracellulaire contenant 4 domaines riches en cystéines (CRD1-4) responsables de la liaison au ligand et de plusieurs sites de glycosylations, d'une partie transmembranaire importante dans la dimérisation du récepteur, et d'un domaine cytoplasmique contenant un domaine Chopper juxtamembranaire, un domaine de mort de type II constitué de 6 hélices α et un tripeptide sérine-proline-valine situé en C-terminal et permettant la liaison de protéines à domaine PDZ. Le domaine intracellulaire contient également des sites de modifications post-traductionnelles notamment quatre sites de phosphorylation impliqués dans la transmission des voies de signalisation sous-jacentes et un site de palmitoylation impliqué dans l'ancrage à la membrane (adaptée de Roux et Barker, 2002).

Le domaine transmembranaire de p75^{NTR} est composé d'une structure en hélice α unique permettant de classer ce récepteur dans la catégorie des récepteurs transmembranaires de type I. Au sein de cette hélice, la cystéine 257 est particulièrement conservée entre les espèces et joue un rôle crucial dans la dimérisation du récepteur, sa conformation ainsi que dans la transduction du signal (Bothwell, 2016; Vilar *et al.*, 2009).

Le domaine intracellulaire ne possède pas d'activité enzymatique propre mais est plutôt caractérisé par des régions spécifiques permettant le recrutement de protéines adaptatrices relayant le signal intracellulaire. On compte parmi ces régions un domaine de mort (DD, *Death domain*) caractéristique d'un sous-groupe particulier de la famille des TNFRs

INTRODUCTION

(Liepinsh *et al.*, 1997). Cependant, contrairement aux DDs de type I présents dans d'autres TNFRs, le DD de type II de p75^{NTR} ne s'homodimérise pas, indiquant une signalisation différente des autres DDs de TNFRs (Barker, 2004; Barrett, 2000; Roux et Barker, 2002). Un autre domaine de 29 acides aminés est important dans la signalisation de p75^{NTR}. Ce domaine, nommé Chopper, est particulièrement conservé entre les espèces mais pas entre les membres de la famille des TNFRs. Il est nécessaire au récepteur p75^{NTR} pour exercer son rôle pro-apoptotique (Coulson *et al.*, 2000). Enfin, un domaine de liaison aux protéines à domaines PDZ (*Postsynaptic Disc-large Zona*) constitué des trois acides aminés Sérine-Proline-Valine (SPV) est situé au niveau du domaine C-terminale de la partie intracellulaire de p75^{NTR}. Ce domaine est impliqué dans l'adressage du récepteur ainsi que dans la mise en place des signalisations intracellulaires notamment *via* des protéines adaptatrices telles que FAP-1 (*Fas-Associated Phosphatase*) ou PDLIM1 (*PDZ And LIM Domain 1*) (Ahn *et al.*, 2016; Irie *et al.*, 1999; Kraemer *et al.*, 2014). La signalisation de p75^{NTR} est encore diversifiée par la présence de différentes modifications post-traductionnelles. On compte notamment deux phosphorylations au niveau des tyrosines Y³³⁶ et Y³⁶⁸, dans le domaine de mort, mises en place suite à la fixation du NGF sur le récepteur. Ces phosphorylations permettent la régulation de la croissance des prolongements neuronaux, ou neurites, *via* l'activation des GTPases RAS et RhoA (*Ras homolog gene family, member A*) (Blöchl *et al.*, 2004; Blöchl et Blöchl, 2007; Yamashita *et al.*, 1999). Deux Sérines, les sérines S²⁷⁷ et S³⁰⁴, peuvent également être phosphorylées. La phosphorylation de la sérine 277 affecte le transport intracellulaire du complexe ligand/p75^{NTR} et leur cinétique de dégradation, modulant alors la durée du signal intracellulaire (Butow et von Bartheld, 2009). Quant à la sérine 304, sa phosphorylation est impliquée dans la relocalisation du récepteur au niveau des radeaux lipidiques suite à une stimulation par ses ligands (Higuchi *et al.*, 2003). Enfin, une palmitoylation située sur la cystéine juxtamembranaire 279 participe à la mise en place des voies de mort neuronale dépendantes de p75^{NTR} *via* la translocation de son fragment intracellulaire dans les régions riches en cholestérol de la membrane, en absence de TrkA (Underwood *et al.*, 2008).

Le récepteur p75^{NTR} peut également exister sous la forme de fragments résultant d'une protéolyse de type RIP (*Regulated Intramembrane Proteolysis*). Cette protéolyse consiste en deux clivages successifs (Brown *et al.*, 2000; Skeldal *et al.*, 2011). Le premier clivage est effectué par l' α -sécrétase ADAM17/TACE (*A Disintegrin And Metalloprotease 17/TNFA*

INTRODUCTION

Converting Enzyme) et permet la libération d'un fragment extracellulaire appelé p75^{NTR}-ECD (*Extracellular Domain*) ainsi que l'apparition du fragment p75^{NTR}-CTF (*C-terminal Fragment*) qui reste associé à la membrane. C'est au niveau de ce dernier fragment, précisément dans le domaine transmembranaire de ce fragment, qu'aura lieu le deuxième clivage par la γ -sécrétase (Zampieri *et al.*, 2005) permettant de générer le fragment intracellulaire p75^{NTR}-ICD (*Intracellular Domain*) (Jung *et al.*, 2003). Ces différents fragments prennent part à la mise en place de nombreuses voies de signalisation propres à p75^{NTR} et à ces co-récepteurs (Skeldal *et al.*, 2011).

c. Signalisation physiologique de p75^{NTR}

Contrairement aux récepteurs Trk qui s'autophosphoryle suite à la liaison de leurs ligands, le récepteur p75^{NTR} ne possède pas d'activité catalytique intrinsèque. Ses signalisations dépendent plutôt de recrutement de partenaires protéiques qui permettent l'activation des voies de signalisation sous-jacentes (Figure 23). Selon le contexte cellulaire, les voies de signalisation associées à l'activation de p75^{NTR} mènent à la survie neuronale, à l'apoptose ou encore à la régulation de la croissance synaptique. Pendant le développement, la signalisation de p75^{NTR} joue un rôle important dans la croissance et la survie neuronale. Malgré une faible expression de p75^{NTR} dans le système nerveux mature, de nombreuses études ont souligné l'importance de ce récepteur dans la modification des synapses de l'hippocampe (Rösch *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2005; Zagrebelsky *et al.*, 2005) et la régulation de la neurogenèse (Bernabeu et Longo, 2010).

INTRODUCTION

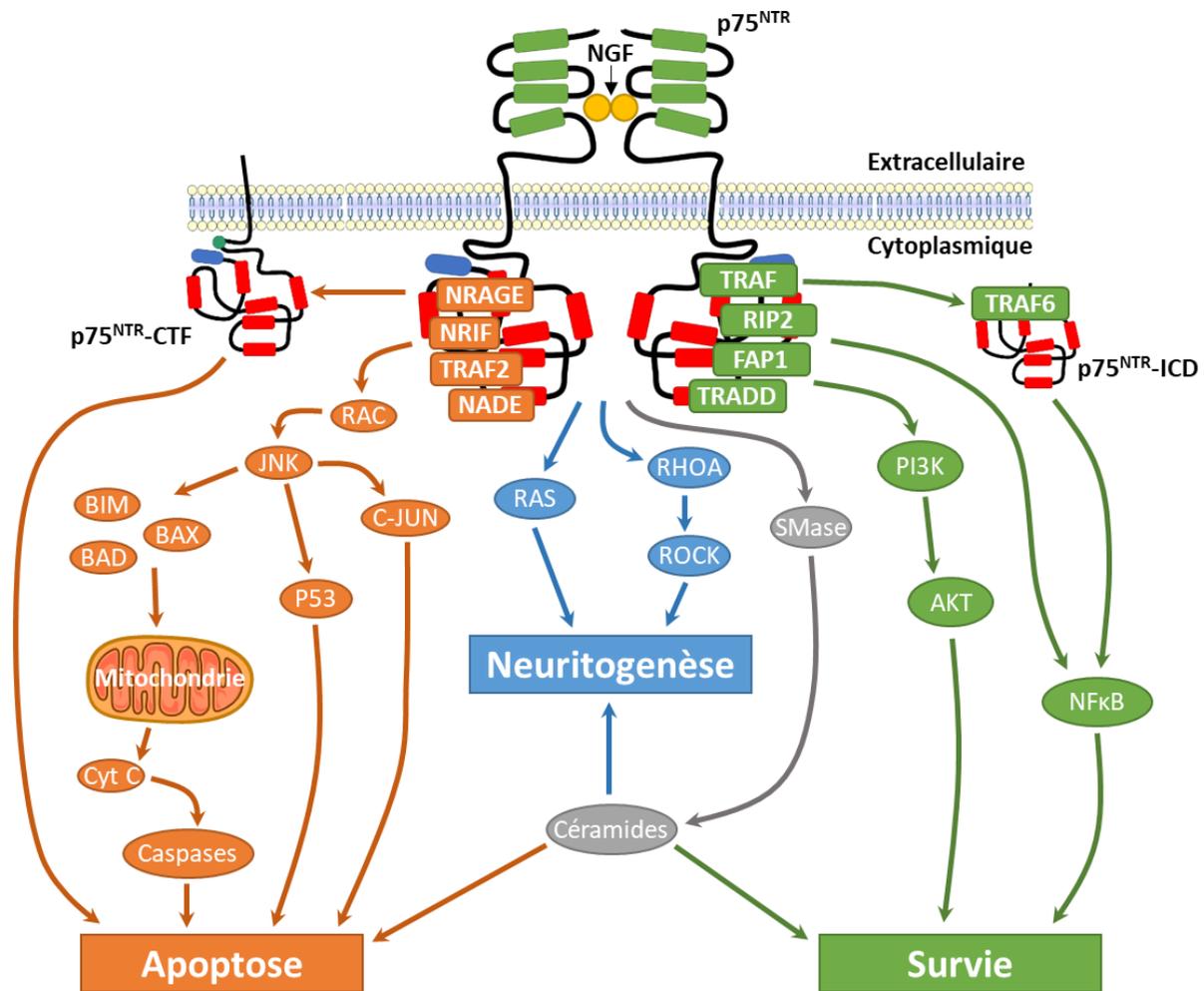


Figure 23 : Représentation schématique des principales voies de signalisation induites par p75^{NTR}

L'activation de p75^{NTR} suite à la fixation de ces ligands conduit à la mise en place de différentes voies de signalisation intracellulaires grâce au recrutement de protéines adaptatrices au niveau des domaines fonctionnels de p75^{NTR}. Selon le contexte et les protéines impliquées, ces voies de signalisation aboutissent soit à l'apoptose (orange), soit à la survie (vert), ou encore à la neuritogenèse (bleu). Les céramides (gris), dépendant de leur concentration intracellulaire, peuvent impacter les trois voies de signalisation représentées sur ce schéma. AKT : RAC-alpha serine/threonine-protein kinase ; BAD : Bcl-2 antagonist of cell death ; BAX : Bcl-2 associated X protein ; BIM : BCL-2 interacting mediator of cell death ; Cyt C : Cytochrome C ; FAP1 : Fas-Associated Protein 1 ; JNK : c-Jun N-terminal Kinase ; NADE : p75^{NTR}-associated cell death executor ; NFkB : Nuclear Factor kappa B ; NRAGE : Neurotrophin Receptor-interacting MAGe homolog ; NRIF : Neurotrophin Receptor Interacting Factor ; PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase ; RAC : Ras-related C3 botulinum toxin ; RIP2 : Receptor Interacting Protein 2 ; ROCK : Rho-associated protein Kinase 1 ; SMase : SphingoMyelinase ; TRADD : TNF Receptor-Associated Death Domain protein ; TRAF : TNF-Receptor Associated Factor.

INTRODUCTION

Le récepteur p75^{NTR} peut induire la mort cellulaire par apoptose grâce au recrutement de partenaires protéiques spécifiques au niveau de ses domaines de mort et Chopper (Coulson *et al.*, 2000). Parmi ces protéines adaptatrices, on compte notamment des protéines telles que NADE (*Neurotrophin Associated cell Death Executor*), NRAGE (*Neurotrophin Receptor Interacting MAGE homologue*), NRH2 (*Neurotrophin Receptor Homolog 2*), NRIF (*Neurotrophin Receptor Interacting Factor*) ou encore TRAF2 (*TNF Receptor Associated Factor 2*) (Kenchappa *et al.*, 2006; Kim et Hempstead, 2009; Kimura *et al.*, 2001; Salehi *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 1999). Suite au recrutement des protéines adaptatrices, la GTPase RAC est activée ce qui conduit à l'activation de la voie JNK (*c-Jun Nterminal Kinase*) (Harrington *et al.*, 2002). En conséquence, les signalisations pro-apoptotiques sont activées par des facteurs de transcription tels que c-JUN ou p53, les protéines BAX et l'activation des caspases (Coulson *et al.*, 2004; Frade, 2000; Roux et Barker, 2002). Par ailleurs, le fragment p75^{NTR}-CTF peut également induire la mort neuronale suite à sa relocalisation dans les radeaux lipidiques après la palmitoylation de sa cystéine 279 (Underwood *et al.*, 2008). La signalisation pro-apoptotique médiée par p75^{NTR} est particulièrement importante dans les périodes de développement afin d'éliminer les cellules qui n'ont pas été correctement innervées (Majdan et Miller, 1999) mais peut aussi se manifester après des crises d'épilepsie ou l'inflammation (Dowling *et al.*, 1999; Roux *et al.*, 1999).

La signalisation de p75^{NTR} est également associée à la survie cellulaire notamment grâce à l'activation du facteur de transcription NFκB (Hamanoue *et al.*, 1999) mais aussi par l'activation des voies PI3K/AKT associées aux récepteurs Trks (Rydén *et al.*, 1997). Tout comme pour les voies pro-apoptotiques induites par p75^{NTR}, des protéines adaptatrices sont nécessaires pour activer les voies de survie liées au récepteur p75^{NTR}. Ces protéines sont notamment les protéines TRAFs (*TNF Receptor-Associated Factor*), RIP2 (*Receptor Interacting Protein 2*), FAP1 (*Fas-associated Protein 1*) ou encore TRADD (*TNF Receptor-Associated Death Domain protein*) (DeFreitas *et al.*, 2001; El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003; Irie *et al.*, 1999; Khursigara *et al.*, 2001). Le clivage de p75^{NTR} participe également à la mise en place de voies de survie. En effet, suite à l'ubiquitinylation de p75^{NTR} par la protéine adaptatrice TRAF6, le fragment p75^{NTR}-ICD est relâché dans le cytoplasme ce qui va conduire à l'activation de la voie NFκB (Kanning *et al.*, 2003; Powell *et al.*, 2009).

INTRODUCTION

p75^{NTR} joue également un rôle dans le contrôle de la croissance cellulaire, notamment la neurogenèse. En effet, les protéines Reticulon-4 (ou NOGO), MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*) ou MOG (*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*), des protéines de la famille des MBGI (*CNS-derived Myelin-Based Growth Inhibitor*) (Mi *et al.*, 2004), suppriment la croissance des axones *via* leur interaction avec le complexe p75^{NTR}/NogoR qui, une fois activé, permet de libérer RHOA normalement séquestrée par la protéine RHO-GDI (Schwab, 2010; Yamashita et Tohyama, 2003). La libération de RHOA permet alors son activation par des RHO-GEFs, et RHOA active la protéine ROCK ce qui va mener à la dépolymérisation des filaments d'actine, entraînant alors l'arrêt de la croissance des neurites (Blöchl *et al.*, 2004; Blöchl et Blöchl, 2007). La présence de neurotrophines, en compétition pour le même site de fixation sur p75^{NTR} que les protéines MBGI (Wang *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002), va entrainer la croissance en empêchant la mise en place de la signalisation précédemment décrite (Gehler *et al.*, 2004; He et Koprivica, 2004). Le clivage protéolytique de p75^{NTR} semble jouer un rôle important dans ce processus cellulaire car il a été montré que la fixation de MAG au niveau de neurones cérébelleux induit le clivage de p75^{NTR} par les α - et γ -sécrétases et que ce clivage est nécessaire pour l'activation de RhoA et donc pour l'inhibition de la croissance des neurites (Domeniconi *et al.*, 2005).

La synthèse des céramides est également une voie de signalisation importante associée au récepteur p75^{NTR} car elle est impliquée dans l'ensemble des processus cellulaires régulés par p75^{NTR}. En effet, les céramides sont des sphingolipides structurant la membrane cellulaire mais peuvent également agir en tant que messagers secondaires dans les signalisations de p75^{NTR}. Les céramides sont produites suite à l'activation des sphingomyélasés (SMases) résultant de l'activation de p75^{NTR} par le NGF (Dobrowsky *et al.*, 1995, 1994). Les sphingomyélasés activés hydrolysent les sphingomyélines et mènent à la production des céramides grâce à une interaction directe entre p75^{NTR} et les cavéolines (Bilderback *et al.*, 1997). La synthèse des céramides par p75^{NTR} peut mener à l'apoptose comme cela a été montré dans des oligodendrocytes matures ou les neuroblastomes (Casaccia-Bonnel *et al.*, 1996; Plo *et al.*, 2004) mais également à la survie (DeFreitas *et al.*, 2001) ou à la croissance des neurones (Brann *et al.*, 1999). La mise en place de l'une ou l'autre des voies de signalisation va ainsi dépendre également des niveaux de céramides intracellulaires (Hirata *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1999).

INTRODUCTION

L'ensemble des voies décrites font de p75^{NTR} un élément central dans la régulation du développement des systèmes nerveux central et périphérique, à travers son implication dans la survie, l'apoptose et la croissance des cellules nerveuses. En plus de son rôle dans le développement neuronal, p75^{NTR} est activé en réponse à des blessures ou dans des maladies liées aux systèmes nerveux central et périphérique (Meeker et Williams, 2015). Enfin, des études démontrent le rôle émergent de ce récepteur dans le système immunitaire (Colombo *et al.*, 2012; Meeker et Williams, 2015; Rogers *et al.*, 2010).

C. Implications du (pro)NGF dans le cancer du sein

Les neurotrophines et leurs récepteurs associés ont été étudiés dans de nombreux cancers et leurs implications dans la carcinogenèse n'est plus à démontrer (Hanahan et Weinberg, 2011, 2000). En particulier, le NGF et ses récepteurs sont surexprimés dans plusieurs types de cancers incluant les cancers du sein (Hondermarck, 2012), de l'ovaire (Davidson *et al.*, 2001; Tapia *et al.*, 2011), de la prostate (Arrighi *et al.*, 2010), du poumon (Gao *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2014), du pancréas (Ceyhan *et al.*, 2010; Diao *et al.*, 2012), du foie (Yang *et al.*, 2014), de la thyroïde (Faulkner *et al.*, 2018), ou encore dans le mélanome (Pasini *et al.*, 2015; Truzzi *et al.*, 2008). Bien qu'encore mal comprises, les signalisations du NGF et du proNGF dans les cancers aboutissent généralement à des effets pro-tumoraux et ces effets font de ces neurotrophines et leurs récepteurs des cibles thérapeutiques potentielles (Demir *et al.*, 2016; Griffin *et al.*, 2018).

1. Le NGF et son précurseur dans le cancer du sein

Les travaux de notre laboratoire ont participé à mettre en évidence le rôle majeur du NGF et de son précurseur dans la signalisation protumorale du cancer du sein. En effet, le NGF est sécrétée par les cellules cancéreuses mammaires et, *via* une boucle autocrine, va conduire à de nombreux effets oncogéniques tels que la prolifération, la survie, la migration/l'invasion ou encore l'angiogenèse (Descamps *et al.*, 2001b; Dollé *et al.*, 2003; Lagadec *et al.*, 2009). Le ciblage du NGF et de ses récepteurs dans des essais précliniques a montré une inhibition de la survie des cellules cancéreuses mammaires, de leur prolifération ou encore de leur invasion (Hondermarck, 2012). Ainsi, l'utilisation d'anticorps anti-NGF, anti-p75^{NTR} ou encore de siARNs dirigés contre le NGF conduit à l'inhibition de la croissance tumorale et/ou à la diminution du

INTRODUCTION

nombre de métastases dans des modèles de souris xéno greffées (Adriaenssens *et al.*, 2008; Vanhecke *et al.*, 2011). Le ciblage de TrkA par l'utilisation de siARNs dans les cellules cancéreuses mammaires résulte en une baisse de la prolifération et une stagnation en phase G0/G1 dans le cycle cellulaire due à l'inactivation de NFκB (Zhang *et al.*, 2015). De plus, l'inactivation de TrkA a pour conséquence une augmentation de la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires au paclitaxel et une diminution du nombre de métastases au poumon dans des souris xéno greffées (Zhang *et al.*, 2015). L'activation de TrkA est également synonyme d'agressivité du cancer du sein car l'expression membranaire de phospho-TrkA est significativement supérieure dans des effusions pleurales comparé au site primaire (Davidson *et al.*, 2001).

Une étude récente a montré que le NGF était capable d'augmenter le nombre de cellules souches cancéreuses (CSC) mammaires *via* l'augmentation de l'expression de SOX2 et d'autres facteurs de pluripotence par l'intermédiaire du récepteur p75^{NTR} (Tomellini *et al.*, 2015). Dans cette même étude, la stimulation au NGF conduit également à un enrichissement en cellules présentant des caractéristiques mésenchymateuses, suggérant que la stimulation par le NGF favorise l'EMT (*Epithelial to Mesenchymal Transition*) (Tomellini *et al.*, 2015). Quant au proNGF, il participerait également à la biologie des CSCs mais en favorisant la quiescence par une voie indépendante de la participation de p75^{NTR} conduisant à la libération de SOX2 (Chopin *et al.*, 2016; Tomellini *et al.*, 2015).

De manière intéressante, les cellules épithéliales mammaires normales ne sont pas affectées par la stimulation au NGF (Descamps *et al.*, 1998). Cette observation reflète la capacité des cellules cancéreuses mammaires à mettre en place des signalisations spécifiques. Les voies de signalisation sous-jacentes à l'axe NGF/TrkA ne sont pas tout à fait comprises dans le cancer du sein mais il a cependant été démontré que les voies de signalisation Pi3K/Akt et MAPKs, des voies retrouvées dans les cellules neuronales, sont activées pour promouvoir la croissance tumorale (Descamps *et al.*, 1998, 2001b, 2001a; Dollé *et al.*, 2003, 2004). Il a également été montré que les protéines de réparation de l'ADN Ku70 et Ku86 pouvaient interagir avec TrkA et qu'elles seraient respectivement nécessaires pour la survie (Com *et al.*, 2007) et l'invasion (Lagadec *et al.*, 2010) induites par le NGF *via* TrkA. Le récepteur p75^{NTR} peut également participer à la signalisation du NGF *via* ses propres voies de signalisation notamment l'activation de NFκB menant à la survie cellulaire (El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003).

INTRODUCTION

La protéine p21^{WAF1/Cip1} serait également impliquée dans l'induction de la survie causée par p75^{NTR} dans les cellules cancéreuses mammaires (Verbeke *et al.*, 2010). La protéine adaptatrice BEX2 (*Brain Expressed X-linked 2*) interagit avec p75^{NTR} et serait nécessaire à l'inhibition de l'apoptose dépendante de p75^{NTR} sous stimulation au NGF (Naderi *et al.*, 2007). Cette inhibition de l'apoptose serait dû à la modulation de protéines membres de la famille BCL-2, notamment l'activation du facteur anti-apoptotique Bcl-2 et la diminution d'activité des protéines pro-apoptotiques BAD, BAX et PUMA (Naderi *et al.*, 2010). Outre l'implication de voies de signalisation associées au NGF déjà connues dans le fonctionnement neuronale, d'autres voies alternatives peuvent être mises en place dans le cancer du sein. Notre laboratoire a ainsi montré que la glycoprotéine CD44 pouvait être recrutée par TrkA suite à une stimulation par le NGF pour induire une voie de signalisation proinvasive indépendante de l'activité kinase de TrkA (Aubert *et al.*, 2015). La voie de signalisation sous-jacente résultante de cette interaction serait la voie p115RhoGEF/RhoA/ROCK1. Une autre voie a également été mise en évidence pour expliquer les effets pro-invasifs du proNGF dans les cellules cancéreuses mammaires. Le proNGF agirait *via* une interaction entre les récepteurs TrkA et la sortiline, sans la participation de p75^{NTR} (Demont *et al.*, 2012).

Le NGF et le proNGF peuvent également agir de façon paracrine pour promouvoir la croissance tumorale des cellules cancéreuses mammaires. En effet, dans le cancer du sein, l'infiltration nerveuse a été détectée dans 28% des carcinomes invasifs contre seulement 8% des carcinomes bénins suggérant un lien entre l'agressivité tumorale et l'innervation, renforcée par une corrélation significative entre l'invasion ganglionnaire et l'innervation (Pundavela *et al.*, 2015). De plus, la même étude a montré l'implication du NGF dans la neurogenèse. Ainsi, le NGF pourraient permettre une innervation accrue de la tumeur ce qui participerait à une croissance tumorale décuplée. En effet, la présence des nerfs au sein du microenvironnement tumorale participe à l'initiation, à la croissance et au processus métastatique dans de nombreux cancers à travers le relargage de neurotransmetteurs dans le voisinage des cellules cancéreuses menant à l'établissement de voies pro-angiogéniques, prolifératives, invasives et métastatiques (Boilly *et al.*, 2017; Griffin *et al.*, 2018; Jobling *et al.*, 2015). Le NGF agit également sur les cellules endothéliales en augmentant leur migration/invasion, leur perméabilité ou encore leur tubulogenèse (Dollé *et al.*, 2005; Nico *et al.*, 2008; Romon *et al.*, 2010). Ces effets ont été associés à une augmentation de la sécrétion

INTRODUCTION

de VEGF par les cellules endothéliales en réponse au NGF. De manière intéressante, la migration des cellules endothéliales induite par le NGF est totalement bloquée par l'utilisation de K252a, un inhibiteur de l'activité kinase de TrkA, mais pas par le SU-5416, un inhibiteur de tyrosine kinase spécifique du VEGFR-2, suggérant un effet direct du NGF, *via* l'activation de TrkA, sur la migration des cellules endothéliales (Dollé *et al.*, 2005). De plus, le NGF participerait à la différenciation angiogénique des cellules endothéliales progénitrices par l'activation d'ERK1/2 et l'augmentation de l'expression de CXCR4 (Jadhao *et al.*, 2012). L'implication du proNGF dans l'innervation des cellules cancéreuses mammaires n'a pas été démontrée mais sa sécrétion par les cellules cancéreuses prostatiques conduirait au neurotropisme et donc, à l'augmentation de l'innervation de la tumeur de prostate (Pundavela *et al.*, 2015).

Enfin, le NGF serait également un acteur important de la douleur causée par le cancer. Les mécanismes de la douleur causée par le cancer sont peu clairs (Griffin *et al.*, 2018; Schmidt, 2014) mais la participation du NGF a été notamment montrée dans un modèle de métastases osseuses de cancer du sein, où le blocage du NGF mène à une réduction de l'innervation de la tumeur et conduit à une diminution de la douleur causée par le cancer (Bloom *et al.*, 2011). L'équipe de Miladinovic a récemment proposé un mécanisme pouvant expliquer le rôle du NGF et de son récepteur dans l'induction de la douleur par le cancer (Miladinovic *et al.*, 2018). Dans cette étude, les auteurs montrent l'implication de l'axe NGF/TrkA sur le système x_c^- qui participe à la nociception par la prise en charge de cystine et le relarguage de glutamate. Ainsi, l'utilisation d'AG879, un inhibiteur de TrkA, diminue l'activité de ce système et conduit à une diminution de la douleur cancéreuse (Miladinovic *et al.*, 2018).

Les informations concernant la signalisation protumorale du NGF dans le cancer du sein, présentées dans cette thèse, sont encore parcellaires mais les études menées sur l'implication de cette neurotrophine dans d'autres cancers permettent de découvrir de nouvelles voies de signalisation potentielles (Demir *et al.*, 2016). Le rôle du précurseur du NGF, le proNGF, dans la tumorigenèse mammaire est encore plus récent et peu d'études ont étudié les voies de signalisation protumorales pouvant résulter de la stimulation à cette proneurotrophine. L'ensemble des informations disponibles suggèrent un rôle protumoral du NGF et de son précurseur dans la tumorigenèse mammaire. Cependant, l'expression de TrkA et de p75^{NTR} a été corrélée à un bon pronostic dans des homogénats de résections tumorales

INTRODUCTION

soulignant la complexité de cet axe (Descamps *et al.*, 2001a). Les études concernant ces neurotrophines doivent être approfondies pour comprendre les éléments clés participant à leur signalisation et améliorer la prise en charge des patients.

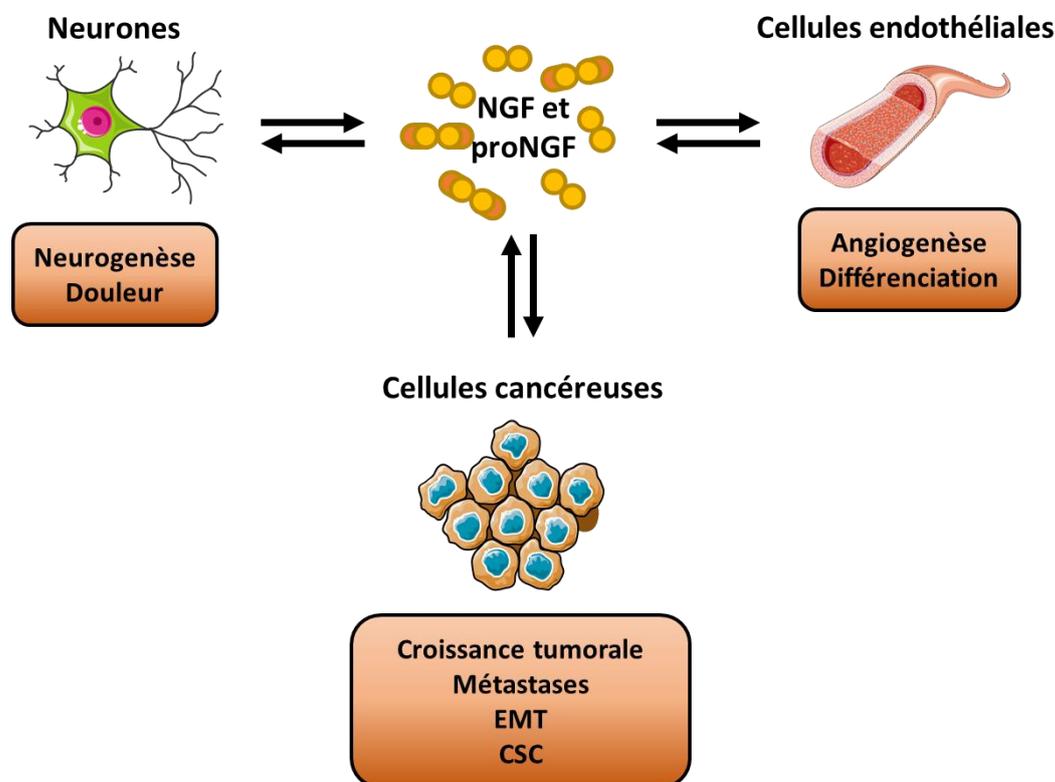


Figure 24 : Les rôles clés du NGF et de son précurseur dans le cancer du sein

Le (pro)NGF se fixe à ces récepteurs présents à la surface des cellules cancéreuses mammaires et permet la mise en place de voies oncogéniques menant à la croissance, à la survie, à la dissémination métastatique ou encore à l'enrichissement en CSCs. Les cellules cancéreuses sécrètent elles aussi du (pro)NGF ce qui amène à l'innervation de la tumeur et augmente la douleur par nociception. De même, le (pro)NGF permet la vascularisation de la tumeur par angiogenèse des cellules endothéliales.

2. Le NGF et son précurseur comme cibles thérapeutiques dans les cancers

Au vu des implications du NGF et de son précurseur découvertes dans le développement de nombreux cancers, ces neurotrophines et leurs récepteurs font l'objet de recherche comme nouvelles cibles thérapeutiques (Griffin *et al.*, 2018). Trois grandes stratégies existent pour cibler les signalisations du NGF et de son précurseur : cibler le NGF et son précurseur, cibler les récepteurs TrkA, p75^{NTR} ou la sortiline, et cibler les effecteurs sous-jacents tels que les MAPKs, SRC ou AKT (Figure 25) (Griffin *et al.*, 2018).

INTRODUCTION

Le NGF peut être bloqué par l'utilisation d'anticorps neutralisants comme cela a été montré *in vitro* dans des lignées cancéreuses prostatiques (Warrington et Lewis, 2011). En accord avec ces observations, l'anticorps bloquant le plus prometteur à ce jour est le Tanezumab, malgré le fait qu'il soit testé pour ces effets sur la perception de la douleur plutôt que sur ses potentiels effets anti-tumoraux. Cet anticorps recombinant humanisé anti-NGF a montré des résultats significatifs dans la diminution de la douleur causée par l'arthrite osseuse (Lane et al., 2010; Walicke et al., 2018). Au vu de ces effets sur la perception de la douleur, un essai clinique de phase II avait été mené pour déterminer un intérêt clinique du Tanezumab dans le traitement de la douleur causée par les métastases osseuses mais celui-ci n'avait pas démontré d'intérêt clinique (Bannwarth et Kostine, 2017; Sopata et al., 2015). Un anticorps monoclonal bloquant la fixation du pro-NGF sur le récepteur p75^{NTR}, le LM11A-31, est actuellement en cours d'essai clinique (NCT03069014) mais chez des patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Tep et al., 2013). Une autre méthode pourrait être l'utilisation de siARNs bloquant la production du NGF et de son précurseur dans la tumeur et son environnement. Ainsi, l'équipe de Lei a démontré l'efficacité de cette méthode pour le traitement de cancers du pancréas *via* l'utilisation de nanoparticules d'or pour délivrer les siRNAs dans des modèles de xénogreffes de souris (Lei et al., 2017).

L'inhibition des récepteurs fixant le NGF et son précurseur est une autre approche thérapeutique prometteuse. Des inhibiteurs ciblant l'activité kinasique de TrkA ont notamment été étudiés dans le cancer de la prostate. C'est le cas du K252a, un analogue de la staurosporine qui se fixe dans les sites de fixation de l'ATP des domaines kinases de différentes protéines telles que les CAM- kinases et, dans une moindre mesure, des récepteurs à activité tyrosine kinase comme FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*) ou TrkA. Ces effets anti-prolifératifs ont d'abord été démontrés dans des lignées cancéreuses prostatiques (Sortino et al., 2000) puis son dérivé, le CEP-701 ou lestaurtinib, montra une efficacité anti-tumorale dans des modèles murins de xénogreffes (Festuccia et al., 2007; Weeraratna et al., 2001) ce qui donna lieu à un essai clinique de phase II (NCT00081601) qui n'a pas fourni de preuves significatives de l'intérêt de cet inhibiteur dans le traitement des cancers de prostate. Le Lestaurtinib a également fait l'objet d'essais cliniques pour des désordres myéloprolifératifs et pour les leucémies myéloïdes aiguës (Diaz et al., 2011; Fathi et Chabner, 2011). De manière intéressante, une étude récente a montré que les lestaurtinib pourrait présenter un intérêt

INTRODUCTION

dans le traitement du cancer du sein, grâce à son effet amplificateur de l'inhibiteur de PARP1 : l'AG14361 (Vazquez-Ortiz *et al.*, 2014). Les dérivés du K252a n'étant pas spécifiques de TrkA, des études ont été menées pour développer des inhibiteurs plus spécifiques (Lange et Lo, 2018). Les plus prometteurs, actuellement en phase d'essai clinique II, sont le Larotrectinib (ou LOXO-101) (NCT03213704), l'Entrectinib (NCT02568267), le Cabozantinib (NCT01639508) ou encore le Merestinib (NCT02920996). Cependant, ces inhibiteurs ne présentent d'intérêt clinique que dans les cancers présentant des fusions chimériques de TrkA (Vaishnavi *et al.*, 2015). En effet, bien que ne représentant qu'une proportion allant de 1 à 15 %, des protéines chimériques constitutivement actives issues de la fusion du domaine kinase de *NTRK1* avec des séquences d'autres gènes, ont été identifiées dans de multiples cancers comme le cancer colorectal (Ardini *et al.*, 2014), du poumon (Vaishnavi *et al.*, 2013), de la thyroïde (Greco *et al.*, 2010) ou encore dans les glioblastomes (Frattini *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014). Ces observations suggèrent l'existence de mécanismes de résistance envers ces inhibiteurs dans les cancers et soulignent l'importance de poursuivre les recherches concernant cet axe thérapeutique. Le développement de peptides mimétiques agonistes ou antagonistes des récepteurs du NGF semble être également une approche prometteuse (Joseph-Hernandez *et al.*, 2017). En effet, ces petits inhibiteurs présenteraient de nombreux avantages tels qu'une meilleure biodisponibilité et une action plus ciblée, diminuant donc d'éventuels effets non désirés. De telles molécules sont actuellement à l'étude pour le traitement de maladies neuro-dégénératives et un agoniste de TrkA, le Tavilermide (MIM-D3), a été récemment approuvé pour le traitement des yeux secs chez l'humain (NCT01960010). Enfin, le développement d'anticorps monoclonaux ciblant les résistances peut également être une option envisageable pour bloquer la signalisation protumorale du (pro)NGF. En effet, ceux-ci présenteraient une forte spécificité et une forte affinité pour leurs cibles. Cependant, leur grande taille et leur haute hydrophilie empêchent toute administration par voie orale et une faible capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (Yeh *et al.*, 2017). Pourtant, un anticorps monoclonal ciblant TrkA, le MNAC13, a donné des résultats prometteurs pour diminuer l'inflammation et la douleur (Ugolini *et al.*, 2007).

Malgré le développement de nombreuses stratégies ciblant la signalisation du NGF, les essais cliniques continuent d'aboutir sur des résultats peu convaincants probablement à cause de propriétés pharmacologiques décevantes ou l'existence de mécanismes de résistance

INTRODUCTION

innée ou acquise. Il est donc nécessaire d'explorer les causes possibles de ces échecs et de mettre en place des thérapies ciblant ces résistances. Dans cette optique, et considérant l'extraordinaire plasticité des cellules cancéreuses de sein, la formation de complexes de récepteurs membranaires spécifiques aux cellules tumorales pourrait expliquer en partie les résistances aux inhibiteurs et constituer un axe d'approche thérapeutique potentiel.

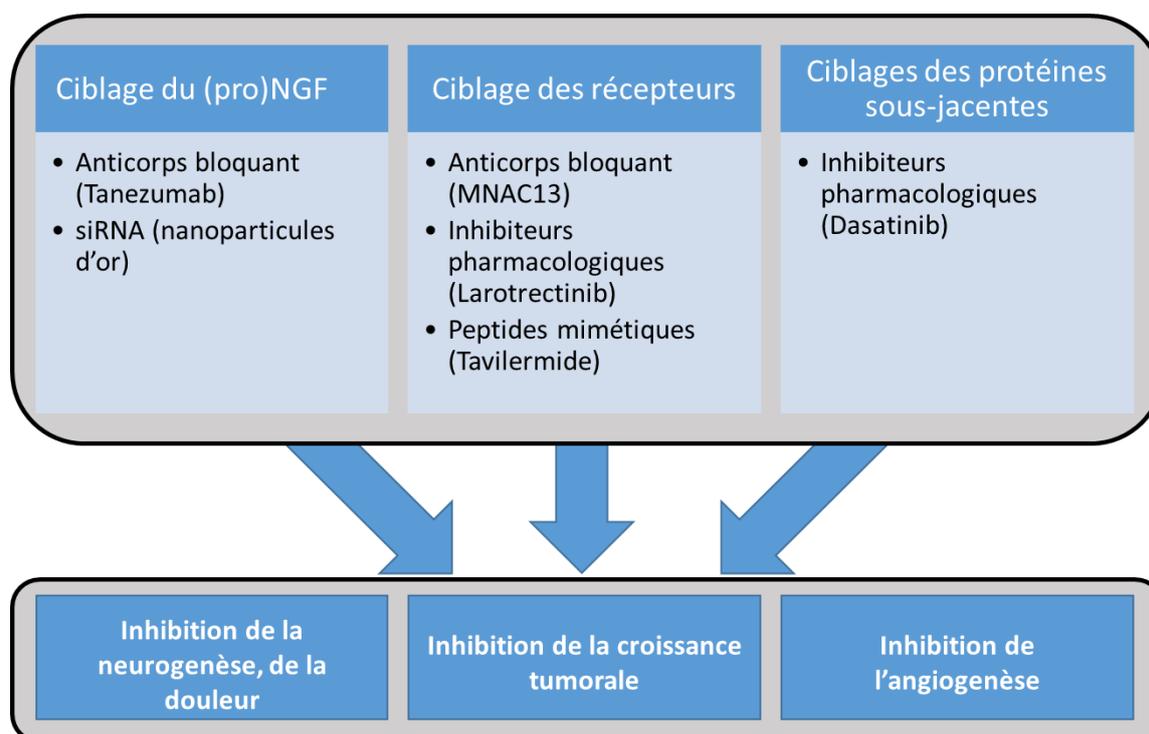


Figure 25 : Le ciblage de l'axe (pro)NGF dans le cancer du sein

Plusieurs stratégies existent pour cibler l'axe du (pro)NGF dans le cancer du sein. 1) Cibler le NGF et son précurseur par utilisation d'anticorps bloquants humanisés ou par siRNA. 2) Cibler les récepteurs TrkA, p75^{NTR} ou la sortiline par anticorps bloquants, inhibiteurs pharmacologiques ou encore des peptides mimétiques agonistes ou antagonistes. 3) Cibler les effecteurs de la signalisation sous-jacente du (pro)NGF en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques (adaptée de Griffin et al., 2018).

III. Plasticité des réseaux de récepteurs membranaires dans la signalisation protumorale du (pro)NGF

Le NGF et son précurseur ont des signalisations variées en fonction des récepteurs présents, parfois jusqu'à mettre en place des signalisations antagonistes pour un même ligand (Figure 26). En effet, le proNGF peut à la fois mettre en place une signalisation proapoptotique mais aussi une signalisation de survie en fonction des récepteurs présents. Ainsi, la signalisation mise en place par le (pro)NGF dépend fortement des niveaux de ligands, des niveaux de récepteurs présents à la membrane mais va également dépendre de la présence de co-récepteurs qui sont de plus en plus décrits comme jouant un rôle majeur dans la signalisation des facteurs de croissance, dont le (pro)NGF (Ioannou et Fahnestock, 2017).

A. Interactions entre les récepteurs du (pro)NGF

1. Interaction TrkA/p75^{NTR}

Lorsqu'il interagit avec TrkA, le récepteur p75^{NTR} augmente l'affinité du NGF pour ce récepteur d'environ 100 fois (Hempstead *et al.*, 1991; Mahadeo *et al.*, 1994) et permet de potentialiser les voies de signalisations associées à TrkA, menant à la survie et à la croissance neuronale notamment les voies PI3K/AKT, ERK ou PLC γ (Bibel *et al.*, 1999; Esposito *et al.*, 2001; Hempstead *et al.*, 1991). L'exemple de l'interaction entre TrkA et p75^{NTR} permet de montrer l'importance de p75^{NTR} dans la signalisation des Trks, et *vice-versa*. Ainsi, en l'absence de p75^{NTR} dans les cellules PC12, on observe une diminution de l'activation de la voie AKT *via* TrkA (Ceni *et al.*, 2010). De la même manière, l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-p75^{NTR} permet d'augmenter l'activation de TrkA par la NT-3, ce qui laisse penser que p75^{NTR} diminue l'affinité de NT-3 pour TrkA (Clary et Reichardt, 1994b). Il a été montré que le NGF induit une augmentation de l'expression de p75^{NTR} dans les neurones sympathiques, menant à une diminution de la sensibilité des axones à la NT-3 (Brennan *et al.*, 1999; Kuruvilla *et al.*, 2004). D'autres travaux mettent en avant le rôle potentialisateur de p75^{NTR} dans la signalisation NGF/TrkA en montrant l'altération de l'activation de TrkA lors de l'inhibition de la liaison du NGF sur le récepteur p75^{NTR} (Barker et Shooter, 1994; Lachance *et al.*, 1997). L'utilisation d'une forme mutante du NGF dont la fixation sur p75^{NTR} est altérée a montré une diminution de l'activation de TrkA par le NGF dans les neurones en développement (Rydén *et al.*, 1997).

INTRODUCTION

La coopération entre les récepteurs p75^{NTR} et TrkA impliquent une mise en relation des protéines intracellulaires impliquées dans chacune des voies sous-jacentes à chaque récepteur ce qui conduit à la modulation de ces voies voire même à la mise en place de nouvelles voies de signalisation propres au complexe (Barker, 2007; Chao, 2003). Ainsi, il a été démontré dans des oligodendrocytes qu'en absence de TrkA, le NGF interagit avec p75^{NTR} et active la voie JNK conduisant à la mort neuronale (Casaccia-Bonnet *et al.*, 1996). L'expression de TrkA dans ce type cellulaire permet de stopper la mort cellulaire induite par p75^{NTR} (Yoon *et al.*, 1998). Cette inhibition de la mort neuronale induite initialement par la signalisation NGF/p75^{NTR} serait due à la fois à l'activation des voies de survie propres à la signalisation NGF/TrkA passant par les MAP kinases mais aussi à l'inhibition de la voie pro-apoptotique JNK via l'activation de RAS, de la PI3K et des PKC (Bilderback *et al.*, 2001; Mazzoni *et al.*, 1999; Plo *et al.*, 2004). La coopération entre p75^{NTR} et TrkA serait également nécessaire à l'activation de la voie de signalisation PI3K/mTORC2 impliquée dans la différenciation neuronale des cellules PC12 (Negrini *et al.*, 2013) ou encore dans la croissance accélérée des neurites via une activation de la voie Erk et une régulation du facteur de transcription AP-1 (Diolaiti *et al.*, 2007).

Au vu de ces observations, les collaborations entre p75^{NTR} et TrkA ne sont plus à démontrer. Mais la question de leur interaction physique reste en suspens. En effet, certaines études ont démontré une interaction entre TrkA et p75^{NTR} grâce à des expériences de co-immunoprécipitation (Bibel *et al.*, 1999; Gargano *et al.*, 1997; Huber et Chao, 1995; Lad *et al.*, 2003). Pourtant, une étude structurale a mis en évidence l'existence théorique d'un complexe tripartite p75^{NTR}/NGF/TrkA (1:2:1) dans lequel les parties extracellulaires de p75^{NTR} et TrkA peuvent fixer les parties opposées du dimère de NGF sans confrontations stériques (Wehrman *et al.*, 2007), écartant l'hypothèse d'une interaction directe entre les deux récepteurs. Des études ont cependant démontré qu'une interaction directe pouvait être envisagée. Par exemple, l'utilisation d'une forme mutée de p75^{NTR} ne pouvant fixer le NGF conserve néanmoins la capacité d'augmenter l'affinité de TrkA pour le NGF (Esposito *et al.*, 2001). De la même manière, un homologue de p75^{NTR} dépourvu des domaines de liaison au NGF, la protéine NRH2, a été montré comme pouvant interagir avec TrkA et permettant d'augmenter l'affinité de ce récepteur pour le NGF (Murray *et al.*, 2004). La co-immunoprécipitation des récepteurs p75^{NTR} et TrkA endogènes dans des cellules PC12 indiquerait également que le

INTRODUCTION

complexe peut se former en absence de NGF (Yano et Chao, 2000). Cette interaction physique a finalement été démontré dans les parties intracellulaires des récepteurs plutôt que dans les parties extracellulaires (Esposito *et al.*, 2001; Iacaruso *et al.*, 2011). Une étude récente a par ailleurs proposé un nouveau modèle de formation du complexe TrkA/NGF/p75^{NTR} selon une stœchiométrie 2:4:2 (Covaceuszach *et al.*, 2015).

2. Interaction p75^{NTR}/sortiline

Les proneurotrophines ont largement été décrites comme possédant des effets proapoptotiques dans les cellules neuronales (Lee et Chao, 2001). Le proNGF ne fit pas exception et ses effets proapoptotiques furent alloués à sa fixation au récepteur p75^{NTR} et à l'activation conséquente des voies de signalisation de ce récepteur (Beattie *et al.*, 2002). Toutefois, un problème se pose car le proNGF est capable de fixer le récepteur TrkA et le récepteur p75^{NTR} avec la même affinité ($K_d = 15 \times 10^{-9}$ M) (Nykjaer *et al.*, 2004). Connaissant la signalisation du NGF qui conduit à la survie et qui passe par TrkA et même le complexe TrkA/p75^{NTR}, la question se pose quant au choix de la signalisation qui en résulte et on peut alors imaginer une compétition entre le NGF et son précurseur (Chao, 2003; Nykjaer *et al.*, 2005). La découverte de la sortiline comme récepteur des proneurotrophines a permis d'expliquer ce paradoxe. En effet, de la même manière que pour le complexe TrkA/p75^{NTR}, la co-expression du récepteur p75^{NTR} et de la sortiline permet la mise en place de sites de haute affinité pour le proNGF au niveau de p75^{NTR} ($K_d = 16 \times 10^{-11}$ M). La sortiline fixe donc le proNGF par son prodomaine et permet d'augmenter l'affinité de la partie mature pour le p75^{NTR} (Feng *et al.*, 2010). La cartographie de cette interaction a montré qu'elle dépendait d'un domaine juxtamembranaire de 23 acides aminés au niveau de p75^{NTR} et probablement du domaine 10CC de la sortiline (Skeldal *et al.*, 2012). La signalisation sous-jacente au complexe p75^{NTR}/sortiline a été relativement peu étudiée et on estime que la signalisation proapoptotique du proNGF est principalement due à la potentialisation des voies de signalisation de p75^{NTR} (Nykjaer et Willnow, 2012; Skeldal *et al.*, 2011). Cependant, il a été montré que la protéine NRH2 augmente l'expression de proNGF et de ses récepteurs tout en favorisant l'association entre p75^{NTR} et la sortiline (Kim et Hempstead, 2009; Zeng *et al.*, 2015). De plus, la sortiline augmente le clivage de p75^{NTR} suite à la stimulation au proNGF, ce qui résulte en la création du fragment p75^{NTR}-CTF et donc à la mise en place d'une autre voie proapoptotique (Skeldal *et al.*, 2012).

INTRODUCTION

3. Interaction TrkA/sortiline

La plasticité des réseaux de récepteurs membranaires est encore démontrée par la découverte récente d'une interaction entre le récepteur TrkA et la sortiline. En effet, grâce à l'utilisation de proNGF muté incapable d'être clivé en NGF mature, plusieurs équipes ont démontré que la proneurotrophine était capable d'activer TrkA et ses signalisations sous-jacentes, notamment la voie des MAPK conduisant à la survie cellulaire ([Armugam et al., 2012](#); [Clewes et al., 2008](#); [Fahnestock et al., 2004](#); [Sobottka et al., 2008](#)). Cependant, l'équipe de Boutilier démontra que le proNGF en lui-même était incapable d'activer TrkA, mais plutôt que l'endocytose et le clivage du proNGF était nécessaire à cette activation ([Boutilier et al., 2008](#)). Malgré cela, des études d'immunoprécipitation ont montré une interaction entre TrkA et le proNGF dans les cellules PC12 ([Fahnestock et al., 2004](#)). L'activation de TrkA par le proNGF est encore débattue, mais la faible affinité de cette proneurotrophine pour TrkA par rapport à sa forme mature ne fait aucun doute. Pour réconcilier ces observations, l'équipe de Vaegter a mis en lumière il y a quelques années l'existence d'un complexe sortiline/TrkA conduisant à la survie neuronale ([Vaegter et al., 2011](#)). Notre équipe a par la suite démontré que ce complexe était formé suite à une stimulation par le proNGF et qu'il conduisait à l'activation de TrkA et à l'invasion des cellules cancéreuses mammaires, indépendamment de p75^{NTR} ([Demont et al., 2012](#)).

L'existence de ces interactions entre les récepteurs du (pro)NGF suggère l'existence d'une régulation fine des voies de signalisations sous-jacentes suite à l'induction par le proNGF ou le NGF, conduisant principalement à la survie ou à l'apoptose. Ces signalisations dépendent fortement du contexte cellulaire, et notamment des niveaux de récepteurs présents à la membrane cellulaire. En effet, il a été démontré que seul le proNGF pouvait induire à la fois l'apoptose et la survie neuronale, et que ce choix dépendait de la balance entre les niveaux de TrkA et p75^{NTR}, mais pas de la sortiline ([Ioannou et Fahnestock, 2017](#)) (Figure 26).

INTRODUCTION

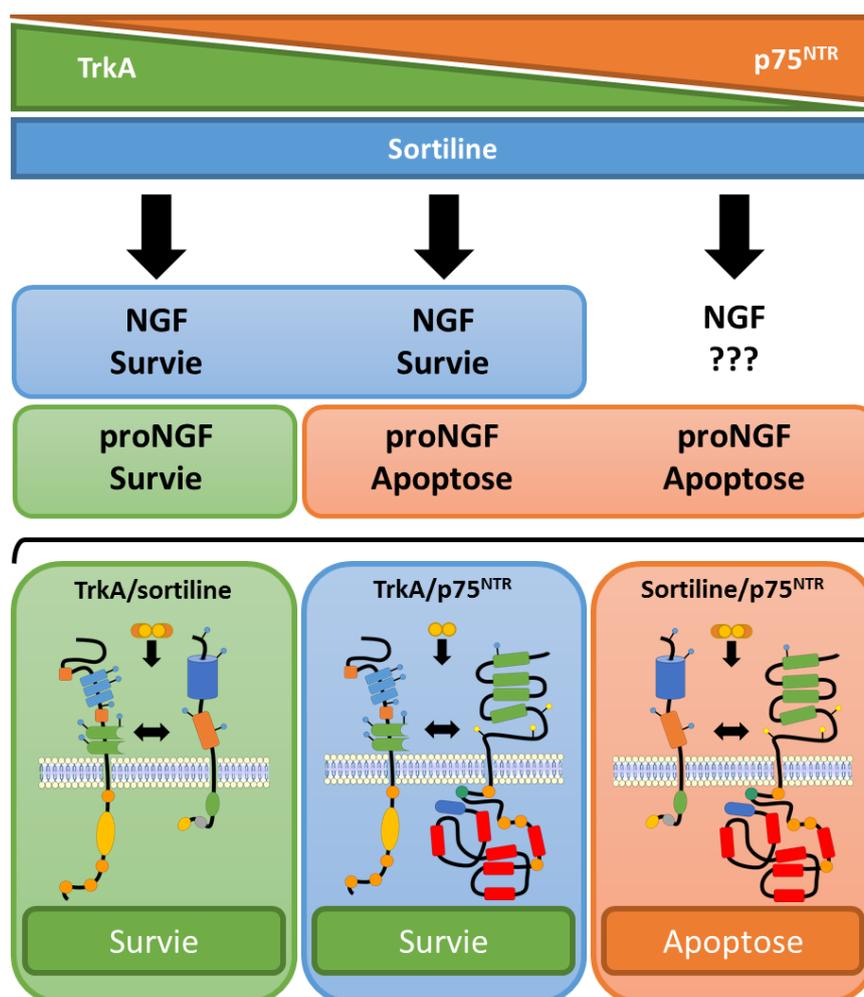


Figure 26 : La balance des signalisations du (pro)NGF

Les signalisations mises en place par le NGF ou son précurseur dépendent de la balance entre ligands et récepteurs présents. Ainsi, l'interaction entre TrkA et la sortiline, en présence de proNGF, permet la mise en place de voies de survie et de migration. L'interaction entre TrkA et p75^{NTR}, en présence de NGF, permet l'induction de la survie. L'interaction entre la sortiline et p75^{NTR} est mise en place en l'absence de TrkA, sous stimulation au proNGF, et induit l'apoptose (adaptée de [Ioannou et Fahnestock, 2017](#)).

D. L'importance des co-récepteurs : exemple de CD44

1. Interactome de TrkA : la partie immergée de l'iceberg

L'étude du NGF et de son précurseur dans les différents cancers ont permis d'identifier de nouvelles voies ainsi que de nouveaux partenaires à l'origine de la mise en place de ces signalisations ([Demir et al., 2016](#)). Ainsi, une interaction entre l'E3 ubiquitin ligase CBL-B (*Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene b*) et TrkA a été mise en évidence dans des lignées cellulaires de neuroblastome ([Emdal et al., 2015](#)). Le recrutement de CBL-B par TrkA, suite à une stimulation au NGF, participerait à la régulation de la signalisation protumorale de

INTRODUCTION

TrkA *via* son ubiquitylation et sa dégradation. Dans les glioblastomes, où TrkA est de bon pronostic, une interaction intracellulaire entre TrkA et la protéine d'échafaudage CCM2 (*Cerebral Cavernous Malformation 2*) conduisant à la mort des cellules a été mise en évidence, ce qui pourrait expliquer les effets bénéfiques de TrkA observés dans ce type de cancers (Harel *et al.*, 2009). L'impact du NGF sur le cycle cellulaire a également été approfondi suite à la découverte de son lien avec le gardien du génome p53. En effet, dans des lignées cellulaires de prolactinome, p53 est inactivée par une mutation conformationnelle et sa ségrégation cytoplasmique. La stimulation par le NGF restaure la structure de p53 permettant une inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses (Facchetti *et al.*, 2004). Cette voie dépendrait uniquement de TrkA et non de p75^{NTR}. Dans la même optique, notre laboratoire a récemment découvert l'existence d'une coopération entre le récepteur TrkA et une protéine de surface membranaire, la glycoprotéine CD44 (Aubert *et al.*, 2015). Cette coopération serait à l'origine de la mise en place d'une toute nouvelle voie de signalisation impliquée dans les effets pro-tumoraux du NGF. En effet, le recrutement de CD44 par TrkA conduit à l'activation de la voie p115RhoGEF/RhoA/ROCK1 menant à l'invasion des cellules cancéreuses de sein (Figure 27). De façon intéressante, cette signalisation a été montrée comme étant indépendante de l'activité kinase de TrkA, suggérant que le manque d'efficacité des inhibiteurs de TrkA tels que le CEP-701 pourrait être dû à ce mécanisme de résistance particulier (Aubert *et al.*, 2015). Dans cette même étude, le ciblage de l'activité kinase de TrkA ainsi que de CD44 conduisit à une inhibition accrue du développement tumoral dans un modèle de souris xénogreffée, soulignant l'intérêt de cibler l'ensemble des acteurs de la signalisation pour améliorer la prise en charge thérapeutique des cancers.

INTRODUCTION

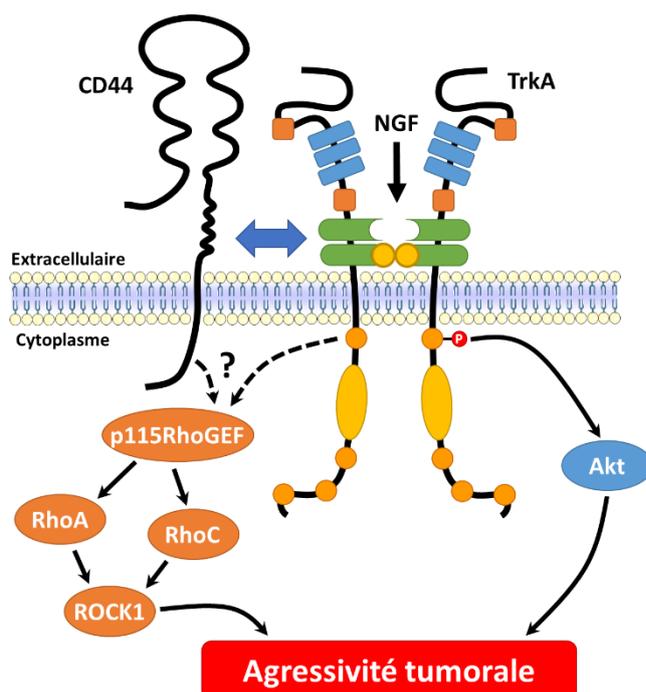


Figure 27 : Une nouvelle interaction entre CD44 et TrkA découverte dans le cancer du sein

Sous stimulation au NGF, une interaction entre le récepteur TrkA et la glycoprotéine CD44 se met en place. Contrairement aux voies connues mises en place par la fixation du NGF sur TrkA, l'interaction entre TrkA et CD44 permet l'activation de la voie p115RhoGEF/Rho/ROCK1 indépendamment de la phosphorylation de TrkA. Le processus par lequel p115RhoGEF est activé par cette interaction est encore inconnu. Cette interaction pourrait expliquer les résistances mises en évidence pour les traitements ciblant l'activité kinase de TrkA tels que le CEP-701 (adaptée de Aubert et al., 2015).

2. CD44, un partenaire des RTKs

Les molécules d'adhésion cellulaire (CAMs : *Cell Adhesion Molecules*) présentes à la surface cellulaire peuvent interagir avec les récepteurs membranaires et influencer leur activation, leur signalisation ou l'internalisation de ces derniers. Parmi ces CAMs, CD44 s'impose comme un partenaire majeur des RTKs (Orian-Rousseau et Ponta, 2008).

a. Généralités sur CD44

Le terme CD44 représente une famille diversifiée de glycoprotéines transmembranaires codées par un seul gène situé sur le locus chromosomique 11p13 (NCBI gene ID : 960). En effet, le gène *CD44* est constitué de 20 exons dont 10 régulés par l'épissage alternatif (Figure 28). Ainsi, la transcription de *CD44* peut donner naissance à une isoforme standard constituée des 5 premiers (exons 1 à 5) et des 5 derniers exons (exons 6 à 10) appelée CD44 standard (CD44s) mais aussi à de nombreuses autres isoformes qui vont inclure, par épissage alternatif, différents exons variants (exons v2 à v10, l'exon v1 n'étant pas transcrit chez l'homme (Screaton et al., 1993)) et qu'on appellera alors CD44 variants (CD44v) (Ponta et al., 2003, 1998). L'inclusion des différents exons variants dans la structure de CD44 confère

INTRODUCTION

aux isoformes de CD44 une diversité de fonctions et d'expressions spécifiques aux variants introduits.

Les cinq premiers exons codent pour le domaine globulaire N-terminal de la protéine qui contient différents sites de liaison pour de nombreux composants de la matrice extracellulaire tels que l'acide hyaluronique, principal ligand de CD44, mais aussi le collagène, la laminine ou encore la fibronectine (Bajorath, 2000). La séquence d'interaction avec l'acide hyaluronique, et d'autres glycosaminoglycanes, a d'ailleurs été cartographiée et se situe entre les acides aminés 32 et 123 (Naor *et al.*, 1997; Sherman *et al.*, 1994). Cette partie globulaire est constituée de 6 résidus cystéine qui forment des ponts disulfures permettant la formation de trois sous-domaines globulaires. Ces ponts disulfures sont impliqués dans la structuration de CD44 mais aussi dans la fixation à l'acide hyaluronique (Banerji *et al.*, 1998). Sous le domaine globulaire vient le domaine juxtamembranaire de la partie extracellulaire de CD44 qui est composée par 46 acides aminés dans le cas de CD44s, mais qui peut être élargie par l'insertion de variants (jusqu'à 381 acides aminés en plus chez l'homme) (Screaton *et al.*, 1992). Différentes glycosylations viennent compléter la structure du domaine extracellulaire de CD44 et font passer la masse moléculaire du CD44s de 38 kDa à environ 90 kDa (Goldstein *et al.*, 1989). Ces glycosylations sont notamment impliquées dans la fixation de l'acide hyaluronique (Skelton *et al.*, 1998). Il est à noter que l'insertion des différents variants confère également à CD44 des sites de modifications post-traductionnelles spécifiques comme par exemple l'exon v3 qui procure un site héparane sulfate à la protéine (Bennett *et al.*, 1995).

La partie intramembranaire de CD44 est composée de 23 acides aminés hydrophobiques et d'un résidue cystéine qui semble participer à la formation d'oligomère de CD44 (Liu *et Sy*, 1997). Cette partie est impliquée dans l'incorporation de CD44 au sein des radeaux lipidiques (Neame *et al.*, 1995), ce qui participe au phénomène de « homing » des lymphocytes (Jalkanen *et al.*, 1986; Underhill, 1992). Le domaine intracellulaire de CD44 constitue une plateforme d'interaction avec de nombreuses molécules associées au cytosquelette notamment l'ankyrine, la PKC ou encore les protéines ERM (*Ezrin-Radixin-Moesin*) qui se fixent à différentes séquences situées dans ce domaine intracellulaire (Bourguignon *et al.*, 1998; Lokeshwar *et al.*, 1994; Lokeshwar *et Bourguignon*, 1991).

INTRODUCTION

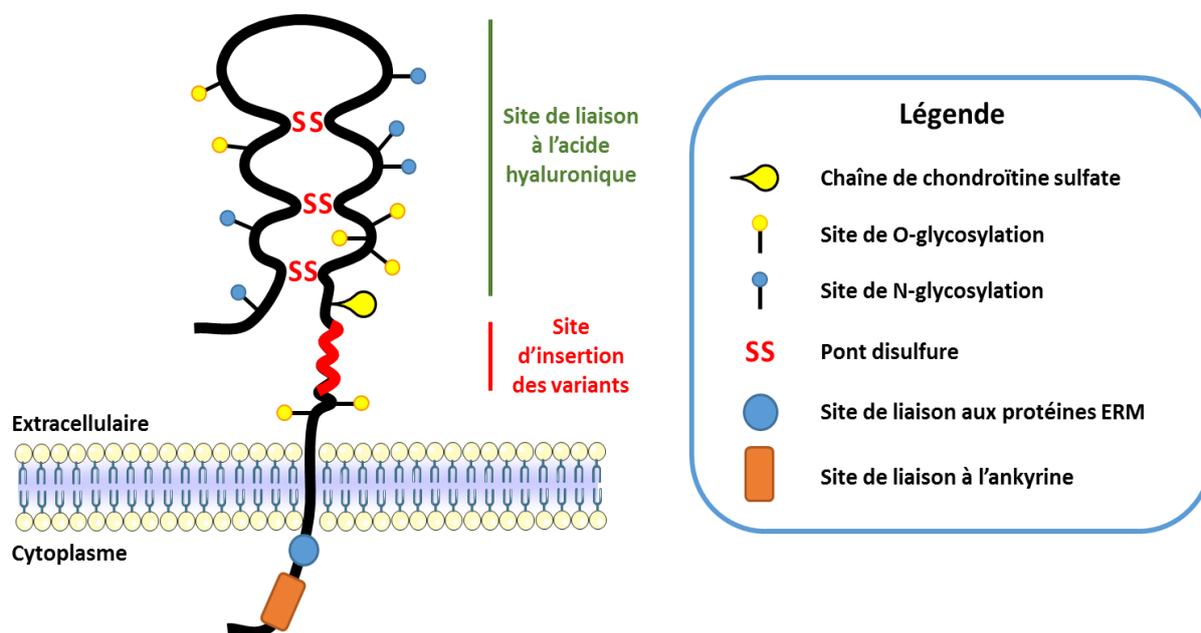


Figure 28 : Représentation schématique de CD44

La glycoprotéine CD44 est composée d'une partie extracellulaire formée en grande partie par un domaine de liaison à l'acide hyaluronique et à d'autres composants de la matrice extracellulaire tels que l'ostéopontine ou le collagène. Ce domaine est structuré par 3 ponts disulfures permettant la formation de 3 sous-domaines globulaires. A la suite de ce domaine de liaison se trouve la zone d'insertion d'exons variants à l'origine de la diversité des protéines CD44. La partie intramembranaire est importante dans la formation d'oligomères de CD44. La partie intracellulaire contient différentes séquences d'interaction avec des protéines intracellulaires telles que les protéines ERM ou encore l'ankyrine.

En tant que molécules impliquées dans l'adhésion et les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire, les protéines membres de la famille CD44 sont impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques. Elles participent à des processus cellulaires tels que le développement des organes, le guidage des axones neuronaux, diverses fonctions immunitaires ou encore l'hématopoïèse (Ponta *et al.*, 1998). CD44s est exprimé de façon ubiquitaire mais les isoformes variants de CD44 présentent une distribution restreinte en fonction des exons présents au sein de la séquence protéique (Sneath et Mangham, 1998). Par exemple, l'isoforme contenant les exons variants 8, 9 et 10 (CD44v8-10) est préférentiellement retrouvée dans les cellules épithéliales (Brown *et al.*, 1991; Stamenkovic *et al.*, 1991) tandis que l'isoforme la plus longue contenant les exons variants 3 à 10 (CD44v3-10) a été retrouvée dans les kératinocytes (Hofmann *et al.*, 1991) (Figure 29). Certaines

INTRODUCTION

isoformes de CD44 sont en particulier impliquées dans différentes étapes de la tumorigenèse et notamment dans le processus métastatique (Günthert *et al.*, 1991). L'implication des variants de CD44 est reporté dans de nombreux cancers comme le cancer du sein (Dall *et al.*, 1995; Iida et Bourguignon, 1995; Rodriguez *et al.*, 1995), du colon (Mulder *et al.*, 1994), de la thyroïde (Gasbarri *et al.*, 1999), du poumon (Mizera-Nyczak *et al.*, 2001), des ovaires (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 1998; Saegusa *et al.*, 1999) ou encore dans les mélanomes (Schaidt *et al.*, 1998). Ces isoformes peuvent participer à la progression tumorale *via* leurs propres signalisations, notamment grâce à leur interaction avec l'acide hyaluronique ou d'autres composants de la matrice extracellulaire, mais aussi *via* leur capacité à agir en tant que corécepteurs membranaires pour différents récepteurs. En tant que corécepteurs, les isoformes de CD44 peuvent alors servir à présenter le ligand, prévenir ou induire l'internalisation ou encore induire ou amplifier la signalisation des récepteurs (Orian-Rousseau et Ponta, 2008). Parmi ces isoformes, les isoformes contenant les variants 3 et 6 sont particulièrement impliquées dans les interactions avec les récepteurs tyrosine kinases.

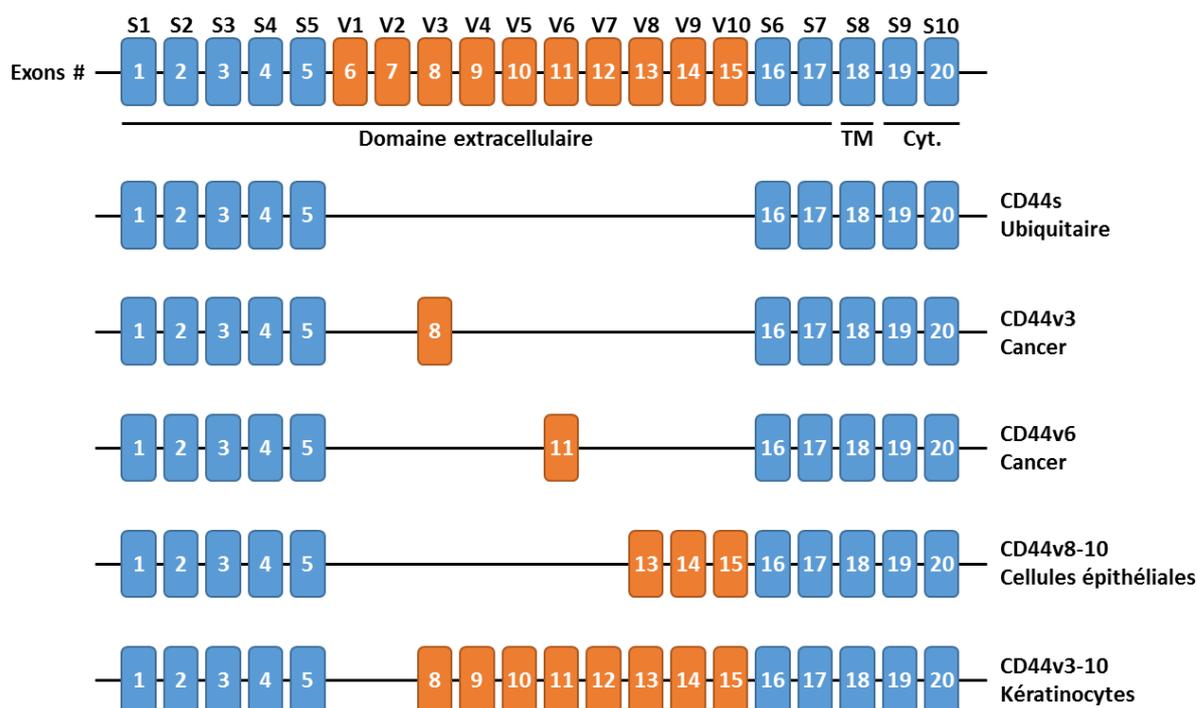


Figure 29 : Les isoformes de CD44

Le gène de CD44 est constitué de 20 exons dont 10 sont soumis à l'épissage alternatif. Les exons S1 à S10 désignent les exons standards qui ne subissent pas l'épissage alternatif. Les exons V1 à V10 désignent les exons variants. L'insertion de différents variants procure à CD44 une diversité de fonction et d'expression. Ainsi, CD44s est exprimée de façon ubiquitaire, CD44v3 et CD44v6 sont retrouvées surexprimées dans différents cancers, CD44v8-10 est exprimée majoritairement dans les cellules épithéliales tandis que la plus longue isoforme CD44v3-10 a été découverte dans les kératinocytes. TM : Domaine transmembranaire ; Cyt. : Domaine cytoplasmique (adaptée de Weidle *et al.*, 2011).

INTRODUCTION

b. CD44 : co-récepteur des RTKs

L'insertion de l'exon variant 3 dans la structure de CD44 lui fournit un double motif Sérine-Glycine ce qui permet l'attachement d'un polysaccharide héparane sulfate ou chondroïtine sulfate (Bennett *et al.*, 1995). En conséquence, les isoformes de CD44 contenant le variant 3 peuvent jouer le rôle de protéoglycanes à héparane sulfate (HSPGs : *Heparan Sulfate Proteoglycans*) et possèdent alors la capacité de fixer des facteurs de croissance tels que le FGF, l'HB-EGF ou encore le VEGF (Jones *et al.*, 2000). Ce fut l'équipe de Sherman qui mis pour la première fois en évidence le rôle de co-récepteur d'une isoforme de CD44 contenant le variant 3 (Sherman *et al.*, 1998). Dans cette étude portant sur le développement des membres, cette isoforme s'avéra être nécessaire pour la présentation de différents FGFs à leur récepteur correspondant situés au niveau des cellules mésenchymateuses, induisant alors la croissance cellulaire. Le rôle de corécepteur de CD44v3 a également été montré pour l'activation d'ERBB4 par le facteur de croissance HB-EGF (*Heparin Binding-EGF*) conduisant au remodelage du tissu reproducteur femelle (Yu *et al.*, 2002). De façon intéressante, ce mécanisme repose sur le recrutement de l'enzyme MMP7 (*Matrix MetalloProteinase 7*, ou Matrilysin) au niveau de la membrane par CD44v3, qui va alors permettre la maturation du précurseur HB-EGF par clivage protéolytique ce qui conduira à l'activation d'ERBB4 conduisant à la survie cellulaire (Yu *et al.*, 2002). Ce processus a également été mise en évidence dans la progression tumorale des cancers cutanées à cellules squameuses (Kivisaari *et al.*, 2010) et dans des lignées épithéliales de cancer du sein (Lynch *et al.*, 2007). La fixation du HGF/SF (*Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor*) par CD44v3 permettrait également de concentrer ce facteur de croissance au niveau de la membrane cellulaire et de le présenter à son récepteur C-MET, qui va alors activer des voies de signalisation dépendantes des kinases ERK1 et ERK2 menant à la croissance et à la motilité (Tanimura *et al.*, 1998; van der Voort *et al.*, 2000). Grâce à des traitements à l'héparinase, ce mécanisme a été montré comme dépendant fortement de la chaîne d'héparane sulfate contenue par CD44v3.

Le variant 6 de CD44 confère également la capacité aux isoformes le contenant d'interagir avec de nombreux RTKs. De manière surprenante, il a été montré que CD44v6, une forme de CD44 ne présentant pas de chaînes d'héparane sulfate, pouvait également interagir avec le récepteur Met dans des lignées cancéreuses pancréatiques de rat (Orlan-Rousseau *et al.*, 2002). Ainsi, CD44v6, l'HGF et le récepteur MET forment un complexe ternaire

INTRODUCTION

indépendamment de la présence de chaînes d'héparane sulfate. CD44v6 agit comme régulateur de l'activation de MET par la présentation de son ligand HGF et fixe également les protéines ERM au niveau sa queue cytoplasmique, faisant le lien avec le cytosquelette et jouant le rôle de plateforme intracellulaire pour la signalisation de MET et l'activation sous-jacente de la cascade RAS-SOS (Orlan-Rousseau *et al.*, 2007). Des analyses par mutation ont d'ailleurs permis d'identifier trois acides aminés au sein de la séquence du variant 6 requis pour l'activation de Met, ce qui a conduit au développement d'un peptide mimétique de cette séquence capable de bloquer l'activation de MET (Matzke *et al.*, 2005). De manière surprenante, ce peptide bloque également l'activation de VEGFR-2, suggérant un lien entre CD44v6 et l'activation de VEGFR-2 (Tremmel *et al.*, 2009). Des expériences de coimmunoprécipitation en absence de VEGF ont permis de mettre en évidence que CD44v6 et VEGFR-2 sont constitutivement associés. Plus récemment, la nécessité du CD44v6 dans l'activation d'EGFR par l'EGF, l'Epiréguline et la neuréguline a été démontré dans le cancer du sein (Morath *et al.*, 2018).

L'ensemble de ces observations montre que les propriétés uniques de fixation de ligands que possèdent certaines isoformes de CD44 leur confèrent une capacité de support de l'activation des RTKs. De plus, il semblerait que le recrutement d'une isoforme de CD44 pour l'activation d'un RTK particulier soit extrêmement spécifique du ou des exons variants inclus dans la structure protéique de CD44. Ainsi, le ciblage de certaines isoformes de CD44 impliquées dans les processus protumoraux, notamment celles contenant les variants 3 et 6, semble être une approche thérapeutique prometteuse. Le nombre important d'isoformes de CD44 ainsi que leurs implications dans de nombreux processus cellulaires différents pourraient également expliquer la corrélation de l'expression de CD44 avec à la fois de bons et de mauvais pronostics cliniques, notamment dans le cancer du sein (Louderbough et Schroeder, 2011).

c. CD44 comme cible thérapeutique dans les cancers

Le nombre important d'études démontrant une association entre CD44 et le processus métastatique ont poussé différents groupes à cibler CD44 en thérapie, par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, de peptides mimétiques ou encore par des thérapies reposant sur l'utilisation de miRNAs.

INTRODUCTION

L'utilisation d'un anticorps monoclonal spécifique de CD44v6 a montré une diminution significative de la dissémination métastatique dans un modèle de xénogreffe de cellules cancéreuses pancréatiques (Seiter *et al.*, 1993). Compte tenu de ces observations ainsi que de la corrélation entre l'expression de CD44v6 et la progression tumorale dans les carcinomes à cellules squameuses de la tête et du cou (HNSCCs : *Head and Neck Squamous Cell Carcinomas*) (Heider *et al.*, 2004), un anticorps monoclonal humanisé ciblant CD44v6, le bivatuzumab, fut testé en essais clinique de phase 1. Dans cet essai clinique, le bivatuzumab couplé à la drogue cytotoxique mertansine fut administré à des patients atteints d'HNSCC. Malgré une régression de la croissance tumorale observée chez deux patients sur vingt, l'essai fut stoppé dû à la mort d'un des patients (Orlan-Rousseau, 2010). Le même anticorps mais radiomarqué, BIWA4, a été testé sur des patients atteints par un cancer du sein de stade précoce mais l'accumulation de l'anticorps dans des tissus non tumoraux et les résultats non significatifs sur la diminution de la masse tumorale conduisirent à l'abandon des études (Koppe *et al.*, 2004). Concernant les peptides mimétiques de CD44v6, les résultats prometteurs obtenus *in vitro* suggèrent qu'ils pourraient être utilisés en essais cliniques. Leur efficacité est actuellement testée dans des modèles de xénogreffes de cancer du sein et de l'œsophage (Orlan-Rousseau, 2010). L'amélioration de ces peptides est également en cours d'exploration pour augmenter leur efficacité *in vivo* (L. Li *et al.*, 2017).

Malgré des résultats prometteurs pour les anticorps humanisés ciblant CD44v6, les essais cliniques sont arrêtés suite au décès d'un patient, probablement à cause d'effets secondaires. Le ciblage de CD44, et en particulier le variant 6, reste cependant une intéressante option thérapeutique. La caractérisation des mécanismes impliquant CD44 doit être approfondie afin de pouvoir limiter d'éventuels effets indésirables chez les patients.

PRÉSENTATION DE LA THÈSE

Contexte scientifique

Avec près de 60 000 nouveaux cas estimés en France en 2017, le cancer du sein est le deuxième cancer le plus fréquent en France et s'élève à la première place chez la femme que ce soit en France mais aussi dans le monde. C'est également le cancer le plus mortel chez la femme, avec près de 12 000 décès estimés en France en 2017, ce qui représente près de 20 % des décès féminins par cancer (Jéhannin-Ligier *et al.*, 2017). Le développement de thérapies anti-œstrogéniques, qui restent les stratégies thérapeutiques les plus utilisées dans le traitement des cancers du sein, a nettement contribué à l'amélioration de la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein (Higgins et Baselga, 2011). Cependant, tous les cancers du sein ne sont pas hormono-dépendants et ne vont donc pas répondre favorablement à ce type de traitements. L'hétérogénéité inter et intra-tumorale du cancer du sein nécessite la recherche d'autres cibles thérapeutiques. Les cellules cancéreuses de sein dépendent fortement d'autres molécules et sont notamment régulées par les facteurs de croissance et leurs récepteurs associées tels que l'IGFR ou encore HER2 (Lann et LeRoith, 2008; Voutsadakis, 2018). Parmi ces facteurs de croissance, la famille des neurotrophines et leurs récepteurs s'imposent de plus en plus comme des éléments importants dans la progression du cancer du sein, à travers leurs rôles dans différents processus protumoraux (Hondermarck, 2012). Dans ce contexte, le laboratoire d'accueil, l'INSERM U908, a été le premier laboratoire à démontrer l'implication du Nerve Growth Factor dans le cancer du sein. Le NGF est le membre prototypique de la famille des neurotrophines, des facteurs de croissance initialement synthétisés sous la forme de pré-pro-neurotrophines et dont les actions sont principalement décrites dans les cellules neuronales (Skaper, 2012). Cependant, le laboratoire INSERM U908 a mis en évidence que le NGF et son précurseur, le pro-NGF, sont des facteurs déterminants de la tumorigenèse mammaire, et plus particulièrement de la croissance et de l'invasion des cellules cancéreuses de sein (Demont *et al.*, 2012; Descamps *et al.*, 1998). Ainsi, le développement de composés ciblant les facteurs de croissance tels que le NGF et leurs récepteurs constitue un axe d'approches thérapeutiques prometteuses. Néanmoins, ces thérapies ciblées peinent à démontrer leur efficacité ; la plupart d'entre elles ne passent pas le stade des études précliniques ou demeurent en phases précoces d'essais cliniques, comme ce fut le cas pour le CEP-701, un inhibiteur multi-kinase ciblant notamment TrkA (Marshall *et*

PRÉSENTATION DE LA THÈSE

al., 2005). Les origines de ces résistances sont multiples et peuvent s'expliquer par une biodisponibilité insuffisante de la drogue (Collins *et al.*, 2007) ou encore à la plasticité des voies de signalisations intracellulaires qui viennent compenser le blocage de certains récepteurs (Holz *et al.*, 2013). Une autre hypothèse expliquant l'origine de ces résistances serait la plasticité des réseaux de récepteurs membranaires. En effet, de nombreux exemples de coopérations entre les molécules présents à la surface membranaire, résultant en l'établissement de nouvelles voies oncogéniques, sont régulièrement mis en évidence (Choy *et al.*, 2017; Orian-Rousseau et Ponta, 2008; Paulson *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2012). Ainsi, le laboratoire INSERM U908 a récemment mis en évidence l'existence d'une coopération entre TrkA et CD44, sous stimulation au NGF, qui résulte en la mise en place d'une voie de signalisation indépendante de la phosphorylation de TrkA *via* p115RhoGEF/RhoC/RhoA/ROCK1 (Aubert *et al.*, 2015). De plus, une coopération entre la sortiline et TrkA mise en place par le proNGF a également été démontrée par le laboratoire INSERM U908 (Demont *et al.*, 2012).

Objectifs de la thèse

Malgré la mise en évidence de ces nouvelles coopérations membranaires, la compréhension de leur mise en place et de leurs signalisations sous-jacentes restent parcellaires. Dans une volonté de mieux définir ces coopérations et de faciliter leur ciblage thérapeutique, mon travail de thèse a consisté à caractériser la mise en place des complexes TrkA/CD44 et sortiline/TrkA, respectivement dépendants d'une stimulation au NGF et au proNGF, dans les cellules cancéreuses mammaires. Concernant l'interaction TrkA/CD44, j'ai plus particulièrement déterminé le variant impliqué dans l'interaction ce qui nous a permis d'étudier plus précisément la mise en place et la signalisation de ce complexe, ainsi que d'étudier des méthodes pour bloquer cette interaction protumorale. Par ailleurs, le travail effectué sur CD44 a été étendu grâce à une collaboration avec le Professeur Véronique Orian-Rousseau (Institut de Technologies de Karlsruhe, Allemagne) pour étudier l'implication de CD44 dans la mise en place d'autres complexes impliquant des RTKs dans le cancer du sein. Concernant l'interaction TrkA/sortiline, mon travail a consisté à étudier sa mise en place dans

PRÉSENTATION DE LA THÈSE

les cancers du sein et à mettre en évidence un nouveau déterminant dans cette interaction : le récepteur EphA2.

Valorisation des résultats

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet de trois publications dans des journaux internationaux dans lesquelles je suis premier auteur et d'une publication en collaboration avec le Pr. Véronique Orian-Rousseau (Karlsruhe, Allemagne) dans laquelle je suis co-auteur:

Article de revue : "CD44v3 in cancers"

Lévêque R., Le Bourhis X., Toillon RA. (En préparation)

Article 1 : "Differential recruitment of CD44 isoforms by ErbB ligands reveals an involvement of CD44 in breast cancer"

Morath I., Jung C., Lévêque R., Linfeng C., Toillon RA., Warth A. and Orian-Rousseau V., (Publié dans ***Oncogene***, 2018). (Annexe n°1)

Article 2 : "Ephrin type-A receptor 2 cooperates with TrkA to increase breast tumor aggressiveness"

Lévêque R., Corbet C., Aubert L., Guilbert M., Lagadec C., Adriaenssens E., Duval J., Finetti P., Birbaum D., Magné N., Chopin V., Bertucci F., Le Bourhis X. and Toillon RA. (Publié dans ***Cancer Letters***, 2019) (Annexe n°2)

Article 3 : "The variant 3 of CD44 cooperates with TrkA to increase cell growth in triple negative breast cancer cells"

Lévêque R., Aubert L., Guilbert M., Corbet C., Lagadec C., Chopin V., Duval J., Angrand PO., Völkel P., Orian-Rousseau V., Chevalier D., Le Bourhis X. and Toillon RA. (En préparation)

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Modèles expérimentaux

A. Modèles *in vitro*

Le cancer du sein est une pathologie hétérogène présentant des caractéristiques biologiques et histopathologiques variables (Viale, 2012). En se basant sur le travail de Perou et ses collègues (Perou *et al.*, 2000), nous avons choisi de mener les expériences sur plusieurs lignées de cancer du sein différentes. En effet, malgré l'extraordinaire hétérogénéité des cancers du sein, trois grands types se détachent selon les taux d'expression du récepteur à la progestérone, du récepteur aux oestrogènes et du récepteur HER2. Ces trois classes moléculaires, décrites en Introduction, sont la classe triple-négative, la classe luminaire ainsi que la classe HER2+. Nous avons sélectionné deux lignées cancéreuses mammaires représentatives de chacune de ces classes moléculaires afin de savoir si nos observations étaient dépendantes de la classe moléculaire ou d'une autre caractéristique propre à la lignée. Les expériences ont donc été réalisées sur deux lignées triples-négatives (MDA-MB-231 et SUM159-PT), deux lignées lumineales (MCF-7 et T-47D) et deux lignées HER2+ (BT-474 et HCC-1954). Les lignées MDA-MB-231, MCF-7 et T-47D sont issues d'un site métastatique provenant d'une effusion pleurale (Cailleau *et al.*, 1974). Les lignées SUM159-PT, BT-474 et HCC-1954 sont dérivées d'un site primaire d'adénocarcinome mammaire. Toutes les lignées ont été obtenues auprès de la société American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) exceptée la lignée SUM159-PT qui a été obtenue auprès de la société Asterand Bioscience (Etats-Unis).

Par ailleurs, une lignée non cancéreuse a été utilisée comme modèle de transfection dans certaines expériences : la lignée COS-7. Les cellules COS-7 sont dérivées d'un tissu de rein de singe vert (*Cercopithecus aethiops*) et ont été immortalisées *via* l'utilisation du virus SV40 permettant la production de l'antigène T (Gluzman, 1981). Ces cellules sont largement utilisées comme modèle de transfection de protéines recombinantes car elles possèdent un métabolisme amoindri ainsi qu'une très bonne tolérance aux techniques de transfection.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

B. Modèles *in vivo*

En plus des modèles *in vitro*, différents modèles *in vivo* ont été utilisés pour compléter les observations et résultats obtenus.

- Xénogreffes de cellules tumorales mammaires en souris SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*): Toutes les expériences impliquant des souris ont reçu l'approbation du comité d'éthique de l'Université de Lille et ont été menées selon la réglementation nationale en vigueur en France.
- Tissue MicroArray (TMA) : Les TMAs sont des lames histologiques contenant plusieurs dizaines de spots d'échantillons tumoraux provenant de différentes patientes. Elles ont été obtenues *via* les sociétés SuperBioChips Laboratories (Corée du sud ; CBA4 : 39 spots), US BioMax, Inc. (Etats-unis ; HBre-Duc150-Sur-01 : 150 spots).

II. Culture cellulaire

A. Entretien des lignées

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 sont cultivées dans du milieu minimum essentiel de Eagle (EMEM) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Hyclone, Etats-unis), 1 % d'acides aminés non essentiels (11140-035, Gibco), 120 µM de pénicilline, 120 µM de streptomycine et 120 µM de Gentamycine. Les cellules SUM159-PT sont cultivées dans du milieu F12 avec 5 % de SVF, 10 mM d'HEPES, 120 µM de pénicilline, 120 µM de streptomycine, 1,72 µM d'insuline, 120 µM de Gentamycine et 2,76 µM d'hydrocortisone. Les cellules T-47D sont cultivées dans du milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) avec 10 % de SVF, 1 % d'acides aminés non essentiels, 120 µM de pénicilline, 120 µM de streptomycine, 1,72 µM d'insuline et 120 µM de Gentamycine. Les cellules BT-474 et HCC-1954 sont cultivées dans du milieu RPMI-1640 (ATCC modified) avec 10 % de SVF, 120 µM de pénicilline et 120 µM de streptomycine. Les cellules COS-7 sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco Essential Minimum Medium) avec 10 % de SVF, 1 % d'acides aminés non essentiels, 120 µM de pénicilline, 120 µM de streptomycine et 120 µM de Gentamycine.

Les cellules sont entretenues dans des flasques de 75 cm² (atmosphère saturée en humidité ; 5 % de CO₂ ; 37°C). A pré-confluence, les cellules sont décollées par l'addition de trypsine / 0,25 % EDTA et réensemencées (passage).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

B. Traitements des cellules aux facteurs de croissance

Avant traitement aux facteurs de croissance, les cellules sont rincées deux fois avec du milieu de sevrage. Le milieu de sevrage utilisé est le même que celui utilisé pour l'entretien des cellules mais contenant 0,1 % de SVF afin de minimiser l'impact d'autres facteurs de croissance. Une fois les rinçages effectués, les cellules sont incubées pendant 24 h. Les cellules sont alors traitées avec 0,5 nM de proNGF non clivable (Alomone Labs, Israël), 16 nM de NGF mature (Alomone Labs, Israël) ou encore 3 nM d'EGF (Sigma-Aldrich, France). Les temps de stimulation varient en fonction de l'expérience et du facteur de croissance utilisé.

L'arrêt de la stimulation est effectué grâce à un refroidissement rapide infligé aux cellules en les plaçant rapidement sur un tapis de glace. Suite à ce refroidissement, les cellules sont rapidement rincées deux fois au PBS 1X avant de poursuivre les expériences.

C. Traitements des cellules aux inhibiteurs

Certaines expériences ont nécessité un traitement préalable des cellules avec certains inhibiteurs, avant les stimulations aux facteurs de croissance. Pour cela, les cellules sont pré-incubées avec les inhibiteurs pendant une durée variable suivant les inhibiteurs utilisés. Ainsi, les traitements au K252a (10 nM, Calbiochem) ou à la Neurotensine (1 μ M, R&D systems) sont effectués 1 heure avant le traitement aux facteurs de croissance. Les traitements aux peptides mimétiques (50 nM, Genscript) sont effectués 30 minutes avant le traitement aux facteurs de croissance. Pour ces traitements, le milieu des cellules n'est pas remplacé. Pour éviter d'éventuelles modifications dans les cellules, les traitements sont dilués dans du milieu de sevrage chauffé à 37°C puis rapidement ajoutés aux cellules en culture sans les sortir de l'incubateur.

III. Transfections

A. Transfections de plasmides

L'établissement de lignées cellulaires transfectées de façon stable a été effectué grâce à la technique de transfection par électroporation. Nous avons pour cela utilisé le dispositif d'électroporation Nucleofector® II (Amaya biosystems) et les kits V (pour les cellules MDA-MB-231, programme T-016) et R (pour les cellules COS-7, programme W-001) fournis par la même compagnie. Avant la transfection, les cellules sont préparées dans des boîtes de

MATÉRIEL ET MÉTHODES

diamètre 90 mm pour atteindre 75 à 80 % de confluence au moment de la transfection. Les plasmides utilisés sont disponibles dans des solutions d'eau MQ ou de tampon TE (10Mm tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) à une concentration comprise entre 1 et 5 µg/µL. Les plasmides suivants ont été utilisés : pcDNA3.1/Hygro-CD44v3-v10, pcDNA3.1/Hygro-CD44v3, pcDNA3.1/Hygro-CD44v6, pcDNA3.1/Hygro-CD44s, pcDNA3.1/Hygro-CD44v3Δ1, pcDNA3.1/Hygro-CD44v3Δ2, pcDNA3.1/Hygro-CD44v3Δ3, pcDNA3.1/Hygro-CD44v3Δ4, pdisplay-HA-TrkA, pdisplay-TrkA-kinase-dead, pdisplay-TrkA-Y490F et le plasmide eGFP (fourni dans le kit Amaxa). Une fois l'électroporation terminée, les cellules sont resuspendues dans le milieu de culture adéquat à 10 % de SVF à 37°C.

Il est nécessaire de remplacer le milieu des cellules 24 heures après la transfection pour éliminer les débris cellulaires résultant du choc de la transfection. La sélection des clones cellulaires ayant correctement intégré le plasmide est effectuée à partir de 48 heures après la transfection. Pour cela, un antibiotique spécifique au plasmide intégré est ajouté dans le milieu de culture. Les cellules transfectées avec les plasmides pdisplay sont sélectionnées avec la généticine (G418) à une concentration d'1 mg/mL. Les cellules transfectées avec les plasmides pcDNA3.1 sont sélectionnées avec l'hygromycine à une concentration de 200 µg/mL. Ces doses ont été préalablement déterminées grâce à un protocole de détermination d'IC50. La sélection à l'antibiotique est maintenue durant deux semaines puis une pression de sélection est maintenue à raison de la moitié de la dose initialement administrée.

B. Transfection de siARNs

Les siARNs ont été transfectés avec le kit INTERFERin™ selon les recommandations du fabricant (Polyplus Transfection, Ozyme, France). Les séquences sélectionnées ont été vérifiées grâce à un « blast » sur l'ensemble du génome humain afin d'éviter toute inhibition non spécifique. Tous les siARNs utilisés ont été fournis et séquencés par la société Eurogentec (France). Suivant la nature de l'expérience et la nature des molécules observées après la transfection (ARNs ou protéines), le temps d'incubation des cellules après transfection était différent. Ainsi, pour des expériences ayant pour objectif d'observer l'inhibition de la production d'ARNm, les cellules sont incubées 24 heures. Pour les protéines, les cellules sont incubées pendant 48 à 72 heures. Une liste des siARNs utilisés pendant cette thèse est fournie en Tableau 5.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nom	Séquences	
si-GFP	sens	GAU-GAA-CUU-CAG-GGU-CAG-C
	anti-sens	GCU-GAC-CCU-GAA-GUU-CAU-C
si-panCD44	sens	GUA-UGA-CAC-AUA-UUG-CUU-C
	anti-sens	GAA-GCA-AUA-UGU-GUC-AUA-C
si-CD44v3_1	sens	UGA-AGA-UGA-AAG-AGA-CAG-ACA
	anti-sens	UGU-CUG-UCU-CUU-UCA-UCU-UCA
si-CD44v3_2	sens	AGG-CAU-UGA-UGA-UGA-UGA-AGA
	anti-sens	UCU-UCA-UCA-UCA-UCA-AUG-CCU
si-TrkA_1	sens	GAA-CCU-GAC-UGA-GCU-CUA-C
	anti-sens	GUA-GAG-CUC-AGU-CAG-GUU-C
si-TrkA_2	sens	UGG-AGU-CUC-UCU-CCU-GGA-A
	anti-sens	UUC-CAG-GAG-AGA-GAC-UCC-A
si-TrkA_3	sens	GCU-GCA-GUG-UCA-UGG-GCA-A
	anti-sens	UUG-CCC-AUG-ACA-CUG-CAG-C
si-EphA2	sens	GCA-AGG-AAG-UGG-UAC-UGC-UGG-ACU-U
	anti-sens	AAG-UCC-AGC-AGU-ACC-ACU-UCC-UUG-C
si-EphA2_sonag	sens	GCG-UAU-CUU-CAU-UGA-GCU-CAA
	anti-sens	UUG-AGC-UCA-AUG-AAG-AUA-CGC
si-p75	sens	AUG-CCU-CCU-UGG-CAC-CUC-C
	anti-sens	GGA-GGU-GCC-AAG-GAG-GCA-U

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des séquences de siARNs utilisées dans cette étude

C. Obtention des plasmides

Obtention du plasmide pdisplay HA-TrkA par ligature enzymatique : La séquence du gène *NTRK1* (NM_002529.3) a été obtenue par rétrotranscription des ARNm issues des cellules MDA-MB-231. Elle a été insérée dans le vecteur pdisplay (Invitrogen) contenant la séquence du peptide HA. Pour cela, la séquence de *NTRK1* est d'abord amplifiée par PCR avec les amorces TrkA_HA₁ et TrkA_HA₂ (Tableau 6) à partir d'un plasmide pcDNA3 (Invitrogen) contenant la séquence de *NTRK1*. Ces amorces permettent d'insérer les sites de restriction *Sfi* I et *Sac* II aux extrémités de la séquence de *NTRK1* mais aussi d'amplifier la séquence de *NTRK1* sans la séquence du peptide signal. L'amplicon (2400 pb) est ensuite purifié grâce au kit Wizard (Promega) puis inséré dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega). Le vecteur est alors amplifié dans des bactéries compétentes JM109 (Promega). Après criblage des colonies, la purification des plasmides est effectuée grâce au kit Qiaprep Spin mini/midiprep (Qiagen) et ceux-ci sont vérifiés par digestion enzymatique. L'insert *NTRK1* est ensuite récupéré par digestion tandis

MATÉRIEL ET MÉTHODES

que le plasmide pdisplay est linéarisé également par digestion, permettant l'insertion de l'insert *NTRK1* dans le vecteur pdisplay par ligation. Le plasmide ainsi obtenu est alors amplifié selon le même protocole précédemment décrit puis vérifié par digestion enzymatique et séquençage (GATC Biotech).

Obtention des plasmides pcDNA3.1/Hygro(-) CD44 : La création des plasmides CD44 a été effectuée grâce au kit GeneArt Seamless Cloning (Invitrogen). Cette technique permet l'insertion de fragments de séquences (jusqu'à 4) au sein d'un vecteur plasmidique. Les fragments de séquences à insérer sont obtenus par amplification PCR grâce à des amorces spécifiques (Tableau 6). Pour les fragments de *CD44*, ceux-ci ont été amplifiés à partir d'un plasmide contenant la séquence de *CD44* (BC004372). Les fragments créés doivent présenter une homologie de séquence entre eux de 18 nucléotides à leurs extrémités. Dans le cas du plasmide CD44v3Δ1, 3 fragments ont été nécessaires. En effet, le premier fragment correspond au plasmide pcDNA3.1/Hygro(-) linéarisé avec les enzymes *BmtI* et *EcoRV*. Le deuxième fragment correspond à la partie N-terminale de la séquence CD44v3Δ1 obtenue par amplification du plasmide BC004372 grâce aux amorces CD44_Nterm_Forward et CD44_Nterm_Reverse. Le troisième fragment a été obtenu par amplification de la séquence de CD44v3 ne contenant pas la zone 1 mais le reste de la séquence de CD44v3, y compris la région C-terminale, grâce aux amorces CD44_D1_Forward et CD44_Cterm_Reverse. Une fois les fragments disponibles, ceux-ci sont intégrés au plasmide pcDNA3.1/Hygro(-) par recombinaison homologue. Le plasmide est ensuite amplifié dans des bactéries *E.coli* One Shot® TOP10. Sur l'ensemble des colonies obtenues, 5 sont sélectionnées pour isolation des plasmides et analyse par digestion enzymatique. La purification des plasmides est effectuée grâce au kit Qiaprep Spin mini/midiprep (Qiagen).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Amorces	Séquences
TrkA_HA1	5' AGG-CCC-AGC-CGG-CCG-CAC-CCT-GCC-CCG-AT 3'
TrkA_HA2	5' TCC-GCG-GCT-AGC-CCC-AGG-ACA-TCC-A 3'
CD44_Nterm_Forward	5' CAG-ACC-CAA-GCT-GGC-TAG-GGA-CAC-CAT-GGA-CAA-GTT-TTG-G 3'
CD44_Nterm_Reverse	5' GGT-AGC-AGG-GAT-TCT-GTC-TGT-GCT 3'
CD44_Cterm_Forward	5' GGA-GAC-CAA-GAC-ACA-TTC-CAC 3'
CD44_Cterm_Reverse	5' TGG-TGG-AAT-TCT-GCA-GAT-TTA-CAC-CCC-AAT-CTT-CAT-GTC 3'
CD44s_Cterm_Forward	5' GAC-AGA-ATC-CCT-GCT-ACC-AGA-GAC-CAA-GAC-ACA-TTC-CAC 3'
CD44s_Cterm_Reverse	5' TGG-TGG-AAT-TCT-GCA-GAT-TTA-CAC-CCC-AAT-CTT-CAT-GTC 3'
CD44v3_Forward	5' GAC-AGA-ATC-CCT-GCT-ACC-AGT-ACG-TCT-TCA-AAT-ACC 3'
CD44v3_Reverse	5' GGT-GCT-GGA-GAT-AAA-ATC-TTC 3'
CD44v3_Cterm_Forward	5' GAT-TTT-ATC-TCC-AGC-ACC-AGA-GAC-CAA-GAC-ACA-TTC-CAC 3'
CD44v6_Forward	5' GAT-TTT-ATC-TCC-AGC-ACC-ATC-CAG-GCA-ACT-CCT-AGT-AGT 3'
CD44v6_Reverse	5' GAA-TGT-GTC-TTG-GTC-TCC-AGC-TGT-CCC-TGT-TGT-CGA-ATG 3'
CD44_D1_Forward	5' GAC-AGA-ATC-CCT-GCT-ACC-TGG-GAG-CCA-AAT-GAA-GAA-AAT 3'
CD44_Z1_Reverse	5' GCC-TGC-TGA-GAT-GGT-ATT-TGA-AGA 3'
CD44_D2_Forward	5' AAT-ACC-ATC-TCA-GCA-GGC-AGA-GAC-AGA-CAC-CTC-AGT-TTT 3'
CD44_Z2_Reverse	5' TTC-ATC-TTC-ATT-TTC-TTC-ATT-TGG 3'
CD44_D3_Forward	5' GAA-GAA-AAT-GAA-GAT-GAA-ATT-GAT-GAT-GAT-GAA-GAT-TTT 3'
CD44_Z3_Reverse	5' GCC-TGA-TCC-AGA-AAA-ACT-GAG-GTG 3'
CD44_D4_Forward	5' AGT-TTT-TCT-GGA-TCA-GGC-AGA-GAC-CAA-GAC-ACA-TTC-CAC 3'

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées pour la création des plasmides

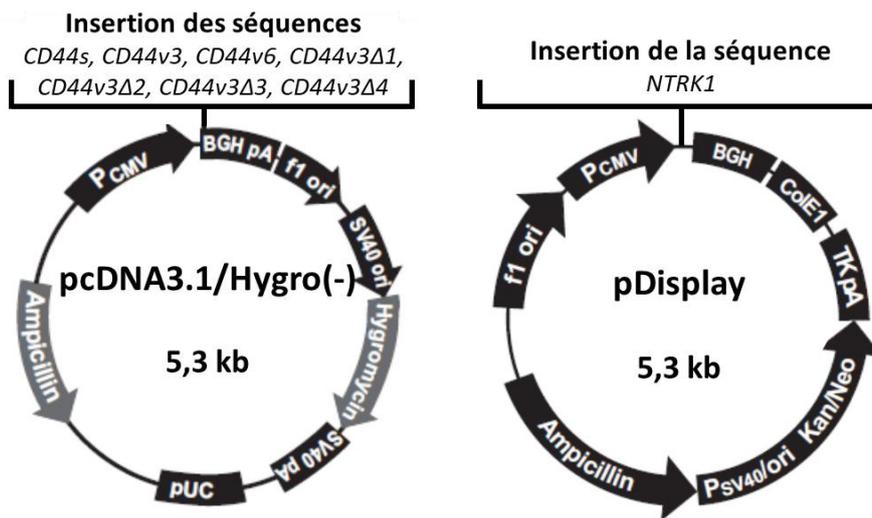


Figure 30 : Carte des vecteurs utilisés pour la création des plasmides dans cette étude

IV. Analyse de l'expression des transcrits

A. Extraction et purification de l'ADN

Les cellules sont lysées avec 600 μ L de tampon de lyse contenant 90 % de tampon RLT (kit RNeasy mini kit, QIAGEN) et 10 % de β -mercaptoéthanol (v/v) (Sigma) pendant 10 minutes, sur glace. Les lysats cellulaires sont ensuite passés à la seringue 21G plusieurs fois avant d'être repris dans 600 μ L d'éthanol (70 % (v/v), H₂O). L'extraction d'ARN est ensuite effectuée selon les recommandations du fabricant (kit RNeasy mini kit, QIAGEN). Un traitement à la DNase (15 min, RT) permet l'élimination de l'ADN génomique. Une fois les ARNs obtenus, ceux-ci sont dosés par dosage spectrophotométrique (Thermo Scientific Multiskan GO) et leurs puretés vérifiées par le ratio 260/280. Les échantillons sont ensuite stockés à -20°C.

B. Rétro-transcription

Les ARNs obtenus sont utilisés pour obtenir l'ADNc présents dans les cellules. Pour cela, une rétro-transcription est effectuée selon le protocole suivant : 1 μ g d'ARN est incubé avec un mélange de Random primers (1mM), de dNTPs (1mM) et d'eau RNase free (5 min, 65°C). Après une incubation de 5 minutes à 65 °C afin d'hybrider les amorces aléatoires, le mélange est associé à une solution de synthèse de l'ADNc contenant notamment l'enzyme Superscript III (Invitrogen). L'ensemble est alors mis à incuber selon un cycle de 10 min à 25°C, 50 min à 50°C, 5 min à 85°C et refroidissement à -20°C. Pour chaque condition, un contrôle négatif sans enzyme est effectué (RT-) et testé par migration sur gel d'agarose 2%.

C. Polymerase-Chain Reaction (PCR)

Les ADNc sont amplifiés par PCR grâce à l'utilisation de la polymérase GoTaq® Flexi Polymerase (Promega). L'établissement des profils des isoformes de *CD44* est effectué grâce à l'utilisation d'une amorce spécifique de la région standard du côté 5' du gène humain *CD44*, de 9 amorces spécifiques de chaque exon variable et d'une amorce spécifique de la région standard du côté 3' du gène (Tableau 7). Après une dénaturation initiale à 95°C (2 min), les cycles d'amplification (35 cycles) ont été effectués de la façon suivante : dénaturation à 95°C (30 sec), Hybridation à 58°C (30 sec) et extension à 72°C (30 sec) pour CD44v2, CD44v3, CD44v4, CD44v5, CD44v6 et CD44v7 ou à 1 min pour CD44v8, CD44v9, CD44v10 et panCD44, terminés par une extension finale à 72°C (10 min). Les produits de la réaction obtenus sont

MATÉRIEL ET MÉTHODES

chargés dans un gel d'agarose à 2 % (90 V, 1 h) et les bandes sont visualisées par un marquage au bromure d'éthidium sur une plaque UV ($\lambda = 300$ nm). L'identification des isoformes de *CD44* est effectuée par identification des bandes selon la taille attendue (Tableau 7) et par séquençage des bandes (voir la partie correspondante). Il est à noter que les tailles indiquées dans le tableau 7 représentent la taille des bandes de l'isoforme le plus court, c'est-à-dire présentant un seul variant ou, dans le cas de panCD44, aucun variant.

Amorces	Séquences	Taille attendue de la bande (pb)
CD44s (sens)	AGA-CAT-CAC-CCC-AGC-AAC	---
CD44s (anti-sens)	AGA-CAC-ATT-CCA-CCC-CAG-TGG-G	461 pb
CD44v2 (anti-sens)	CTG-AGA-CAG-CAA-CCA-AGA-GGC-AA	220 pb
CD44v3 (anti-sens)	TCT-CAG-CAG-GCT-GGG-AGC-CAA	209 pb
CD44v4 (anti-sens)	CCA-CAC-CAC-GGG-CTT-TTG-ACC-A	198 pb
CD44v5 (anti-sens)	AAC-TGG-AAC-CCA-GAA-GCA-CAC-C	227 pb
CD44v6 (anti-sens)	GCT-ACC-CAG-AAG-GAA-CAG-TGG	226 pb
CD44v7 (anti-sens)	AGC-TCA-TAC-CAG-CCA-TCC-AAT-GC	200 pb
CD44v8 (anti-sens)	TTG-GAC-AGG-ACA-GGA-CCT-CTT-TCA	262 pb
CD44v9 (anti-sens)	GCA-GAG-TAA-TTC-TCA-GAG-CTT-CTC	195 pb
CD44v10 (anti-sens)	TCA-CAG-GTG-GAA-GAA-GAG-ACC-A	205 pb

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des amorces PCR utilisées pour la détermination des isoformes de CD44

D. Séquençage des bandes PCR

Les bandes résultantes de la migration des produits PCR comme décrits précédemment sont excisées du gel d'agarose puis les produits PCR sont purifiés grâce au kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Les produits PCR purifiés sont alors envoyés à GATC Biotech AG (Allemagne) pour un séquençage Sanger. Des amorces spécifiques de *CD44* ont été utilisées pour l'initiation du séquençage.

E. PCR quantitative

Les ADNc obtenus après rétro-transcription sont dilués au 1 : 8^{ème} dans de l'eau MQ. La PCR quantitative est effectuée grâce au kit Quantification SyBR Green Master Mix (Qiagen) et au thermocycleur CFX96 Real time System (C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad). Les amorces utilisées ont été commandées chez la compagnie Eurogentech (Tableau 8). Chaque

MATÉRIEL ET MÉTHODES

condition est effectuée en triplicat et la moyenne des Ct est prise en compte pour l'analyse des données. Les données sont analysées sur le logiciel CFX Manager (Bio-Rad). Les Δ Ct des gènes étudiés sont normalisés grâce au gène de référence *PUM1* (*Pumilio RNA Binding Family Member 1*).

Gène cible	Séquences	
<i>NTRK1</i>	sens	GAA-CCC-ACA-ATA-CTT-CAG-TG
	anti-sens	TCC-TTC-AGT-GCC-TTG-ACA-G
<i>EphA2</i>	sens	TGG-ACT-ACG-GCA-CCA-ACT-TC
	anti-sens	TAG-AAG-CCT-TTG-CGG-GTG-AG
<i>SORT1</i>	sens	CCG-TCC-TAT-CAA-TGT-GAT-TAA-G
	anti-sens	CCA-TAT-GGT-ATA-GTC-CTT-CTC
<i>CD44v3</i>	sens	CTT-CAA-ATA-CCA-TCT-CAG-CAG-GC
	anti-sens	CTG-AGG-TGT-CTG-TCT-CTT-TCA-TC
<i>CD44v6</i>	sens	AGC-TAC-CCA-GAA-GGA-ACA-GTG
	anti-sens	GTC-TTC-TTT-GGG-TGT-TTG-GCG
<i>panCD44</i>	sens	CCC-CAG-CAA-CCC-TAC-TGA-TG
	anti-sens	AAC-CTC-CTG-AAG-TGC-TGC-TC
<i>PUM1</i>	sens	GAT-TAT-TCA-GGC-ACG-CAG-GT
	anti-sens	AGC-AGC-GCT-GAT-GAT-GTA-TG
<i>EFNA1</i>	sens	AGG-CCC-ATG-ACA-ATC-CAC-AG
	anti-sens	CAG-AAG-TGG-AAG-GAG-CAG-CA
<i>NGFR</i>	sens	CCG-TTG-GAT-TAC-ACG-GTC-CA
	anti-sens	GTT-CTG-CTT-GCA-GCT-GTT-CC

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées en qPCR

V. Analyse de l'expression des protéines

A. Extraction et dosage protéique

Les cellules sont lysées sur glace avec un tampon de lyse protéique (40 mM HEPES pH 7,5, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 10% glycérol, 10 mM sodium pyrophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1,5 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail) (Sigma-Aldrich, France). Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé (12000g, 10 min, 4°C) puis le surnageant est récupéré et stocké à -80 °C jusqu'à analyse.

La quantification des protéines est effectuée par la méthode BCA (*Bicinchonic Acid*) (Sigma-Aldrich). Les extraits protéiques sont alors dilués à 2 μ g/ μ L dans le tampon de charge Laemmli 1X (63 mM Tris HCl, 10 % glycérol, 2 % SDS, 5 % de β -mercaptoéthanol, 0,025 % de Bleu de Bromophénol, pH 6,8), (7 min ; 95°C ; sous agitation).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

B. Electrophorèse en gel de polyacrylamide et Western Blot

Les protéines sont déposées (20 à 40 µg/ puits) et sont séparées sur gel de polyacrylamide (7,5 %) en présence de SDS. Après migration (180 V constant, 45 min, TA), les protéines sont transférées sur membrane de PVDF (0,45 µm, Whatman) pour panCD44, ou sur membrane de nitrocellulose (0,45 µm, Whatman) pour les autres protéines. Les membranes sont préalablement réhydratées dans une solution tampon de méthanol pur (PVDF) ou dans la solution de transfert 1X (Tris Base (25 mmol/L), Glycine (192 mmol/L), 20 % méthanol pur, H₂O) (nitrocellulose). Après transfert (105 V, 45 min), les membranes sont saturées (1h, TA). Le tampon de saturation utilisé pour chaque anticorps primaire est renseigné dans le Tableau 9. Les anticorps primaires dilués dans les solutions de saturation correspondantes sont incubés avec les membranes (16 h, 4°C, sous agitation). Après lavages (6 x 5 min, TA), les membranes sont incubées avec un anticorps secondaire dilué dans le TBS-T (anti-IgG de lapin, Jackson ImmunoResearch, 1 : 5 000^{ème} ; anti-IgG de souris, Jackson ImmunoResearch, 1 : 10 000^{ème}, anti-IgG de chèvre, Jackson ImmunoResearch, 1 : 5 000^{ème}) (90 min, TA, sous agitation). Après lavages (TBS-T, 6 x 5 min, TA), la révélation est effectuée par chimiluminescence (West Pico, Thermo Scientific) et le signal détecté à l'aide d'un appareil de révélation (LAS-4000, Fujifilm). Le signal des bandes est quantifié grâce au logiciel Multi-Gauge (Fujifilm) par rapport au signal de la bande contrôle (Actine).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Anticorps	Référence	Tampon de saturation	Dilution
CD44v3	R&D systems BBA11	TBST + lait 5%	1 : 2000 ^{ème}
CD44v6	R&D systems BBA13	TBST + lait 5%	1 : 2000 ^{ème}
EphA2 (IP)	Santa Cruz SC-924	---	0,1 µg/µL
EphA2 (WB)	Millipore 05-480	TBST + BSA 5%	1 : 2000 ^{ème}
EphrinA1	Santa Cruz SC-911	TBST + lait 5%	1 : 500 ^{ème}
HA (IP)	Sigma 12CA5	---	0,1 µg/µL
HA (WB)	Biolegend HA.11	TBST + BSA 5%	1 : 3000 ^{ème}
p75	Alomone ANT-007	TBST + BSA 5%	1 : 1000 ^{ème}
pan-Akt	Cell signaling #4691	TBST + lait 5%	1 : 1000 ^{ème}
panCD44	Cell signaling 156-3C11	TBST + lait 5%	1 : 5000 ^{ème}
Phospho-Akt (S473)	Cell signaling #9271	TBST + lait 5%	1 : 1000 ^{ème}
Phospho-Src (Y416)	Cell signaling #2101	TBST + lait 5%	1 : 1000 ^{ème}
Phospho-TrkA (Y674/675)	Cell signaling #4621	TBST + lait 5%	1 : 1000 ^{ème}
Sortiline (IP)	R&D systems BAF2934	---	0,1 µg/µL
Sortiline (WB)	BD Biosciences 612101	TBST + caséïne 0,2 %	1 : 500 ^{ème}
Src	Cell signaling #2108	TBST + lait 5%	1 : 1000 ^{ème}
TrkA	Santa Cruz SC-14024	TBST + lait 5%	1 : 500 ^{ème}
β-Actine	Sigma A2066	TBST + BSA 5%	1 : 10000 ^{ème}

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés en Western Blot ou Immunoprécipitation

C. Extraction des protéines en gel de polyacrylamide en vue d'une analyse par spectrométrie de masse

Les gels de polyacrylamide dans lesquels ont migré les échantillons immunoprécipités sont marqués au bleu de Coomassie (Invitrogen) afin de visualiser les protéines et de découper les bandes. Les bandes obtenues sont alors lavées avec des bains successifs d'eau (20 min, TA), d'eau et d'acétonitrile (50/50) (20 min, TA) et d'acétonitrile 100% (20 min, TA). Les protéines sont ensuite réduites par une incubation avec une solution contenant 10 mM de DTT et 0,1 M de NH_4HCO_3 (1h, 56°C) puis alkylées par une solution d'iodoacétamide 55 mM et de NH_4HCO_3 0,1 M (45 min, 20°C, obscurité). Les bandes sont ensuite lavées puis séchées par évaporation sous vide à l'aide d'un système SpeedVac (Beckman Coulter). Enfin, les protéines sont récupérées par une incubation sur la nuit dans une solution de trypsine (12,5 µg/mL) (37°C).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

D. Analyse de protéines par spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre de masse en tandem quadripôle-temps de vol (Q-Star, Applied Biosystems) équipé d'une source d'ionisation par électrospray couplée à un système de séparation chromatographique liquide à haute pression (HPLC, *High Pressure Liquid Chromatography*) (LC Packings Dionex). Les données obtenues par MS/MS ont été obtenues en fixant un seuil de tolérance de masse de 50 mmu (*millimass unit*) et l'énergie de collision a été automatiquement déterminée par l'appareil. L'analyse des spectres a été effectuée à l'aide des logiciels Analyst QS (Sciex) et Mascot par comparaison avec la banque de données 50.8 (SwissProt).

E. Analyse des niveaux de CD44v3 et CD44v6 par cytométrie en flux

Après la stimulation au NGF, les cellules ont été rincées deux fois au PBS 1X (4°C) puis incubées avec les anticorps isotypiques (R&D systems) et les anticorps dirigés contre CD44v3 et CD44v6 (1 µg dans PBS 1X + 1 % SVF, 30 min, 4°C). Les anticorps secondaires couplés à l'APC (*Allophycocyanin*) (BD Biosciences) sont ensuite incubés avec les cellules (1 µg dans PBS 1X + 1 % SVF, 30 min, 4°C). Les échantillons sont passés dans un cytomètre en flux (CyAn™ ADP Analyzer, Beckman Coulter) puis les niveaux membranaires de CD44v3 et CD44v6 sont analysés grâce au logiciel Kaluza (Beckmann Coulter).

F. Immunocytochimie

Les cellules sontensemencées (10 000 cellules/puits) sur des lames compartimentées Nunc™ Lab-tek™ 8 puits (Thermo Scientific), préalablement traitées à l'éthanol 98 % + HCl 2 % (v/v) (1 h, TA) suivi de deux rinçages au PBS 1X. Les cellules ainsiensemencées sont alors mises à incuber à 37°C pendant 24 h dans du milieu + 10 % SVF.

Les cellules sont ensuite fixées à l'aide d'une solution de Paraformaldéhyde (4 % dans PBS, 30 min, TA). Les éventuels aldéhydes n'ayant pas réagi et pouvant causer une fluorescence résiduelle dans la suite de l'expérience sont bloqués par une solution de Glycine (100 mM, 3 x 5 min, TA). Avant l'incubation des anticorps primaires (Tableau 10) (16 h, 4°C, sous agitation), les cellules sont saturées avec le tampon de saturation correspondant (1 h, 20°C, sous agitation). Puis, l'incubation avec les anticorps primaires est effectuée (16 h, 4°C, sous agitation). Après lavage, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1 : 4 000^{ème}) dilués dans du PBS (90 min, 20°C, sous agitation). Une

MATÉRIEL ET MÉTHODES

contre coloration est ensuite effectuée au Hoechst 33258 (1 mM, 30 min, sous agitation). Les lames sont alors montées avec le liquide de montage fluoro-mount (Dako). Les marquages sont observés au microscope à fluorescence (Eclipse TiU, Nikon, objectif 100X). Les images capturées sont ensuite traitées avec le logiciel Image J.

Anticorps	Référence	Tampon de saturation	Dilution
panCD44	Cell signaling 156-3C11	PBS + SVF 5%	1 : 200 ^{ème}
CD44v3	R&D systems BBA11	PBS + SVF 5%	1 : 200 ^{ème}
CD44v6	R&D systems BBA13	PBS + SVF 5%	1 : 200 ^{ème}
EphA2	R&D systems MAB3035	PBS + BSA 4%	1 : 50 ^{ème}
EphrinA1	Santa Cruz SC-911	TBST + lait 5%	1 : 500 ^{ème}
HA	Covance MMS-101R	PBS + BSA 4%	1 : 50 ^{ème}
p75	Alomone ANT-007	PBS + BSA 4%	1 : 25 ^{ème}
Sortiline	R&D systems AF3154	PBS + BSA 4%	1 : 50 ^{ème}
TrkA	Alomone ANT-018	PBS + SVF 5%	1 : 100 ^{ème}

Tableau 10 : Récapitulatif des anticorps et conditions utilisés en Immunocytochimie et PLA

G. Immunohistochimie

Les échantillons (xénogreffes ou tumeurs de patients) ont été préalablement inclus en paraffine puis coupés en fine lamelles grâce à un microtome. Les coupes sont ensuite déparaffinées pour permettre le marquage immunohistochimique. Le déparaffinage est effectué par bains successifs (xylène 3x5 min ; xylène/éthanol (1 : 1) 1 x 3 min ; éthanol 100 % 2 x 3 min ; éthanol 95 % 2 x 3 min ; éthanol 70 % 2 x 3 min ; eau distillée 1 x 5 min). Les coupes sont ensuite incubées avec une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ ; Sigma-Aldrich) pendant 10 min afin de bloquer d'éventuelles peroxydases endogènes. Après lavages au TBS 1X, les coupes sont saturées avec une solution de TBS + 20 % SVF (1 h, TA). Les anticorps primaires, dilués dans le tampon de saturation, sont ensuite incubés sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les anticorps secondaires couplés à la HRP sont incubés pendant 1 h à température ambiante. Le signal HRP est révélé par une incubation avec la solution du kit Sigmafast™ (Sigma-Aldrich). Une contre coloration à l'hématoxyline de Mayer (Sigma-Aldrich) pendant 30 sec permet une visualisation correcte des tissus. Les coupes ainsi marquées sont réhydratées par des bains successifs d'éthanol et de xylène tels que décrits lors de la réhydratation, puis le

MATÉRIEL ET MÉTHODES

montage est effectué avec le liquide de montage Diamount (Diapath). Le signal est ensuite quantifié par microscopie (Eclipse TiU, Nikon, objectif 100X).

VI. Mise en évidence des interactions protéiques

A. Immunoprécipitation

Un “pre-clearing” des lysats cellulaires (1 mg par condition) est effectué en les incubant avec des billes d’agarose couplées aux protéines G et les anticorps isotypiques correspondant aux anticorps primaires utilisés pour l’immunoprécipitation (1 h, 4°C, agitation sur roue 10 rpm). Le lysat cellulaire est ensuite récupéré par centrifugation (5 min, 4°C, 6000 g) et incubé avec les anticorps primaires (Tableau 9) (2 h, 4°C, 10 rpm). Les billes sont ajoutées au mélange pour une incubation sur la nuit (4°C, 10 rpm). Le lendemain, les protéines immunoprécipitées avec les billes sont éluées avec un tampon Laemmli 2X, après que chaque condition ait subi plusieurs lavages consécutifs au PBS 1X. Les billes d’agarose ont été fournies par Millipore et les anticorps isotypiques par R&D systems. Les protéines immunoprécipitées sont mises en évidence par western blot comme décrit dans la section correspondante (40 µg/ puits).

B. Proximity Ligation Assay (PLA)

PLA en immunocytochimie : Le PLA présente quelques étapes particulières qui suivent les premières étapes identiques au protocole d’immunocytochimie (Figure 31). Après saturation des échantillons, les anticorps primaires dilués dans le tampon de saturation sont mis en incubation pendant la nuit (4°C, sous agitation) (Tableau 10). A cette étape, il est important de sélectionner deux anticorps primaires issus de deux espèces différentes pour que la détection des complexes de protéines soit correcte. Un lavage est ensuite effectué avec un tampon spécifique (Tampon A : 0,01 M Tris, 0,15 M NaCl et 0,05 % de Tween 20 ; 2 x 5 min, TA) avant d’incuber les sondes PLA *Plus* et *Minus* correspondantes aux espèces des anticorps primaires utilisés (1 h, 37°C). Ces sondes sont des anticorps secondaires couplés à des sondes oligonucléotidiques qui, si elles sont assez proches (environ 40 nm), vont pouvoir former un cercle d’ADN fermé lors de l’étape de ligation qui suit (30 min, 37°C). Suite à la ligation des sondes, l’amplification de ce cercle d’ADN est effectuée grâce à une polymérase et à une solution d’oligonucléotides fluorescents (1 h 40 min, 37°C). Les noyaux sont ensuite contre-colorés au Hoechst 33258 (1 mM). La lame est montée grâce au liquide de montage présent

MATÉRIEL ET MÉTHODES

dans le kit. Les résultats sont analysés au microscope à fluorescence (Eclipse TiU, Nikon, objectif 100X). La quantification du signal PLA est effectuée grâce au logiciel Image J (voir section Quantification du signal PLA).

PLA en immunohistochimie : Les premières étapes sont identiques au protocole d'immunohistochimie. Après l'incubation des anticorps primaires qui doivent également provenir de deux espèces différentes, les sondes PLA *Plus* et *Minus* sont incubées (1h, 37°C). Une étape de ligation (30 min, 37°C) et de polymérisation (2 h, 37°C) similaires à celles mises en place dans le PLA en immunocytochimie sont également effectuées. Cependant, contrairement à la solution de polymérisation utilisée dans le PLA en immunocytochimie, celle utilisée dans le protocole d'immunohistochimie ne contient pas les oligonucléotides marqués. Une étape supplémentaire est donc requise, après la polymérisation, pour ajouter les oligonucléotides couplés à l'enzyme HRP qui permettront la détection du signal PLA (1 h, TA). La mise en contact du substrat de la HRP (fourni dans le kit) permet la révélation du signal (15 min, TA). Les étapes de contre-coloration, de déshydratation et de montage des coupes (liquide de montage Duolink Brightfield Medium) sont identiques au protocole précédemment détaillé. L'analyse du signal est effectuée en double-aveugle (pour la quantification du signal, se référer à la partie Quantification du signal PLA).

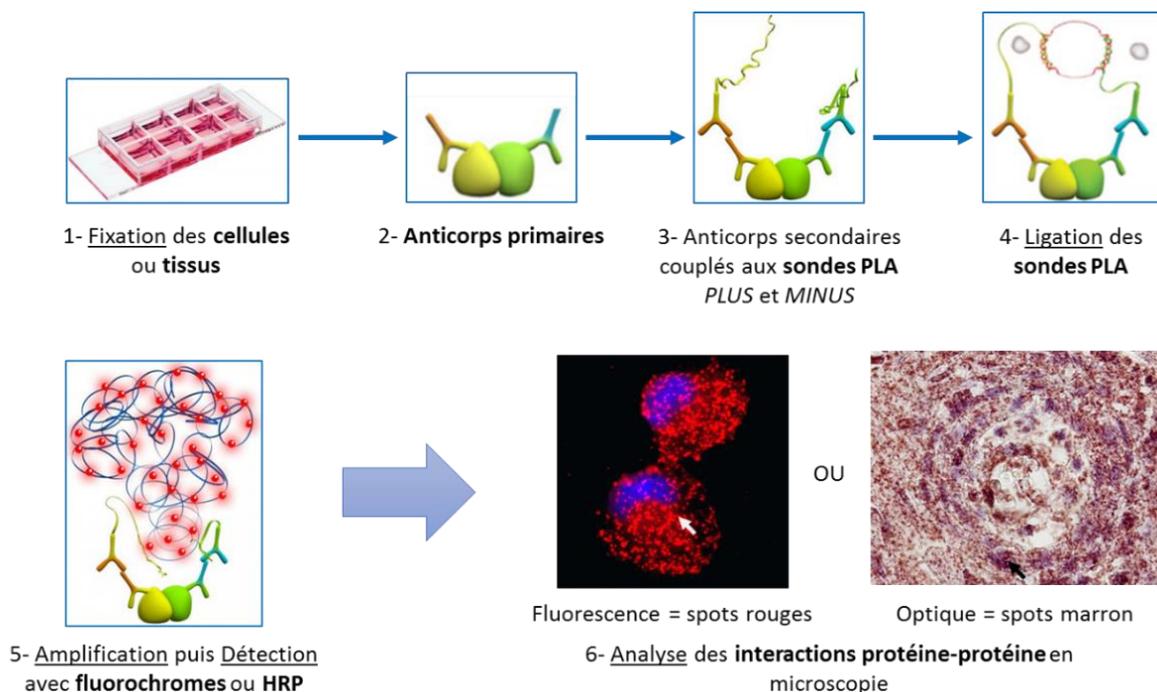


Figure 31 : Etapes du Proximity Ligation Assay

C. Quantification du signal PLA

Immunocytochimie : Dans une volonté d'être représentatif du signal hétérogène présent dans une population cellulaire d'une même condition, la quantification du signal PLA est effectuée en capturant 30 champs par condition et par expérience (Eclipse TiU, Nikon, objectif 100X). Un traitement préalable au comptage des points fluorescents est effectué sur chaque image. Tout d'abord, l'autofluorescence éventuelle due au noyau est atténuée (Figure 32.B). Puis, la luminosité et le contraste de l'image (type : 8 bit) est ajustée (Figure 32.C) afin de fixer un seuil de détection des points satisfaisant (Figure 32.D). Le comptage du nombre de points PLA présents dans le champ est permis par l'outil d'analyse des particules préalablement réglé pour ne détecter que des points d'une taille satisfaisante (Figure 32.E). Grâce à la création d'une macro, ces réglages sont les mêmes pour l'ensemble des champs quantifiés dans une même expérience. Afin de simplifier l'analyse, le nombre de points par champs est ramené en nombre de points par cellule en divisant le nombre de points par le nombre de noyaux (détectés par le Hoechst 33258) présents dans le champ. La quantification est ensuite analysée statistiquement sur le logiciel Prism (Graphpad) grâce à un test ANOVA à un facteur suivi d'un post-test Bonferroni.

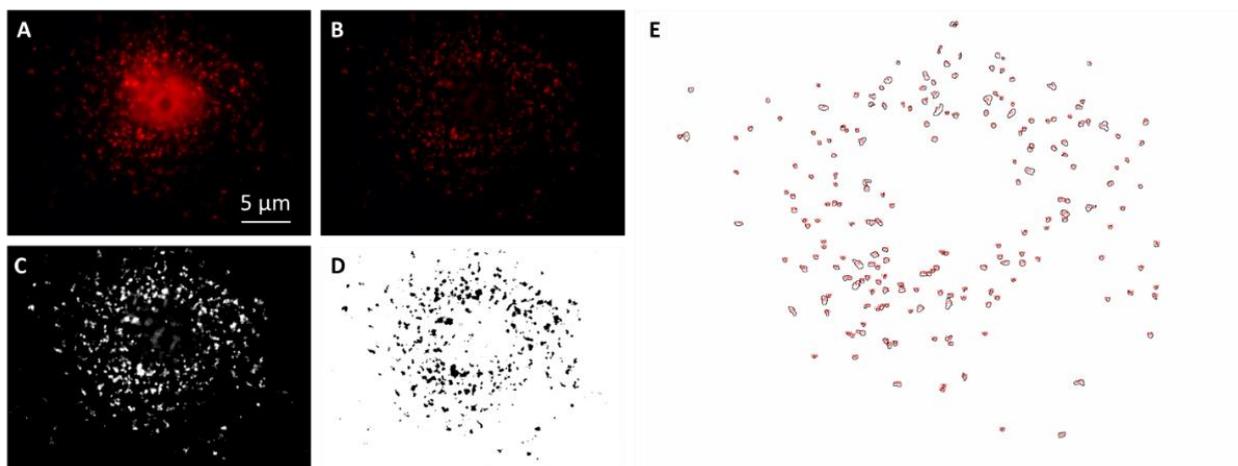


Figure 32 : Quantification du signal PLA en cellules

Immunohistochimie : Les échantillons marqués en PLA ont été gradés en plusieurs catégories : absence de marquage, marquage faible (< 2 points par cellule), marquage moyen (entre 2 et 5 points par cellule) et marquage fort (> 5 points par cellule) (Figure 33). Pour l'étude TrkA/CD44v3, les données ont été obtenues par l'utilisation d'une lame TMA HBre-Duc150-Sur-01 (US BioMax, Inc.) contenant 150 échantillons de tumeurs mammaires. Pour l'étude

MATÉRIEL ET MÉTHODES

TrkA/EphA2, une lame TMA CBA4 (Superbiochips Laboratories) contenant 39 échantillons a été analysée en plus de d'une lame HBre-Duc150. Les analyses ont été effectuées en double aveugle. Les courbes de survie ont été effectuées selon la méthode de Kaplan-Meier et comparées grâce au test log-rank.

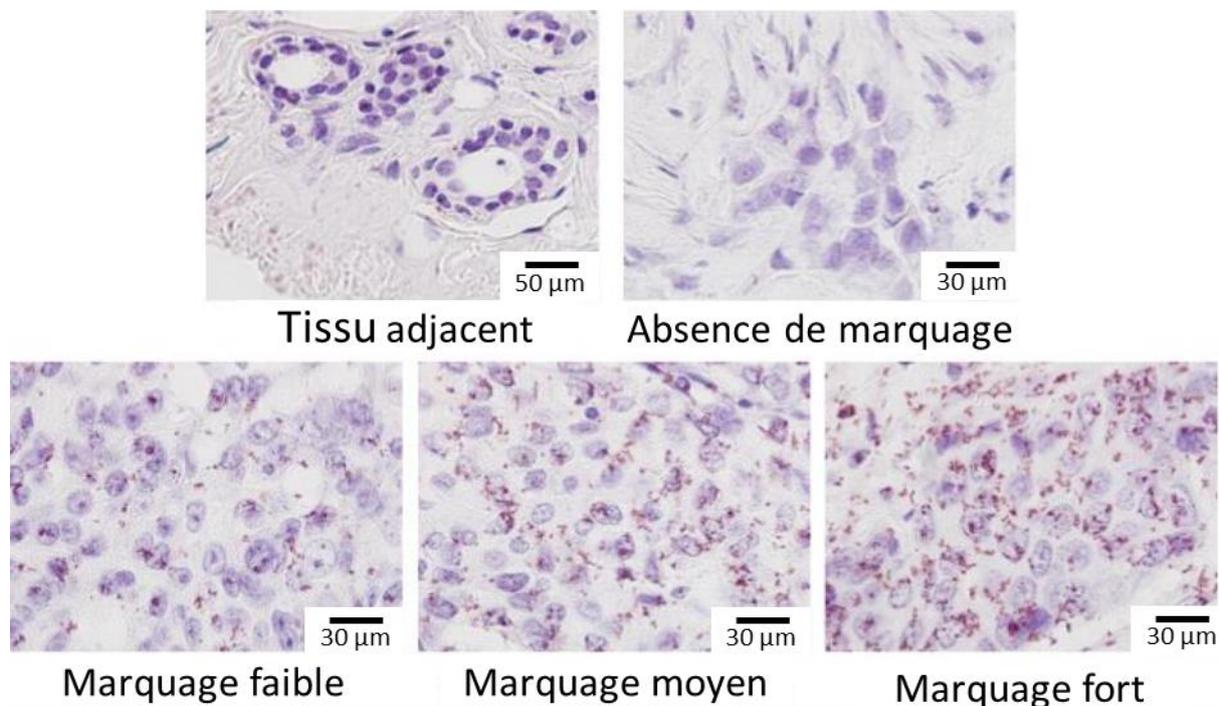


Figure 33 : Quantification du signal PLA sur coupes tumorales

D. Prévion des interactions par modélisation moléculaire

La possible interaction entre les domaines du variant 3 de CD44 et le domaine extracellulaire de TrkA a été prédite par modélisation moléculaire. Pour cela, la structure cristallographique de TrkA (*PDB : 1HE7*) a été utilisée et les structures des domaines du variant 3 de CD44 ont été modélisées par homologie de séquence. Les complexes, formés entre les domaines du variant 3 de CD44 et le domaine extracellulaire de TrkA, ont été simulés par docking protéine-protéine. Sur base de ce complexe, un réseau d'interaction a été créé et les résidus potentiellement impliqués dans la stabilisation de ces complexes ont été identifiés ([Brybaert et al., 2018](#)).

VII. Tests fonctionnels

A. Test de clonogénicité

Les cellules sont comptées etensemencées dans des plaques 6 puits (2 mL/ puits, une plaque par condition), dans du milieu de culture à 2 % de SVF. Le nombre de cellules par mL diffère selon le type cellulaire. Ainsi, les cellules MDA-MB-231 sontensemencées à 250 cellules par mL, les cellules MCF-7 et T-47D à 500 cellules par mL et les cellules SUM159-PT, BT-474 et HCC-1954 à 1000 cellules par mL. Les cellules sont alors incubées à 37°C. Si un traitement aux facteurs de croissance est requis, un premier traitement est effectué 4 h après l'ensemencement puis un deuxième 24 h après. L'incubation des cellules dure 10 jours en veillant à changer le milieu (2 % SVF) tous les 4 jours environ. L'arrêt de la croissance est effectué après rinçage des cellules au PBS 1X par un traitement au paraformaldéhyde 4 % (30 min, à l'obscurité). Les colonies sont ensuite mises en évidence par un marquage au crystal violet 0,1 % (30 min). Les colonies sont comptées à l'œil nu (taille de la colonie > 50 cellules). L'analyse est effectuée sur le logiciel Prism (GraphPad) avec un test non paramétrique Mann-Whitney.

B. Test de migration cellulaire

Les cellules sont comptées etensemencées dans des plaques 6 puits contenant un dispositif ibidi® 2 puits en silicone. Afin de pouvoir atteindre une forte confluence, les cellules sontensemencées à une forte densité à raison de 400 000 cellules par mL, à l'extérieur et à l'intérieur du dispositif. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 24 h. Le lendemain, les cellules sont sevrées pendant 4 h avant de retirer le dispositif Ibidi® à l'aide d'une pince stérile. La blessure centrale est prise en photo (Eclipse TiU, Nikon, objectif 40X) et un repère est mis en place afin de pouvoir localiser le même endroit par la suite. Avant de remettre les cellules en incubation, celles-ci sont éventuellement traitées aux facteurs de croissance dilués dans du milieu de sevrage. Les cellules sont remises en incubation à 37 °C et des photos sont prises à différents temps (2 h, 4 h, 8 h, 16 h ou 24 h). La taille de la blessure est quantifiée sur le logiciel Image J par mesure de la distance entre les deux fronts de migration des cellules.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

C. Test d'invasion en Transwell

Pour ce test, les inserts Falcon® pour plaque 12 puits ont été utilisés. Il s'agit de chambres d'invasion stériles à membrane PET (PolyETHylène) contenant des pores de 8,0 µm. Ces inserts sont tout d'abord coatés au collagène de type I (queue de rat, Millipore) à raison de 10 µg/cm². Pour cela, 200 µL de solution de coatage est déposé au centre de l'insert puis celui-ci est séché 1 h sous hotte, TA. L'excès de coatage est ensuite retiré par pipetage. Une fois les inserts Transwell coatés, les cellules sontensemencées dans la partie supérieure (100 000 cellules par insert) avec du milieu de sevrage. La partie inférieure ne contient que du milieu de sevrage. Les facteurs de croissance sont incubés dans la partie inférieure tandis que les inhibiteurs sont incubés dans la partie supérieure de l'insert. L'ensemble est mis en incubation à 37°C pendant 20 h. Suite à l'incubation, les cellules sont rincées au PBS 1X puis fixées au méthanol glacé (10 min, TA). Les inserts sont ensuite rincés puis la face supérieure est grattée avec un coton tige pendant 2 min afin d'enlever les cellules qui n'ont pas traverser la membrane. Un marquage au Hoechst 33258 (30 min, TA, à l'obscurité) est effectué puis les membranes sont découpées au scalpel avant d'être montées entre lame et lamelle avec le liquide de montage Glycergel (Dako). La quantification de l'invasion des cellules est effectuée suite à la prise de 7 photos par membrane avec un microscope à fluorescence (Eclipse TiU, Nikon, objectif 20X) et comptage du nombre de cellules par champ à l'aide du logiciel Image J (GraphPad). Le paramétrage du logiciel Image J permet le comptage des noyaux de taille convenable suivant la lignée étudiée et permet d'exclure les éventuels débris cellulaires. L'analyse statistique a été effectuée sur le logiciel Prism (GraphPad) avec un test ANOVA à un facteur suivi d'un post-test Bonferroni.

VIII. Expériences *in vivo*

A. Xénogreffes en souris SCID

Des souris âgées de six semaines ont été utilisées pour les expériences de xénogreffes. Pour cela, des cellules MDA-MB-231_HA-TrkA (3 x 10⁶ cellules) ont été injectées dans chaque souris en sous-cutanée. Les souris ont ensuite été séparées de façon aléatoire en 4 groupes (sept souris pour le contrôle, six pour les autres groupes) : un groupe contrôle, un groupe traité au CEP-701 (Calbiochem), un groupe traité par un siARN EphA2 et un groupe traité aux

MATÉRIEL ET MÉTHODES

deux composés. 14 jours après l'injection des cellules cancéreuses, les souris ont subi trois traitements avec un intervalle de 3 jours entre chaque traitement. Le CEP-701 a été resuspendu dans une solution tampon contenant 40 % de polyéthylène glycol 1000, 10 % de povidone C30 et 2 % d'alcool benzylique dans de l'eau distillée, puis injecté de façon intrapéritonéale dans les souris à une dose de 10 mg/kg. Le siARN EphA2 (7,5 µg par souris) a été injecté *via* l'utilisation du système *in vivo* jetPEI® selon les instructions du fournisseur (Polyplus Transfection) de façon sous-cutanée, à proximité de la masse tumorale. Le volume tumoral a été contrôlé tout au long de l'expérience par mesure de la longueur (L) et de la largeur (l) de la tumeur puis calculé grâce à la formule suivante : $\frac{\pi}{6} \times L \times l \times \frac{L+l}{2}$. 36 jours après le premier traitement, les souris ont été sacrifiées pour prélèvement des tumeurs. Les tumeurs sont ensuite incluses en paraffine pour effectuer les coupes de tumeurs xénogreffées.

B. Dissémination métastatique en souris SCID

Pour les analyses de dissémination métastatique dans les souris xénogreffées, un protocole différent a été mis en place. En effet, 14 jours après injection des cellules cancéreuses MDA-MB-231_HA-TrkA, les souris ont été soumises à 5 injections espacées de 3 jours entre chaque traitement. Quatre groupes ont été formés suivant le traitement : un groupe contrôle (si-scramble), un groupe si-TrkA, un groupe si-EphA2 et un groupe traité avec les deux siARNs simultanément à raison de 7,5 µg de siARN par souris. Le volume tumoral a été contrôlé de la même manière que précédemment. Afin de laisser les cellules cancéreuses mammaires métastaser, les souris sont sacrifiées seulement après que les tumeurs aient atteints 2 cm³. Après sacrifice de l'animal, les poumons, le foie et le cerveau ont été récupérés puis broyés dans des tubes Precellys CK14, en présence de TRIzol (Invitrogen). Les ARNs sont alors extraits selon les recommandations du fabricant (TRIzol, Invitrogen). Les ARNs ont été purifiés grâce au kit RNA Clean-Up Nucleospin (Macherey-Nagel). Les ARNs extraits sont alors soumis au protocole de RT-qPCR tel que décrit précédemment et la présence de métastases dans les organes est confirmée par les niveaux de β₂-microglobuline.

RÉSULTATS

I. Plasticité des réseaux de récepteurs membranaires dans la signalisation pro-tumorale du NGF dans les cancers du sein

A. Interaction TrkA/CD44 : état des lieux des récepteurs en présence

1. Profils des isoformes de CD44 des lignées cancéreuses mammaires

L'interaction entre TrkA et CD44 dans les cellules cancéreuses de sein avait déjà été démontrée comme une nouvelle signalisation importante dans les effets pro-tumoraux du NGF et dans la résistance aux thérapies par notre laboratoire ([Aubert et al., 2015](#)). Cette interaction avait alors été mise en évidence grâce à la caractérisation des protéines immuno-précipitées avec le récepteur TrkA tagué HA par spectrométrie de masse puis validée grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique de CD44. Cependant, CD44 peut être exprimé dans les cellules sous une forme standard mais également sous la forme de nombreuses isoformes contenant des variants insérés par épissage alternatif. L'anticorps utilisé dans l'étude de l'interaction TrkA/CD44 est spécifique d'une région standard de CD44, permettant le ciblage de toutes les isoformes de CD44 présentes dans les cellules, ce qui n'a pas permis de déterminer quelle isoforme de CD44 était en particulier engagée dans cette interaction.

Dans le but de déterminer quelle isoforme ou variant est spécifiquement impliqué dans cette interaction, j'ai tout d'abord établi un profil des isoformes de CD44 présentes dans les cellules cancéreuses de sein grâce à des expériences de RT-PCR. Pour cela, les ARNm des lignées cellulaires ont été extraits puis soumis à une rétro-transcription avant d'effectuer les expériences de PCR en utilisant des amorces spécifiques : une amorce sens située dans la partie 5' standard utilisée pour l'ensemble des amplifications ainsi que 10 amorces anti-sens chacune spécifique du variant que nous souhaitons amplifier (Figure 34.A).

RÉSULTATS

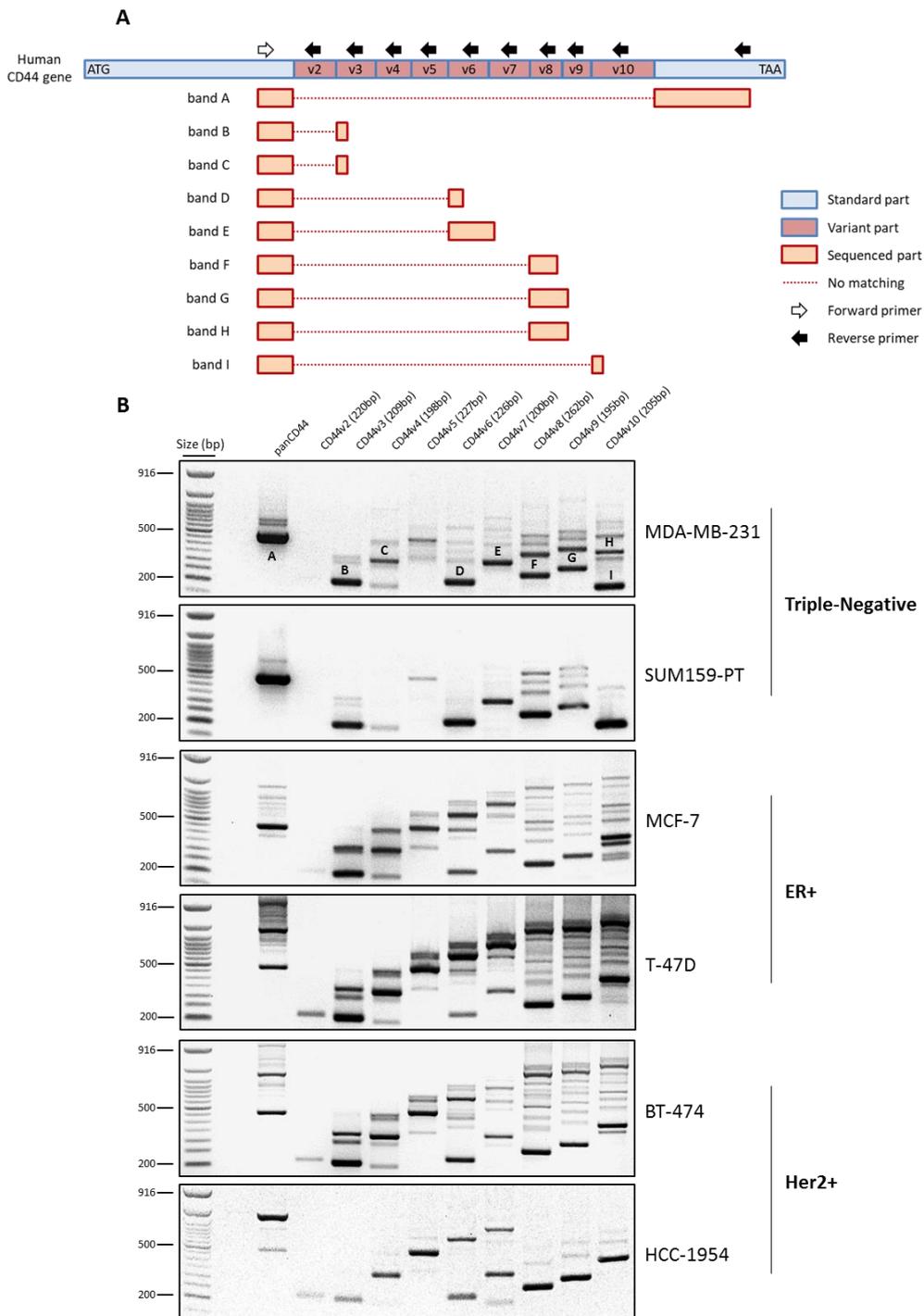


Figure 34 : Profils des isoformes de CD44 par PCR dans différentes lignées cancéreuses mammaires

(A) Les profils d'expression des isoformes de CD44 ont été obtenus par RT-PCR en utilisant une amorce sens (forward primer) spécifique de l'exon standard S5 et 10 amorces anti-sens (reverse primer) dont 9 spécifiques pour chaque exon variant (v2-v10) ainsi qu'1 spécifique de l'exon standard S6 comme représenté sur le schéma. Les bandes les plus intenses (A-I) ont été extraites, purifiées et séquencées par GATC Biotech. Les résultats des séquençages sont schématisés par des rectangles rouges. (B) Les produits PCR obtenus ont été chargés sur un gel d'agarose 2%. Photos des gels obtenus représentant les profils d'isoformes de CD44 pour deux lignées triple-négatives (MDA-MB-231 et SUM159-PT), deux lignées luminales (MCF-7 et T-47D) et deux lignées HER2+ (BT-474 et HCC-1954).

RÉSULTATS

Ainsi, on note la présence de nombreuses isoformes de CD44 au sein des cellules cancéreuses de sein (Figure 34.B). Les gels obtenus montrent la présence de bandes de petites tailles (environ 200 pb) ainsi que d'autres bandes de plus hautes tailles. Les bandes les plus intenses (correspondants aux amplicons majoritaires) ont été purifiées et séquencées par GATC Biotech (Allemagne) afin de déterminer la nature des amplicons obtenus (Figure 35). Les résultats de séquençage ont montré que les bandes de plus petites tailles correspondent aux variants seuls tandis que les bandes de tailles plus élevées correspondent bien au variant ciblé mais précédé par d'autres variants insérés dans la séquence. Ainsi, les résultats montrent des profils "en escalier" correspondant à la présence d'isoformes contenant plusieurs variants enchainés.

De façon intéressante, deux profils d'isoformes peuvent être distingués entre les lignées cancéreuses mammaires étudiées. D'une part, on observe un profil d'isoformes courtes caractérisé par la présence d'isoformes possédant moins de 5 exons variants enchainés, comme c'est le cas pour les lignées MDA-MB-231, SUM159-PT et HCC-1954. D'autre part, il existe un profil d'isoformes longues caractérisé par la présence d'isoformes contenant plus de 5 exons variants enchainés, particulièrement visible par un profil "en escalier" des bandes dans les lignées MCF-7, T-47D et BT-474. Ces profils d'isoformes de CD44 semblent être indépendants de la classification moléculaire des cancers du sein. Cependant, la présence d'isoformes longues semble être associée à un phénotype épithélial des cellules tandis que la présence d'isoformes courtes semble être associée au phénotype mésenchymateux. En effet, les cellules MDA-MB-231, SUM159-PT et HCC-1954 sont clairement définies comme possédant des caractéristiques mésenchymateuses, car elles sont notamment marquées par l'expression de marqueurs protéiques de ce statut tels que la vimentine ([Blick et al., 2008](#)).

RÉSULTATS

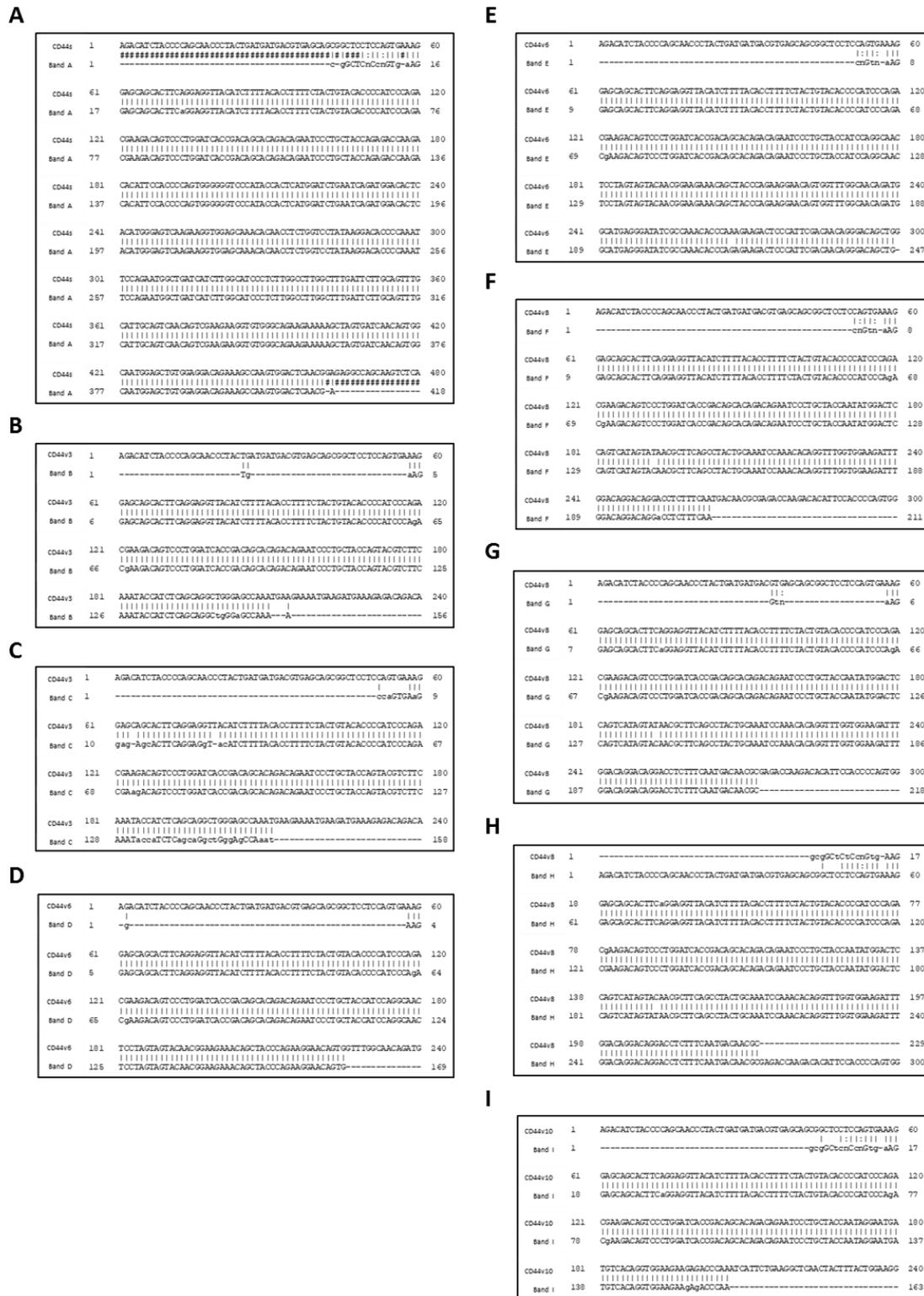


Figure 35 : Séquençage des produits PCR CD44 dans la lignée MDA-MB-231

Les bandes les plus intenses du gel PCR montré en Figure 1 ont été excisées et séquencées par la société GATC Biotech. Les résultats montrent les alignements des séquences des bandes indiquées avec les séquences des variants de CD44 correspondants.

RÉSULTATS

De nombreux variants sont donc exprimés au sein des cellules cancéreuses mammaires, notamment les variants 3 et 6, et différentes isoformes de CD44 en résultent. Deux profils d'isoformes se détachent, caractérisés par l'insertion consécutive de variants donnant naissance à des isoformes définies comme courtes ou longues. La longueur des isoformes de CD44 semble être liée au profil épithélio-mésenchymateux des lignées cancéreuses mammaires. Par extension, on peut émettre l'hypothèse que la présence d'isoformes courtes serait synonyme d'agressivité tumorale car ce profil semble caractéristique d'un phénotype mésenchymateux. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

2. Niveaux d'expression des récepteurs TrkA et CD44 dans les cellules cancéreuses mammaires

Afin de comprendre la mise en place de l'interaction TrkA/CD44 dans les lignées étudiées, les niveaux d'expression des récepteurs TrkA et CD44 que ce soit au niveau des ARNs messagers qu'au niveau protéique ont été mesurés.

Dans un premier temps, nous avons recherché les niveaux d'expression des ARNs messagers des gènes *NTRK1* et *CD44* par PCR quantitative (Figure 36). Concernant le gène *CD44* et considérant l'importance supposée des variants 3 et 6, la présence de l'ensemble de ces deux isoformes de CD44 a été confirmée grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques d'une région standard du gène *CD44* (Figure 36.A et B) ainsi que les ARNs messagers des isoformes présentant une insertion des variants 3 (Figure 36.C et D) et 6 (Figure 36.E et F) *via* l'utilisation d'amorces reconnaissant des séquences contenues uniquement dans ces régions. Il faut cependant souligner que ces amorces permettent d'identifier l'ensemble des ARNs messagers contenant soit le variant 3 soit le variant 6 et non pas les ARNs messagers ne contenant que ces variants, sans l'insertion d'autres variants. Les résultats des qPCR ont montré une expression différentielle des différents récepteurs entre les lignées. Le gène *NTRK1* est majoritairement transcrit dans la lignée MDA-MB-231 tandis que la lignée BT-474 présente la plus faible proportion d'ARNs messagers pour ce gène (Figure 36.G et H). Par ailleurs et comme déjà reporté précédemment (Descamps *et al.*, 2001a; Lagadec *et al.*, 2009), le gène *NTRK1* est faiblement transcrit dans l'ensemble des lignées cancéreuses mammaires car chaque lignée présente un Ct supérieur à 30 cycles.

RÉSULTATS

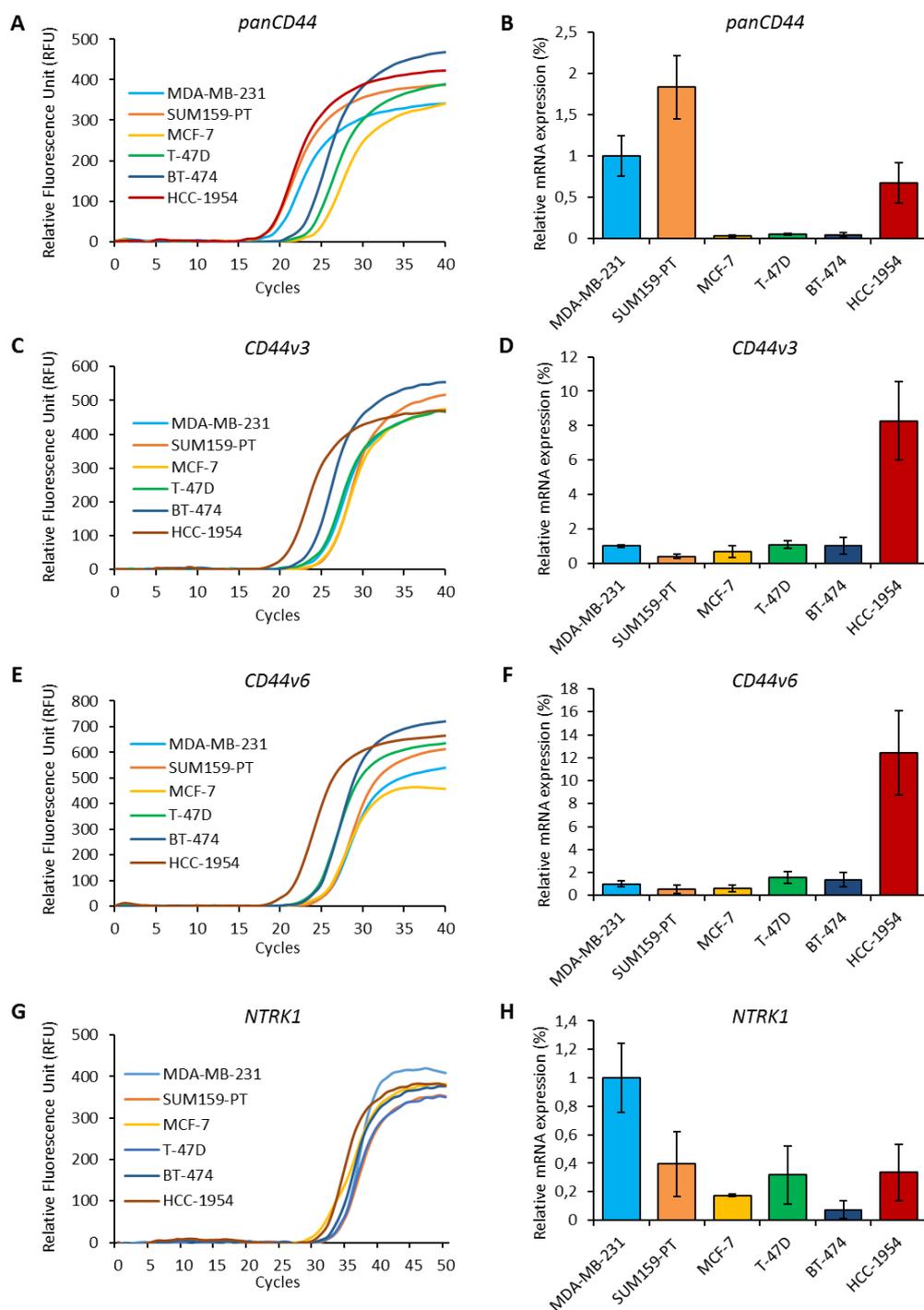


Figure 36 : Expression des transcrits (ARNm) des gènes CD44, CD44v3, CD44v6 et NTRK1 dans différentes lignées cancéreuses mammaires

A gauche : exemple de courbes d'amplification obtenues en PCR quantitative pour les gènes CD44 (A), CD44v3 (C), CD44v6 (E) et NTRK1 (G).

A droite : expressions relatives des transcrits des gènes CD44 (B), CD44v3 (D), CD44v6 (F) et NTRK1 (H). L'expression des ARNm dans la lignée MDA-MB-231 est considérée comme 1. Les résultats sont les moyennes de trois expériences indépendantes \pm SD.

RÉSULTATS

Concernant le gène *CD44*, les lignées présentant la plus forte proportion des transcrits pour l'ensemble des isoformes sont les lignées MDA-MB-231, SUM159-PT et HCC-1954, qui possèdent un profil mésenchymateux (Figure 36.B). Le gène *CD44* est fortement exprimé dans les lignées cancéreuses mammaires car celles-ci présentent toutes un Ct inférieure à 25 cycles (Figure 36.A). Les isoformes de *CD44* contenant les variants 3 et/ou 6 sont beaucoup plus transcrits dans la lignée HCC-1954 (Figure 36.D et F). Cependant, l'étude des niveaux d'ARNs messagers pour ces deux variants a montré que le variant 3 est en moyenne 6 fois plus transcrit que le variant 6 dans l'ensemble des lignées cancéreuses mammaires étudiées (données non montrées).

Nous avons ensuite déterminé si les niveaux d'ARNs messagers et les niveaux des protéines résultantes étaient similaires par western blot (Figure 37). La quantification des niveaux d'expression est effectuée par un ratio entre les bandes d'intérêt et l'actine pour chaque condition.

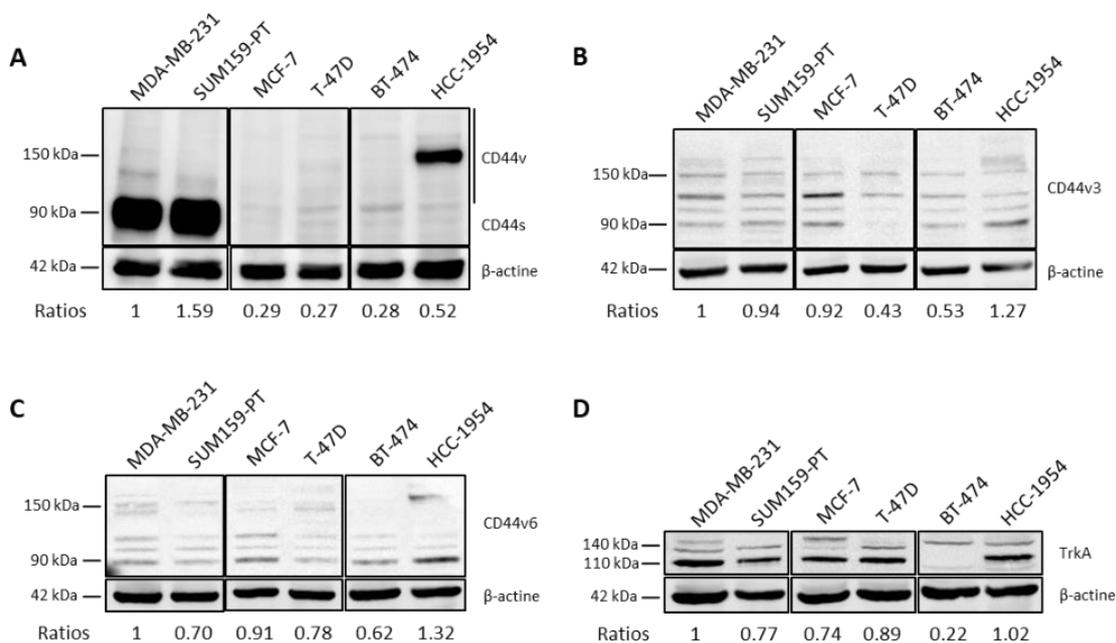


Figure 37 : Expression des protéines CD44, CD44v3, CD44v6 et TrkA dans différentes lignées cancéreuses mammaires par western blot

Les protéines sont dosées puis soumises à une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Suite au transfert des protéines sur membrane, elles sont mises en évidence via une incubation d'anticorps primaires ciblant CD44 (A), CD44v3 (B), CD44v6 (C) et TrkA (D). Les signaux résultant de la révélation des anticorps secondaires couplés à la HRP sont ensuite quantifiés grâce au logiciel Multi-Gauge et indiqués en tant que ratios par rapport aux bandes contrôles (DOprotéine/DOactine). L'expression dans les cellules MDA-MB-231 est considérée comme 1. Ces résultats sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

RÉSULTATS

Les résultats ont montré une bonne correspondance des niveaux protéiques de TrkA et CD44 avec les niveaux de transcrits mis en évidence par qPCR (Figure 36). Comme précédemment démontré, deux formes protéiques de TrkA sont détectées dans les lignées cancéreuses mammaires : une forme partiellement glycosylée de 110 kDa et une forme totalement glycosylée de 140 kDa (Figure 37.D). De nombreuses bandes sont visibles pour la protéine CD44 (Figure 37.A). Ces bandes de différents poids moléculaires correspondent aux différentes isoformes exprimées dans les cellules cancéreuses mammaires. Ainsi, la forme standard de CD44 est présente à un poids moléculaire de 90 kDa et l'insertion de variants et de nouvelles glycosylations permet l'apparition d'isoformes pouvant atteindre les 200 kDa. Les lignées MCF-7, T-47D et BT-474 présentent des bandes de faible intensité et ne semblent pas caractérisées par la présence majoritaire d'un isoforme particulier. Les lignées MDA-MB-231 et SUM159-PT présentent une forte expression de CD44 et on peut notamment observer la présence d'une bande très intense à 90 kDa. Ceci suggère que ces deux lignées sont marquées par une forte expression de CD44s ou d'isoformes courtes ne possédant pas un poids moléculaire significativement supérieur, ce qui confirme les résultats de PCR et de qPCR. La lignée HCC-1954 est également marquée par une forte expression protéique de CD44 visible par la présence d'une bande de forte intensité en western blot, ce qui confirme les résultats de qPCR. De façon plus surprenante, le poids moléculaire de cette bande atteint les 150 kDa, ce qui suggère la présence d'isoformes majoritaires possédant plusieurs variants dans leur structure ainsi qu'une possible glycosylation accentuée dans cette lignée. Malgré la présence d'isoformes courtes définie par les résultats de PCR, peu d'isoformes de CD44 de faible poids moléculaire sont visibles par Western Blot dans la lignée HCC-1954. Une caractérisation approfondie de ces bandes serait nécessaire pour conclure de l'identité précise de ces isoformes.

Les Western Blot obtenus après utilisation d'anticorps spécifiques des variants 3 et 6 présentent une faible correspondance avec les résultats obtenus en qPCR (Figure 37.B et C). En effet, malgré une tendance à une plus forte intensité dans la lignée HCC-1954, ces niveaux n'atteignent pas ceux suggérés par les résultats de qPCR. De plus, une bande de forte intensité est observée dans la lignée MCF-7 après utilisation de l'anticorps ciblant le variant 3. Ces résultats semblent contradictoires et suggèrent que les anticorps ciblant les variants 3 et 6, provenant de Cell Signaling, ne sont pas totalement adéquats pour une utilisation en Western

RÉSULTATS

Blot. On ne peut cependant exclure une régulation post-transcriptionnelle et/ou post-traductionnelle active pour les isoformes de CD44 contenant ces variants qui pourrait expliquer les différences obtenues entre les niveaux d'ARNs messagers et les niveaux protéiques.

Afin de finaliser la caractérisation des niveaux d'expression des récepteurs TrkA et CD44 dans les lignées cancéreuses mammaires, des marquages immunocytochimiques par fluorescence ont également été réalisés (Figure 38). Les résultats montrent une forte expression de panCD44 dans les lignées MDA-MB-231, SUM159-PT et HCC-1954, ainsi qu'une plus forte expression des isoformes contenant les variants 3 ou 6 dans la lignée HCC-1954, confirmant les précédents résultats. On observe cependant une uniformisation des niveaux membranaires de TrkA car la plus forte expression de TrkA dans la lignée MDA-MB-231 n'est pas visible avec cette technique.

L'ensemble de ces expériences a permis une caractérisation précise des niveaux d'expression des récepteurs TrkA et CD44.

RÉSULTATS

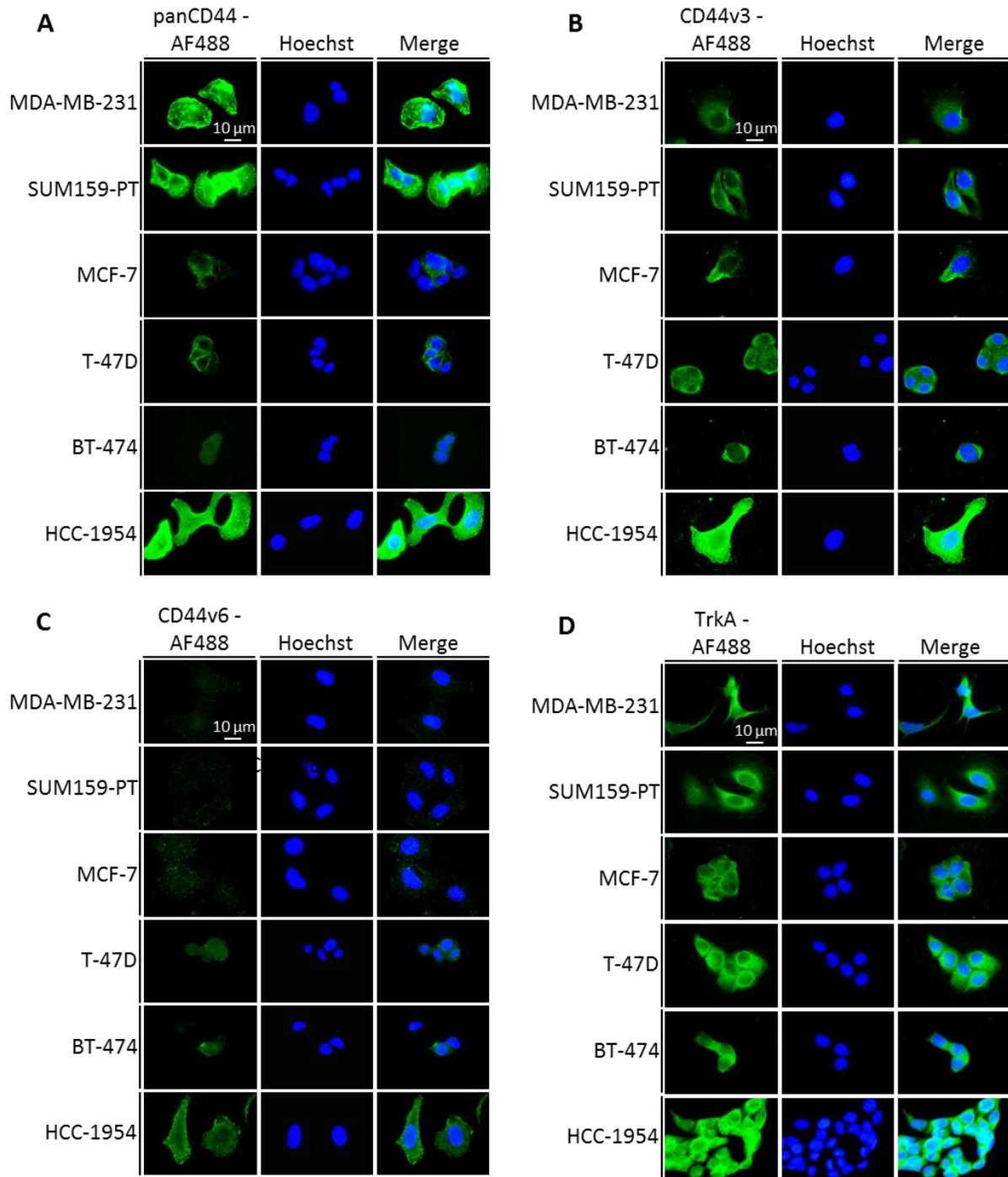


Figure 38 : Expression des protéines CD44, CD44v3, CD44v6 et TrkA dans différentes lignées cancéreuses mammaires par Immunocytochimie

Après fixation des cellules au paraformaldéhyde 4%, les cellules ont été marquées en absence de perméabilisation. Les marquages immunocytochimiques ont été effectués en utilisant des anticorps primaires ciblant les protéines CD44 (A), CD44v3 (B), CD44v6 (C) et TrkA (D). Les cellules sont ensuite incubées avec des anticorps secondaires couplés au fluorophore Alexa488 (vert). Le marquage des noyaux cellulaires est effectué grâce à une incubation avec le Hoechst 33258 (bleu).

RÉSULTATS

B. Détermination du variant de CD44 impliqué dans l'interaction TrkA/CD44

1. Analyse dans le modèle cellulaire COS-7

Afin de déterminer l'implication spécifique de variants de CD44 dans l'interaction TrkA/CD44, nous avons procédé à des expériences de transfection dans la lignée cellulaire COS-7. La lignée COS-7 possède quant à elle un phénotype « amoindri » qui lui confère une faible expression de diverses protéines notamment CD44 et TrkA ([Vela et al., 2007](#)). De plus, la lignée est couramment utilisée dans les expériences de transfection car elle possède une très bonne tolérance au processus.

Nous avons pu obtenir quatre lignées principales : une lignée COS-7_wt non transfectée, une lignée COS-7_TrkA/CD44s, une lignée COS-7_TrkA/CD44v3 et une lignée COS-7_TrkA/CD44v6. L'insertion correcte des plasmides d'expression a été confirmée par analyse des transcrits HA_*NTRK1* et *CD44* par qPCR (Figure 39).

RÉSULTATS

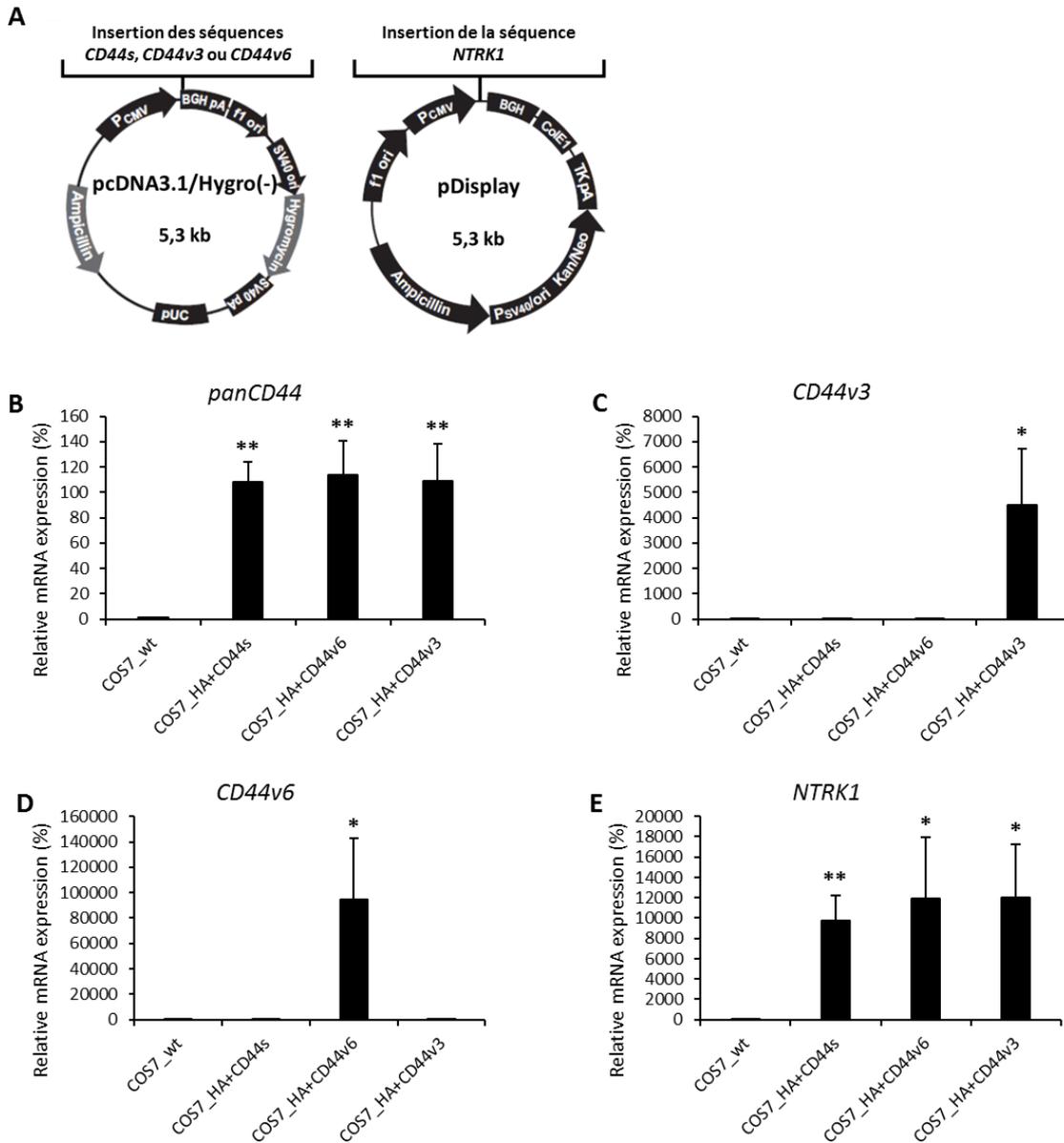


Figure 39 : Établissement de lignées COS-7 transfectées avec différents plasmides par électoporation

(A) Cartes plasmidiques des vecteurs utilisés pour la transfection des cellules COS-7. Expression relative des transcrits *CD44* (B), *CD44v3* (C), *CD44v6* (D) et *NTRK1* (E) dans des lignées COS-7 transfectées avec les plasmides *pdisplay_HA-TrkA* et/ou *pcDNA3.1/Hygro_CD44s*, *CD44v3* ou *CD44v6*. Le taux d'ARNm dans la condition *COS7_wt* est considéré comme 1. Les résultats sont obtenus par la moyenne de trois expériences indépendantes, moyennes \pm SD. Tests *t* non paramétriques. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

RÉSULTATS

Ces lignées ont ensuite été ensemencées sur des lames en verre, sevrées pendant 24 h avec du milieu contenant 0,1 % de SVF puis stimulées au NGF (16 nM) à différents temps (0, 5 et 30 min). L'interaction TrkA/CD44 est ensuite mise en évidence par la technique du PLA (Figure 40).

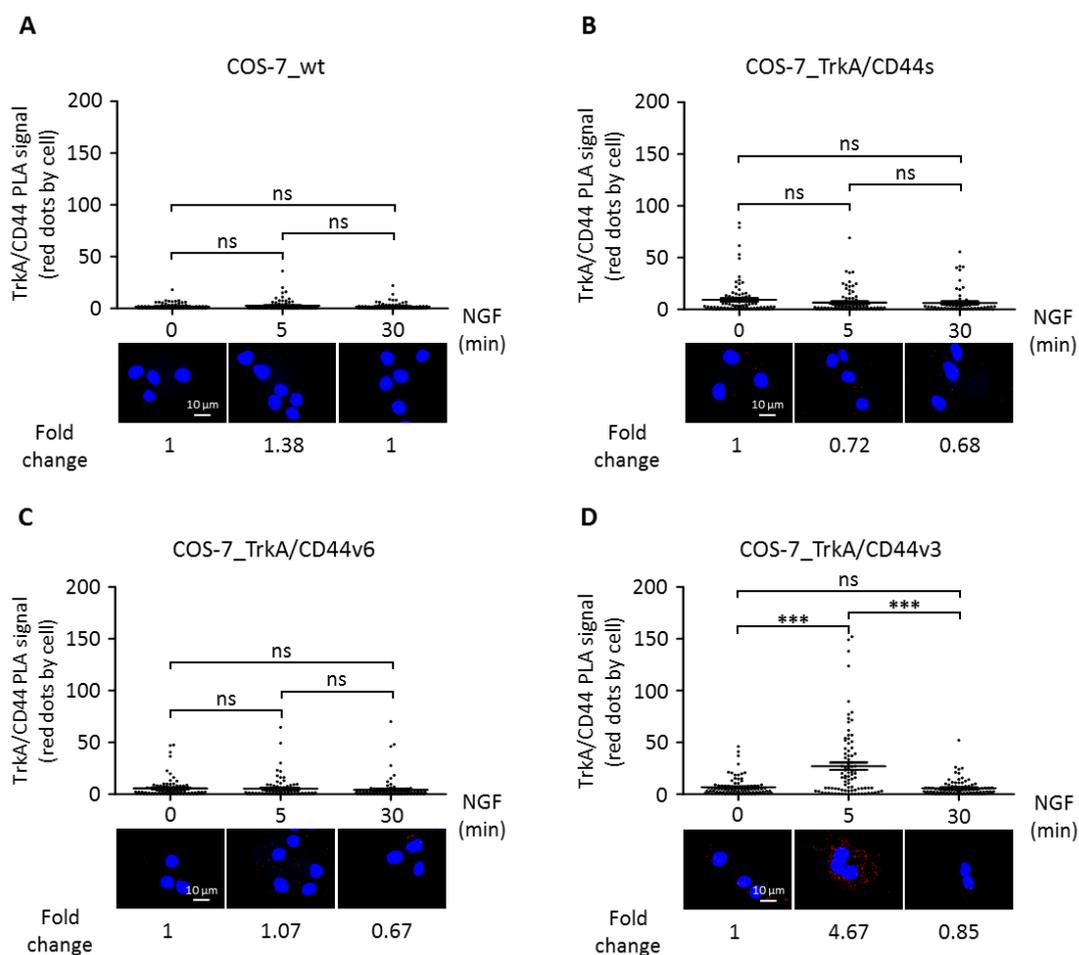


Figure 40 : Le variant 3 de CD44 est nécessaire et suffisant pour la mise en place de l'interaction TrkA/CD44 sous stimulation au NGF dans les cellules COS-7

Les cellules COS-7 ont été transfectées par électroporation avec les plasmides pdisplay_HA-TrkA et pcDNA3.1/Hygro_CD44s, CD44v3 ou CD44v6. Elles ont ensuite été sevrées pendant 24h puis traitées au NGF (16nM) à différents temps (0, 5 ou 30 min). L'association TrkA/CD44 a ensuite été visualisée par PLA dans les cellules COS-7_wt (A), COS-7_TrkA/CD44s (B), COS-7_TrkA/CD44v6 (C) et COS-7_TrkA/CD44v3 (D). Les interactions entre TrkA et CD44 sont visualisées en tant que points rouges. La quantification du nombre de points rouges a été effectuée sur le logiciel Image J. Ces graphes représentent la combinaison de trois expériences indépendantes. Pour la quantification relative (Fold change), le nombre de points PLA dans la condition non stimulée a été considéré comme 1. Les analyses statistiques effectuées sont une ANOVA à un facteur suivie d'un test Bonferroni. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne (SEM). *** $p < 0,001$.

RÉSULTATS

Ainsi, on observe un niveau basal très faible pour les complexes TrkA/CD44 dans les cellules COS-7_wt (Figure 40.A). La stimulation au NGF conduit à une augmentation non significative du nombre de complexes dans ces cellules (1,38). Dans les cellules COS-7_TrkA/CD44s (Figure 40.B) et COS-7_TrkA/CD44v6 (Figure 40.C), une légère augmentation du nombre de complexes TrkA/CD44 est observée à l'état basal en comparaison avec le nombre de complexes mis en évidence dans les cellules COS-7_wt. Une stimulation au NGF ne modifie pas le nombre de complexes dans ces cellules. De manière intéressante, l'augmentation du nombre de complexes est également observée à l'état basal dans la lignée COS-7_TrkA/CD44v3. De plus, la stimulation au NGF conduit à une augmentation significative du nombre de complexes dans ces cellules après 5 minutes de traitement (4 fois plus) (Figure 40.D). Le nombre de complexes retourne à l'état basal après 30 minutes de stimulation. **Ces résultats montrent que le variant 3 de CD44 est nécessaire et suffisant pour la mise en place de l'interaction TrkA/CD44 sous stimulation au NGF.**

2. Analyse dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231

Suite aux résultats obtenus dans les cellules COS-7, les analyses de l'interaction TrkA/CD44v3 ont été réalisées dans la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231. En effet, nous voulions vérifier l'importance du variant 3 de CD44 dans la mise en place de l'interaction TrkA/CD44 dans notre modèle d'étude mais aussi la confirmer par des méthodes complémentaires. La lignée MDA-MB-231 a été choisie pour ses taux d'expression à la fois de TrkA mais aussi de CD44. Par la suite, les isoformes de CD44 contenant les variants 3 et 6 sont notés CD44v3 et CD44v6.

- Analyse des niveaux membranaires de CD44v3 et CD44v6 suite à une stimulation au NGF

Afin de démontrer l'importance de CD44v3 et non du CD44v6 dans la signalisation du NGF, nous avons analysé les niveaux membranaires de CD44v3 et CD44v6 suite à une stimulation au NGF dans les cellules MDA-MB-231 par cytométrie en flux (Figure 41). Un décalage significatif du pic de fluorescence (environ 30 %) est observé après 5 minutes de stimulation au NGF pour le marquage CD44v3. Ces résultats démontrent un recrutement des protéines CD44v3 dans les cellules MDA-MB-231. Les niveaux membranaires de CD44v3 diminuent après 30 minutes de stimulation au NGF mais restent cependant supérieurs à l'état

RÉSULTATS

basal (environ 20 % supérieur). Une légère augmentation des niveaux membranaires de CD44v6 (environ 5 %) est observée après 5 minutes de stimulation au NGF mais cette augmentation n'est pas significative. **Ces expériences montrent qu'une stimulation au NGF dans les cellules MDA-MB-231 induit le recrutement à la membrane des isoformes de CD44 contenant le variant 3 mais pas le variant 6.**

- Analyse de l'interaction TrkA/CD44v3 dans les cellules MDA-MB-231 par immunoprécipitation

Dans la lignée MDA-MB-231_HA-TrkA, CD44v3 est associée à HA-TrkA après 5 minutes de stimulation au NGF (Figure 41.D). L'interaction entre HA-TrkA et CD44v3 semble perdurer jusqu'à 60 minutes de stimulation dans ces conditions d'expérimentation. **Ces résultats confirment qu'une stimulation au NGF dans les cellules MDA-MB-231 induit une augmentation de l'interaction TrkA/CD44v3.**

RÉSULTATS

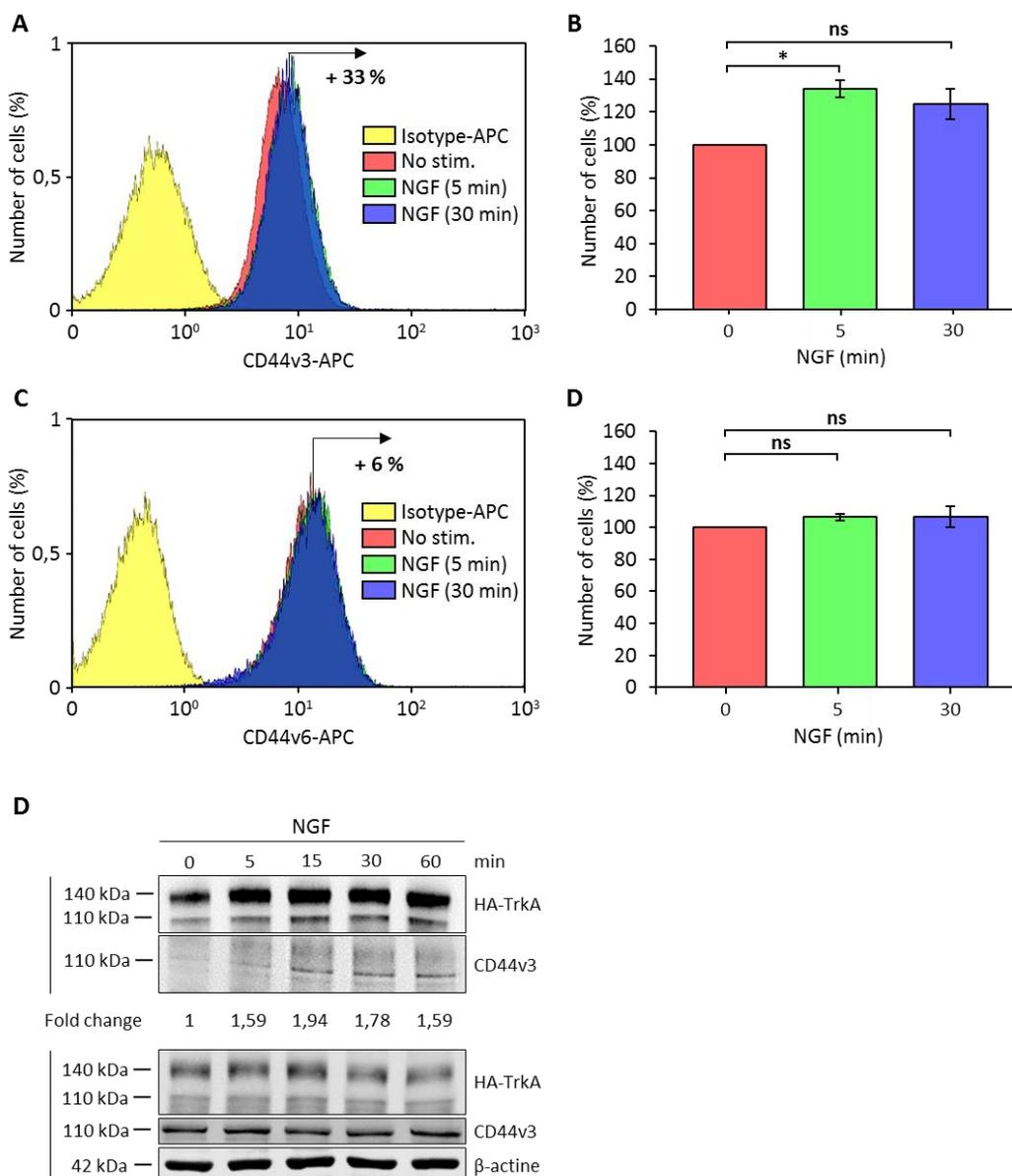


Figure 41 : La stimulation au NGF (16 nM) dans les cellules MDA-MB-231 permet un recrutement de CD44v3 à la membrane et augmente l'interaction entre TrkA et CD44v3

(A et C) : Analyses des niveaux membranaires des isoformes de CD44 contenant le variant 3 (A) ou le variant 6 (C). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

(B et D) : Quantifications relatives du nombre de cellules fluorescentes pour les protéines membranaires CD44v3 (B) et CD44v6 (D). Les résultats sont les moyennes de trois expériences indépendantes \pm SEM. Les analyses statistiques effectuées sont des tests de Student

(D) Les cellules MDA-MB-231_HA-TrkA ont été traitées au NGF (16 nM) à différents temps (0, 5, 15, 30 et 60 min). Les immunoprécipitations ont été effectuées à l'aide d'un anticorps anti-HA suivies d'immunoblots pour détecter la présence de CD44v3. Le taux de CD44v3 immunoprécipité dans chaque condition a été normalisé et indiqué comme Fold change.

RÉSULTATS

3. Analyse de l'interaction TrkA/CD44v3 dans les cellules cancéreuses mammaires par PLA

De la même manière que pour la lignée COS-7, des expériences de PLA dans les cellules cancéreuses mammaires ont été effectuées afin d'étudier la mise en place d'un complexe TrkA/CD44v3 dans le modèle de cancer du sein (Figure 42). Pour cela, un anticorps ciblant uniquement CD44v3 a été utilisé (Figure 42.A). Nous avons observé l'existence d'un signal PLA TrkA/CD44v3 dans l'ensemble des lignées étudiées en absence de stimulation au NGF. Cependant, les niveaux de complexes ainsi que les taux de réponse à la stimulation au NGF diffèrent selon les lignées. Une stimulation au NGF induit une augmentation significative du nombre de complexes TrkA/CD44v3 à 5 minutes qui progresse encore à 30 minutes dans les lignées MDA-MB-231, SUM159-PT et MCF-7 (Figure 42.A, B, C et D). Une augmentation significative du nombre de complexes TrkA/CD44v3 a été observée après 5 minutes de stimulation au NGF suivie d'une diminution à 30 minutes dans les lignées T-47D et HCC-1954 (Figure 42.A, E et G). Un taux relativement faible de complexes est cependant détecté dans la lignée T-47D. Très peu de complexes ont été détectés dans la lignée BT-474 et une stimulation au NGF n'a pas conduit à une augmentation du signal PLA dans cette lignée cellulaire, suggérant que l'interaction TrkA/CD44v3 n'est pas un mécanisme majeur dans la signalisation du NGF dans cette lignée particulière. De manière intéressante, la meilleure réponse au NGF a été observée dans les lignées cancéreuses mammaires possédant un profil mésenchymateux soit les lignées MDA-MB-231, SUM159-PT et HCC-1954.

RÉSULTATS

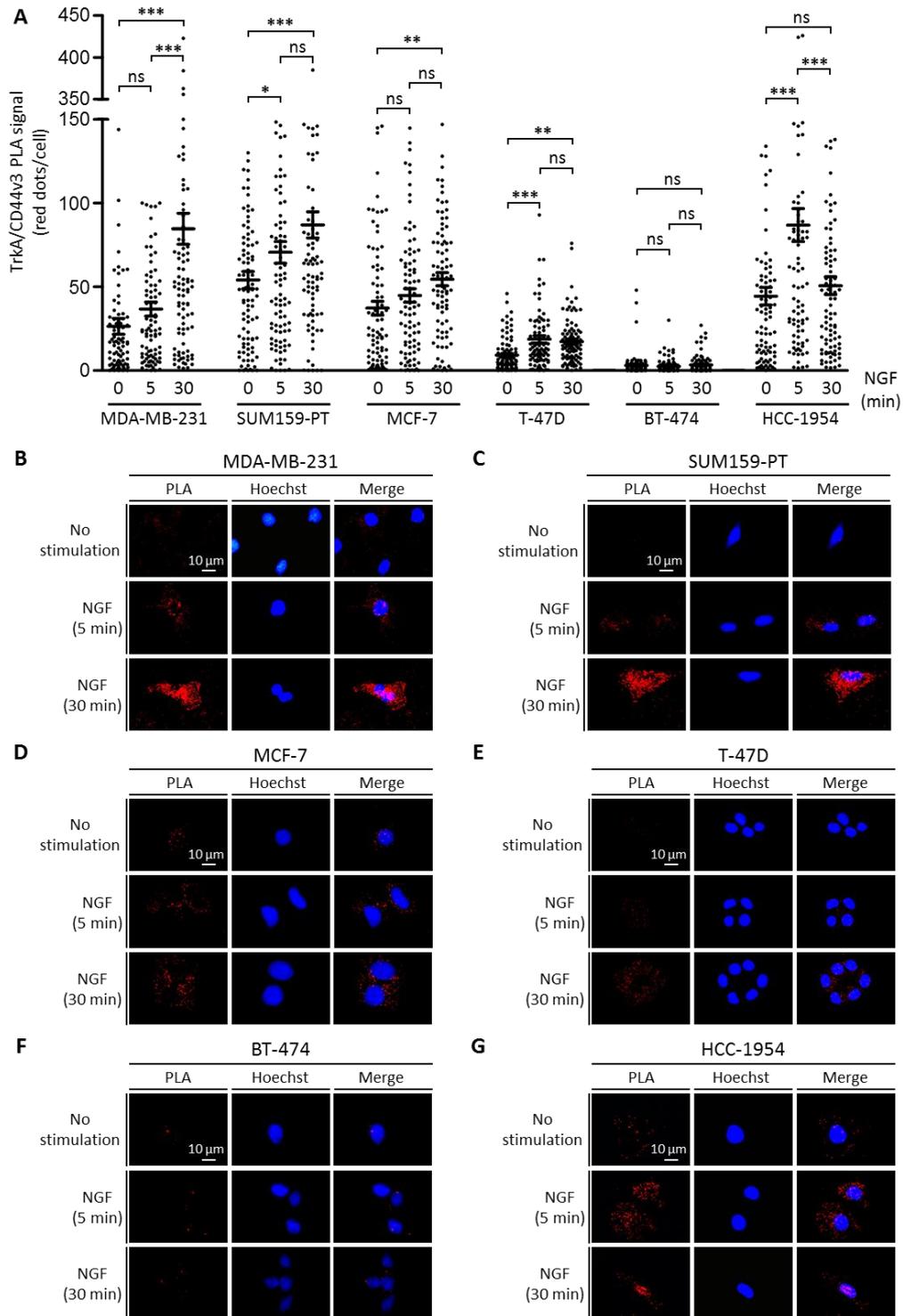


Figure 42 : Mise en évidence de l'interaction TrkA/CD44v3 dans différentes lignées cancéreuses mammaires par PLA

(A) Quantification du nombre de complexes TrkA/CD44v3 détectés par PLA dans différentes lignées cancéreuses mammaires. La quantification est effectuée sur 90 champs différents grâce au logiciel Image J. Le nombre de points par cellule est estimé en fonction du nombre de noyaux détectés dans chaque champ. Les résultats sont ensuite soumis à un test statistique ANOVA à un facteur suivi d'un test Bonferroni avec le logiciel Prism. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; ns : non significatif.

(B – G) Photos représentatives des différentes conditions.

RÉSULTATS

Par ailleurs, l'interaction TrkA/CD44v6 a également été explorée dans l'ensemble des lignées par PLA en utilisant un anticorps ciblant les isoformes de CD44 contenant le variant 6 (Figure 43). Ces expériences ont montré l'existence d'un signal faible voire inexistant pour le complexe TrkA/CD44v6 dans l'ensemble des lignées ainsi qu'aucun changement significatif du nombre de complexes après stimulation au NGF.

Ces résultats montrent que le complexe TrkA/CD44v3 est une réalité biologique dans différents sous-types moléculaires de cancer du sein bien qu'il semble que ce complexe soit préférentiellement mis en place dans les lignées cancéreuses mammaires présentant un profil mésenchymateux. Le complexe TrkA/CD44v6 est faiblement détecté dans les lignées cancéreuses mammaires.

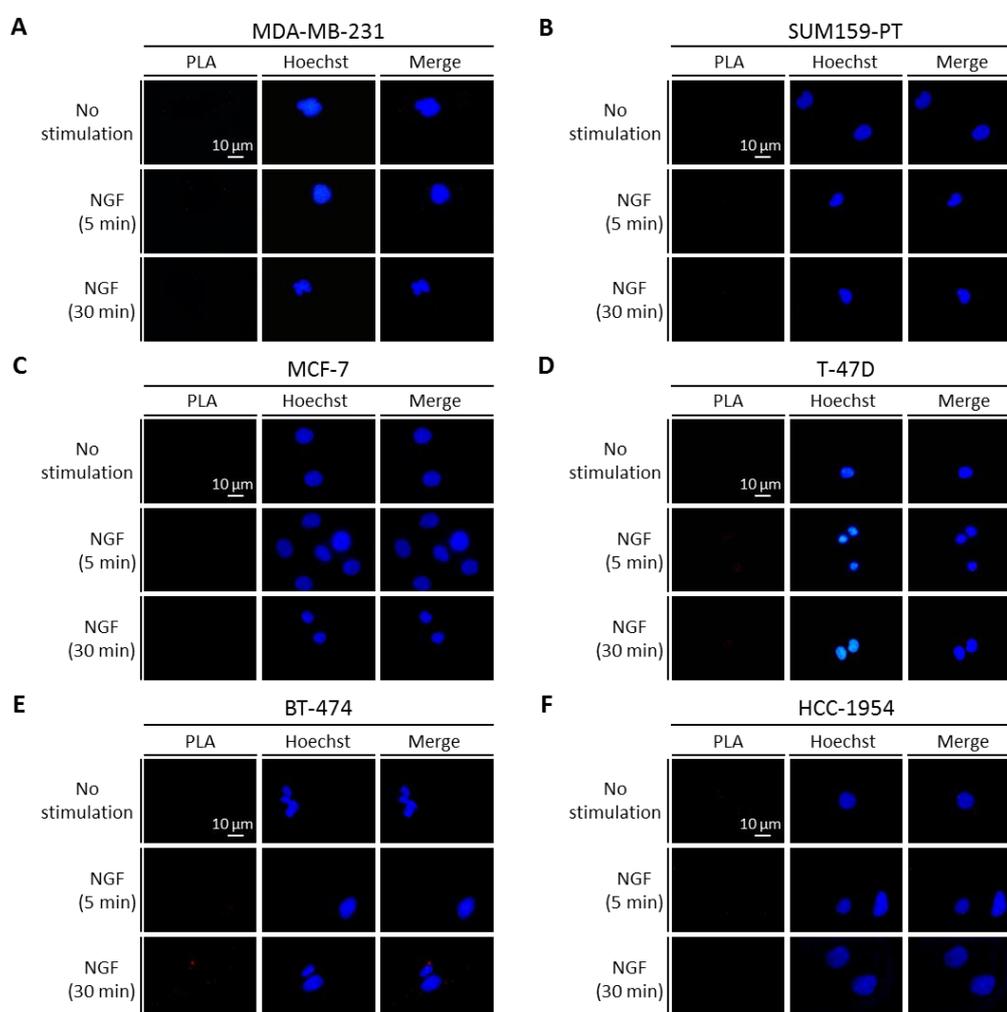


Figure 43 : Analyse de l'interaction TrkA/CD44v6 par PLA dans différentes lignées cancéreuses mammaires

Les cellules ont été traitées au NGF (16 nM) puis l'interaction entre TrkA et CD44v6 a été mise en évidence par PLA. (A-F) Photos représentatives des différentes conditions.

C. Implications fonctionnelles du complexe TrkA/CD44v3 dans la signalisation pro-tumorale du NGF

Le NGF est impliqué dans de nombreux processus pro-tumoraux dans les lignées cancéreuses mammaires comme la prolifération, la migration ou encore l'invasion (Aubert *et al.*, 2015; Descamps *et al.*, 2001b; Tomellini *et al.*, 2015). Nous avons cherché à démontrer la participation de CD44v3 dans ces différents processus.

1. Clonogénicité

Afin d'explorer les fonctions du complexe TrkA/CD44v3 dans la signalisation pro-tumorale du NGF, nous avons inhibé l'expression de CD44v3 dans les lignées cancéreuses mammaires grâce à l'utilisation d'un pool de deux si-ARNs. Ce pool sera noté si-CD44v3 par la suite. L'efficacité de ces si-ARNs a été testée par qPCR et validée par des tests de clonogénicité dans la lignée MDA-MB-231 (Figure 44.A, B et C) puis l'utilisation du pool si-CD44v3 a été validée par l'analyse des transcrits par qPCR dans trois lignées représentatives de chaque sous-type moléculaire (Figure 44.D).

Les résultats montrent que le NGF stimule la formation de colonies dans l'ensemble des lignées étudiées exceptées la lignée BT-474 (Figure 45). De façon intéressante, l'inhibition de l'expression de CD44v3 conduit à l'abolition de l'effet du NGF dans les lignées MDA-MB-231, SUM159-PT, MCF-7, T-47D et HCC-1954, démontrant l'implication du CD44v3 dans la signalisation pro-tumorale du NGF dans ces lignées cancéreuses mammaires. De plus, l'inhibition de CD44v3 dans les lignées MDA-MB-231, SUM159-PT et T-47D conduit à une forte diminution de la clonogénicité de ces lignées avec ou sans stimulation au NGF, suggérant un rôle important de CD44v3 dans ces lignées indépendamment de la signalisation du NGF. Les résultats obtenus dans la lignée BT-474 peuvent être expliqués par les faibles taux de complexes TrkA/CD44v3 détectés dans ces cellules par PLA. En revanche, l'inhibition de CD44v3 dans la lignée MCF-7 conduit à une forte augmentation de la clonogénicité de ces cellules indépendamment de l'effet du NGF, suggérant que CD44v3 pourrait avoir un rôle protecteur dans cette lignée qui ne serait pas dû à l'interaction TrkA/CD44v3.

RÉSULTATS

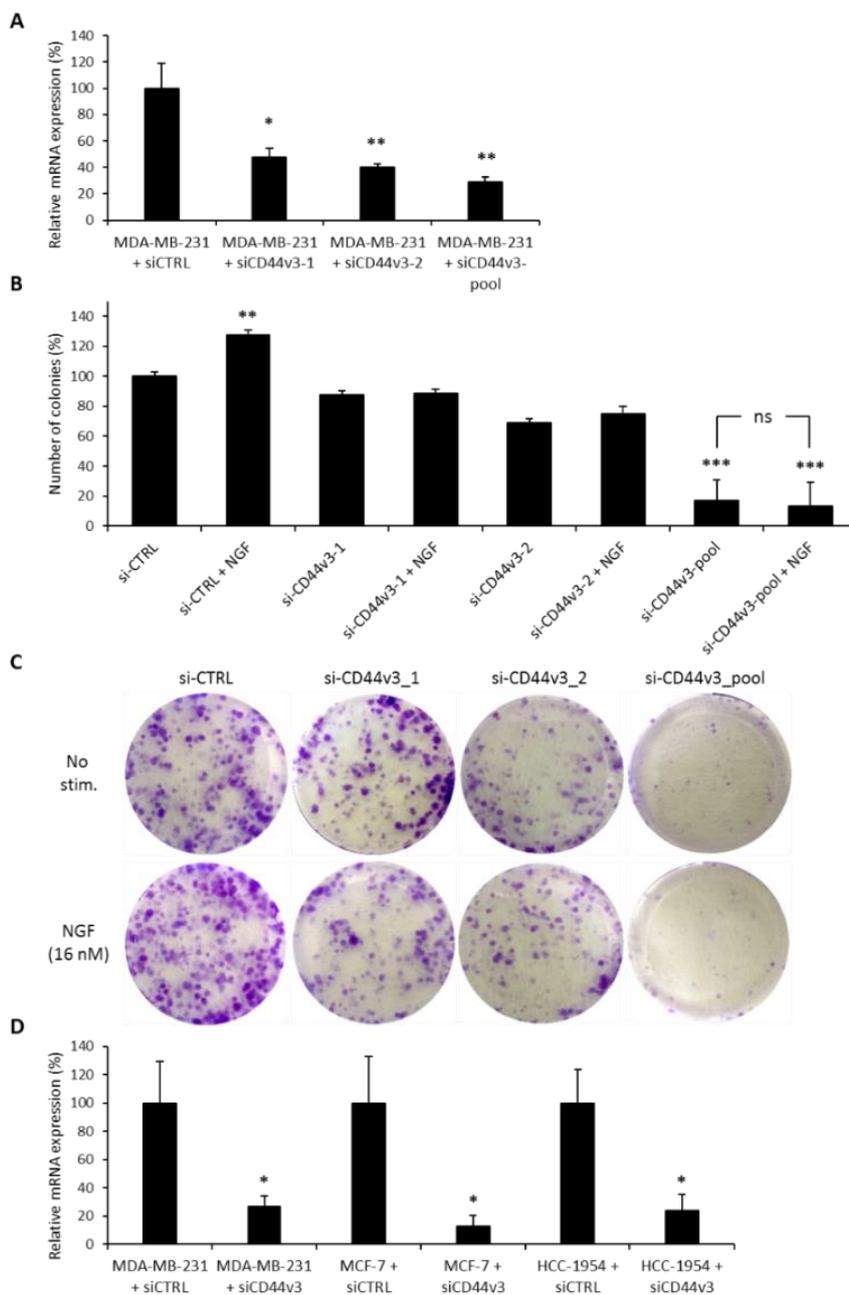


Figure 44 : Efficacité des si-ARNs ciblant CD44v3 déterminée par qPCR et tests de clonogénicité

(A) Niveaux d'expression des transcrits du gène CD44v3 dans les cellules MDA-MB-231 transfectées avec si-CTRL, deux séquences différentes de si-CD44v3 (1 et 2) individuellement ou ensemble (pool). Le taux d'ARNs messagers détecté dans la condition si-CTRL est considéré comme 100. Les résultats sont présentés comme la moyenne de trois expériences indépendantes \pm SD. Les analyses statistiques effectuées sont des tests non paramétriques de Mann-whitney. $**p < 0,01$; $* p < 0,05$. (B) Tests de clonogénicité dans les cellules MDA-MB-231 après transfection de si-ARNs. Le nombre de colonies est compté après 10 jours d'incubation. Seules les colonies contenant plus de 50 cellules sont comptabilisées. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Moyennes \pm SEM. Tests Mann-whitney. $*** p < 0,001$; $** p < 0,01$. (C) Photos représentatives des tests de clonogénicité effectuées dans la lignée MDA-MB-231. (D) Niveaux d'expression des transcrits de CD44v3 dans les lignées MDA-MB-231, MCF-7 et HCC-1954 après transfection de si-CTRL ou du pool siCD44v3. Le taux d'ARNs messagers détecté dans la condition si-CTRL est considéré comme 100. Moyenne de trois expériences indépendantes \pm SD. Tests Mann-whitney. $**p < 0,01$; $* p < 0,05$.

RÉSULTATS

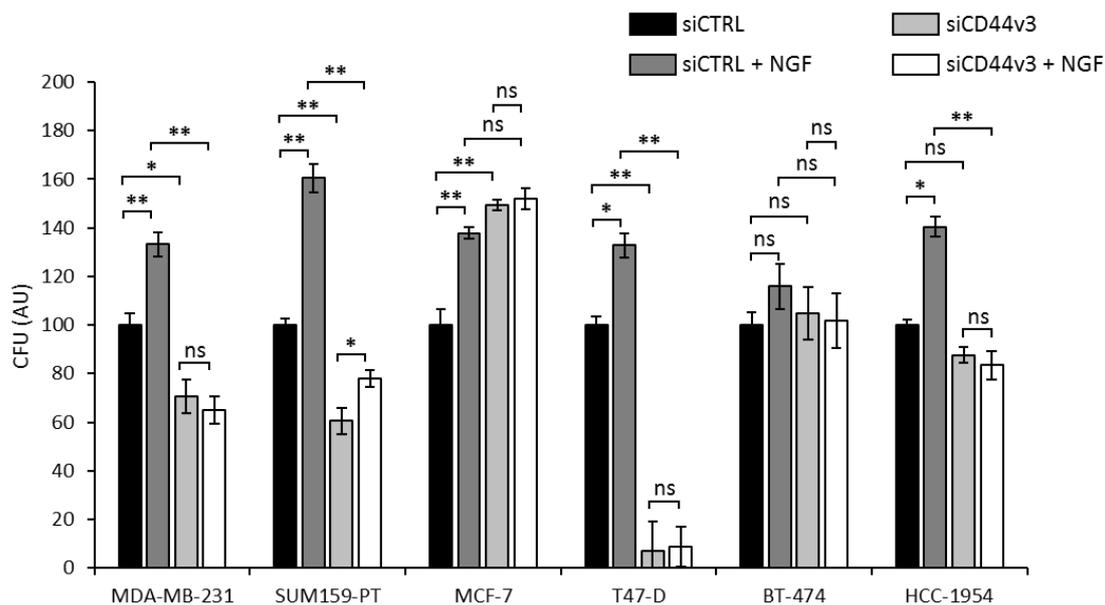


Figure 45 : Evaluation de l'implication de CD44v3 dans la croissance des lignées cancéreuses mammaires par tests de clonogénicité

Après transfection, les cellules ont été ensemencées à faible densité dans des plaques 6 puits en présence de milieu + 2 % SVF. Après 10 jours d'incubation à 37°C, les cellules sont fixées puis les colonies marquées au crystal violet. Seules les colonies contenant plus de 50 cellules sont comptabilisées à l'œil nu. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques effectuées sont des tests non paramétriques de Mann-Whitney \pm SEM. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Ces résultats démontrent que CD44v3 participe à la clonogénicité des cellules cancéreuses mammaires suite à la stimulation au NGF.

2. Migration

Grâce à l'utilisation d'inserts de culture Ibdis, nous avons testé l'implication de CD44v3 dans la migration cellulaire induite par le NGF. Après transfection d'un si-CTRL dans les cellules MDA-MB-231, une stimulation au NGF favorise la fermeture de la blessure après 12 et 24 heures en comparaison de la condition non stimulée (Figure 46.A et B), confirmant le rôle pro-migratoire du NGF dans ces cellules. La transfection d'un si-CD44v3 conduit à l'abolition de cet effet pro-migratoire du NGF car on observe que la fermeture de la blessure en absence de CD44v3 atteint les niveaux retrouvés dans la condition si-CTRL non stimulée au NGF. **Ces résultats démontrent l'implication de CD44v3 dans la signalisation pro-migratoire du NGF dans la lignée MDA-MB-231.**

RÉSULTATS

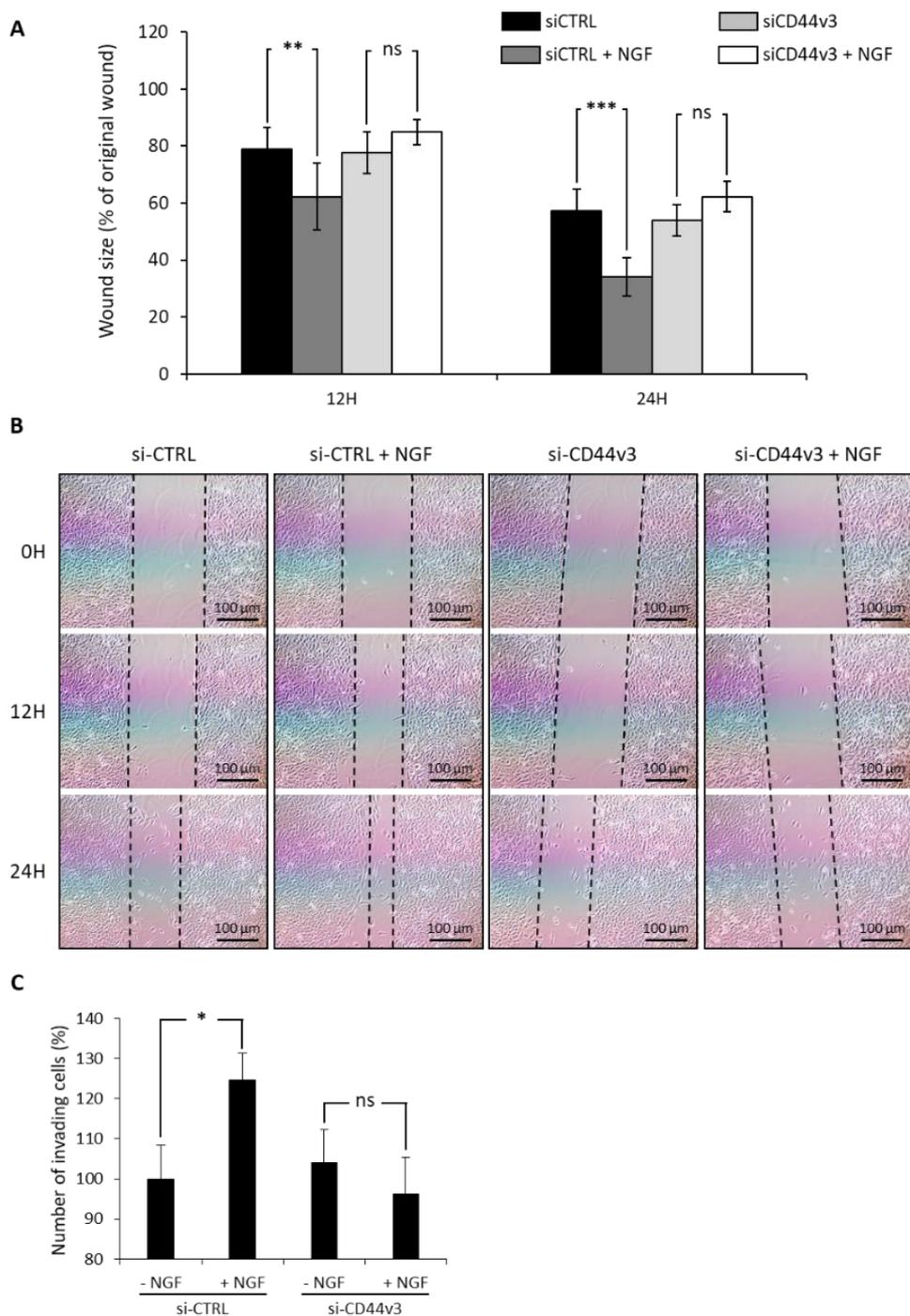


Figure 46 : CD44v3 est impliqué dans la migration et l'invasion cellulaire induite par le NGF dans la lignée MDA-MB-231

(A) Les tailles des blessures sont analysées avec le logiciel Image J à 12h et 24h après avoir effectué la blessure. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la taille de la blessure initiale (0 h). Les analyses statistiques effectuées sont un test ANOVA à deux facteurs. Moyennes \pm SEM. *** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (B) Photos représentatifs des conditions effectuées en tests de migration. Les pointillés noirs indiquent les bords de la blessure. (C) Tests d'invasion effectués en chambre Transwell avec les cellules MDA-MB-231 transfectées avec si-CTRL ou si-CD44v3 et en présence ou non de NGF. Les cellules ayant traversé la membrane sont comptabilisées avec le logiciel Image J. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Moyennes \pm SEM. Tests Mann-whitney. * $p < 0,05$.

RÉSULTATS

3. Invasion cellulaire

Nous avons ensuite testé l'implication de CD44v3 dans l'invasion cellulaire induite par le NGF. Après transfection de si-CTRL ou de si-CD44v3 dans les cellules MDA-MB-231, les cellules ont été ensemencées dans des chambres d'invasion Transwell (Falcon) préalablement coatées au collagène de type 1 (10 µg/mL). Les résultats montrent que le NGF augmente l'invasion des cellules MDA-MB-231 en condition si-CTRL (Figure 46.C). L'inhibition de l'expression de CD44v3 dans ces cellules abolit l'effet du NGF. **Ces résultats démontrent l'implication de CD44v3 dans l'invasion induite par le NGF et suggèrent également un rôle de CD44v3 dans l'invasion des cellules MDA-MB-231 à travers des signalisations indépendantes du NGF.**

4. Implication du complexe TrkA/CD44v3 *in vivo*

Afin d'explorer l'implication du complexe TrkA/CD44v3 dans les tumeurs mammaires, nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques sur des échantillons de tumeurs de patientes. Les marquages PLA ont été réalisés sur une lame Tissue MicroArray contenant 150 spots (HBre-Duc150). De plus, les marquages effectués en TMA sont actuellement étendus sur 163 échantillons de tumeurs mammaires fournis par le Centre Ocart-Lambret (expériences en cours). Les résultats ont permis de montrer que le complexe TrkA/CD44v3 est spécifique des cellules tumorales car aucun complexe n'a été mis en évidence que ce soit au niveau de l'épithélium mammaire ou du stroma. Le marquage TrkA/CD44v3 dans les tumeurs mammaires a été gradé selon le nombre de points par cellule (Figure 47.A-E). Ainsi, les marquages sont considérés comme faible (< 2 points par cellule ; Figure 47.C), moyen (5 points par cellules ; Figure 47.D) et fort (> 5 points par cellule ; Figure 47.E). Considérant cette gradation, les tumeurs ont été classées suivant l'intensité de marquage PLA. Les résultats ont été corrélés avec la survie globale des patientes et présentés sous forme d'un graphique de Kaplan-Meier (Figure 47.F). Les résultats ont montré que la présence du complexe TrkA/CD44v3 n'est pas corrélée avec la survie globale des patientes. Des analyses de corrélation statistiques ont été effectuées en considérant différents paramètres tels que la classe moléculaire des tumeurs, le stade TNM, le statut p53, la survie globale ou encore l'envahissement ganglionnaire (Tableau 11). Les résultats montrent une corrélation significative entre l'intensité du marquage PLA et le statut PR- ($p=0,0445$). De manière intéressante et bien que les résultats soient non significatifs, l'intensité de marquage tend à

RÉSULTATS

être corrélée avec le statut triple-négatif ($p=0,0528$). Ces résultats semblent être en adéquation avec les résultats obtenus *in vitro* où le signal PLA était plus intense dans les lignées triple-négatives MDA-MB-231 et SUM159-PT. Il est nécessaire d'augmenter la cohorte de patientes pour confirmer ces résultats.

Ces résultats démontrent l'importance du complexe TrkA/CD44v3 dans les tumeurs mammaires, en particulier les cancers du sein triple-négatifs et suggèrent une implication de ce complexe dans l'agressivité tumorale mammaire. Le complexe TrkA/CD44v3 se présente donc comme une cible thérapeutique de choix pour le traitement des cancers du sein triple-négatifs, cancers pour lesquels aucune thérapie ciblée n'est à ce jour établie.

RÉSULTATS

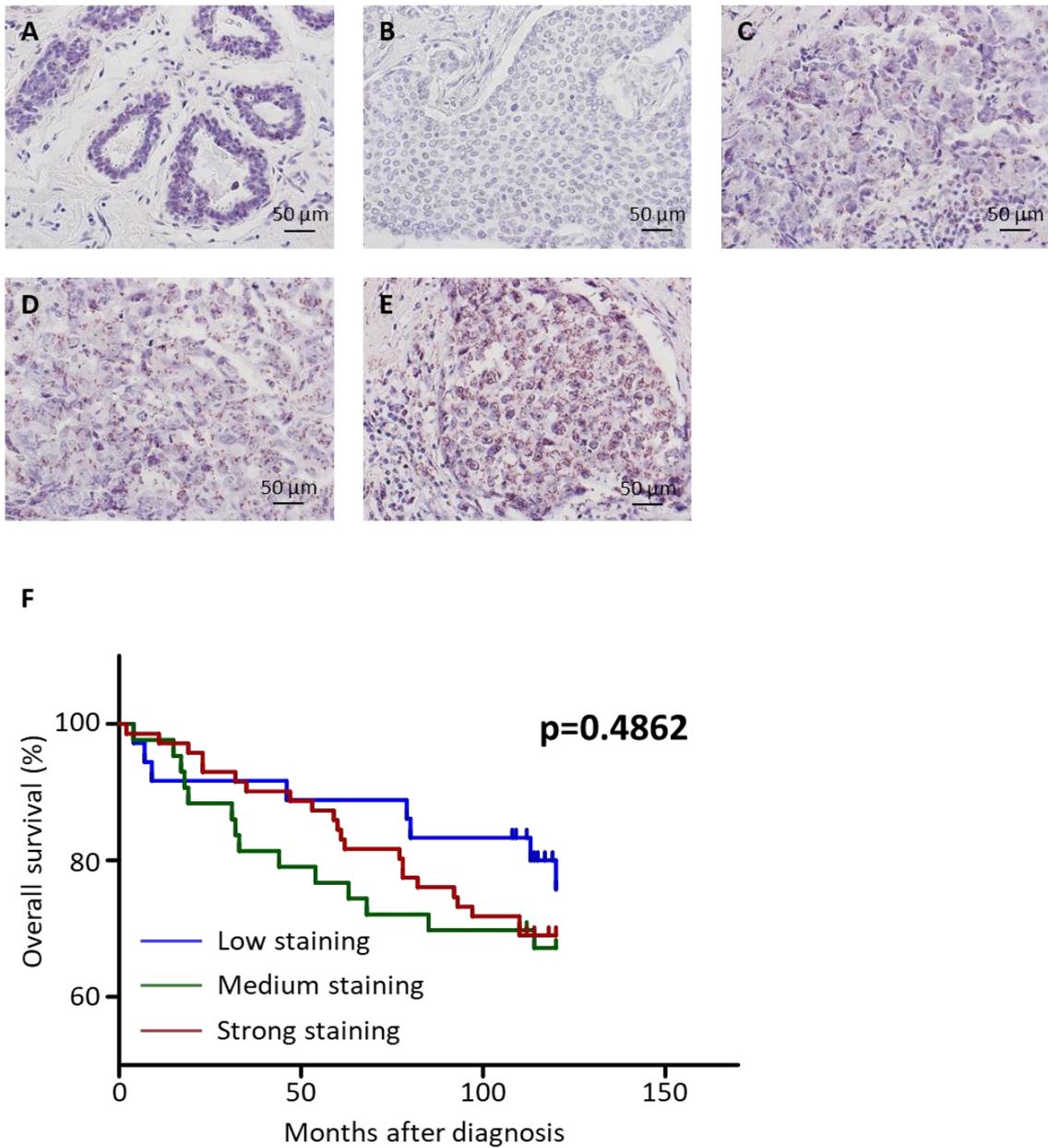


Figure 47 : Corrélation entre le marquage PLA TrkA/CD44v3 et la survie globale de patientes atteintes d'un cancer du sein

(A-E) Photos représentatives des marquages PLA TrkA/CD44v3 sur des coupes de tumeurs mammaires. Aucun signal n'a été détecté dans les tissus non tumoraux (A). En fonction des échantillons marqués, les marquages PLA pouvaient être absent (B), faible (C), moyen (D) ou fort (E). La contre-coloration est effectuée à l'aide d'une solution d'hémostyline de Mayer. (F) Corrélation entre la survie globale de patientes atteintes d'une tumeur mammaire et le marquage PLA TrkA/CD44v3 présentée sous forme d'un graphique de Kaplan-Meier. Test log-rank effectué avec le logiciel Prism. Nombre d'échantillons : 150.

RÉSULTATS

			Marquage moyen	p value
Nombre de patients		150	2,35	-
Age moyen (années) au moment du diagnostique		53,57 (29-83)	ND	-
Suivi moyen (années)		9,3 (0,167-13,5)	ND	-
Grade histologique	I	11 (7,33%)	2,182	-
	IIA	56 (37,33%)	2,268	0,8511
	IIB	30 (20%)	2,533	0,3697
	IIC	0 (0%)	ND	-
	IIIA	41 (27,33%)	2,317	0,7188
	IIIB	0 (0%)	ND	-
	IIIC	9 (6%)	2,667	0,359
	NA	3 (2%)	ND	-
Stade pathologique de la tumeur	T1	32 (21,33%)	2,22	-
	T2	100 (66,67%)	2,42	0,4087
	T3	14 (9,33%)	2,21	0,9918
	NA	4 (2,66%)	ND	-
Envahissement ganglionnaire	Négatif	54 (36%)	2,222	-
	Positif	93 (62%)	2,43	0,3145
	NA	3 (2%)	ND	-
Récepteur à l'œstrogène	Négatif	46 (30,67%)	2,609	-
	Positif	96 (64%)	2,208	0,0657
	NA	8 (5,33%)	ND	-
Récepteur à la progestérone	Négatif	56 (37,33%)	2,607	-
	Positif	85 (56,67%)	2,188	0,0445
	NA	9 (6%)	ND	-
HER-2	Négatif	94 (62,67%)	2,394	-
	Positif	49 (32,67%)	2,245	0,4877
	NA	7 (4,67%)	ND	-
Triple négative	Négatif	118 (78,67%)	2,271	-
	Positif	22 (14,67%)	2,818	0,0528
	NA	10 (6,67%)	ND	-

Tableau 11 : Caractéristiques clinico-pathologiques de la cohorte de patientes utilisée dans l'étude TrkA/CD44v3

Les données ont été obtenues à partir d'une lame TMA HBre-Duc150 fournie par SuperBio Chips Laboratories. Le statut « lymph node » est considéré comme négatif (T0) ou positif (T1, T2 et T3). NA = Non Acquis. ND = Non Déterminé. La p value correspond à un t-test comparant les données correspondantes avec le stage le plus bas ou la négativité du statut.

RÉSULTATS

D. Ciblage de l'interaction TrkA/CD44

1. Détermination des zones de CD44v3 impliquées dans l'interaction

La séquence de l'exon variant 3 donne naissance à une séquence peptidique de 42 acides aminés, nous avons divisé la zone en 4 régions de 10 ou 11 acides aminés. Chaque plasmide contient une délétion de région et sont notés pcDNA3.1/Hygro_CD44v3 Δ 1, Δ 2, Δ 3 ou Δ 4. Nous avons ensuite recherché l'association de ces mutants et de TrkA dans les cellules COS-7. Après nous être assurés de la surexpression des protéines transfectées par qPCR (Figure 48.E et F), des expériences de PLA dirigées contre le complexe TrkA/CD44 ont été menées afin de déterminer si une des zones délétées du variant 3 était nécessaire à l'interaction suite à une stimulation au NGF (Figure 48.A-D). Ces résultats montrent qu'en l'absence des régions 1 et 2 du variant 3, la stimulation au NGF ne conduit plus à une augmentation significative du nombre de complexes TrkA/CD44 (Figure 48.A et B). De plus, la délétion des régions 1 ou 4 diminuent nettement le nombre de complexes TrkA/CD44 dans l'ensemble des conditions (trois fois moins) (Figure 48.A et D). La région 3 en revanche ne semblent pas impacter la formation du complexe car on observe une nette augmentation significative du nombre de complexes TrkA/CD44v3 à 5 min de stimulation au NGF (Figure 48. C).

Ces résultats suggèrent donc que les séquences importantes pour l'interaction avec TrkA sont situées dans les régions 1 et 4 du variant 3.

Compte tenu des résultats obtenus, nous avons demandé la synthèse de deux peptides mimétiques des régions 1 et 4 (Genscript) afin de savoir si ces peptides étaient capables de bloquer l'interaction TrkA/CD44.

RÉSULTATS

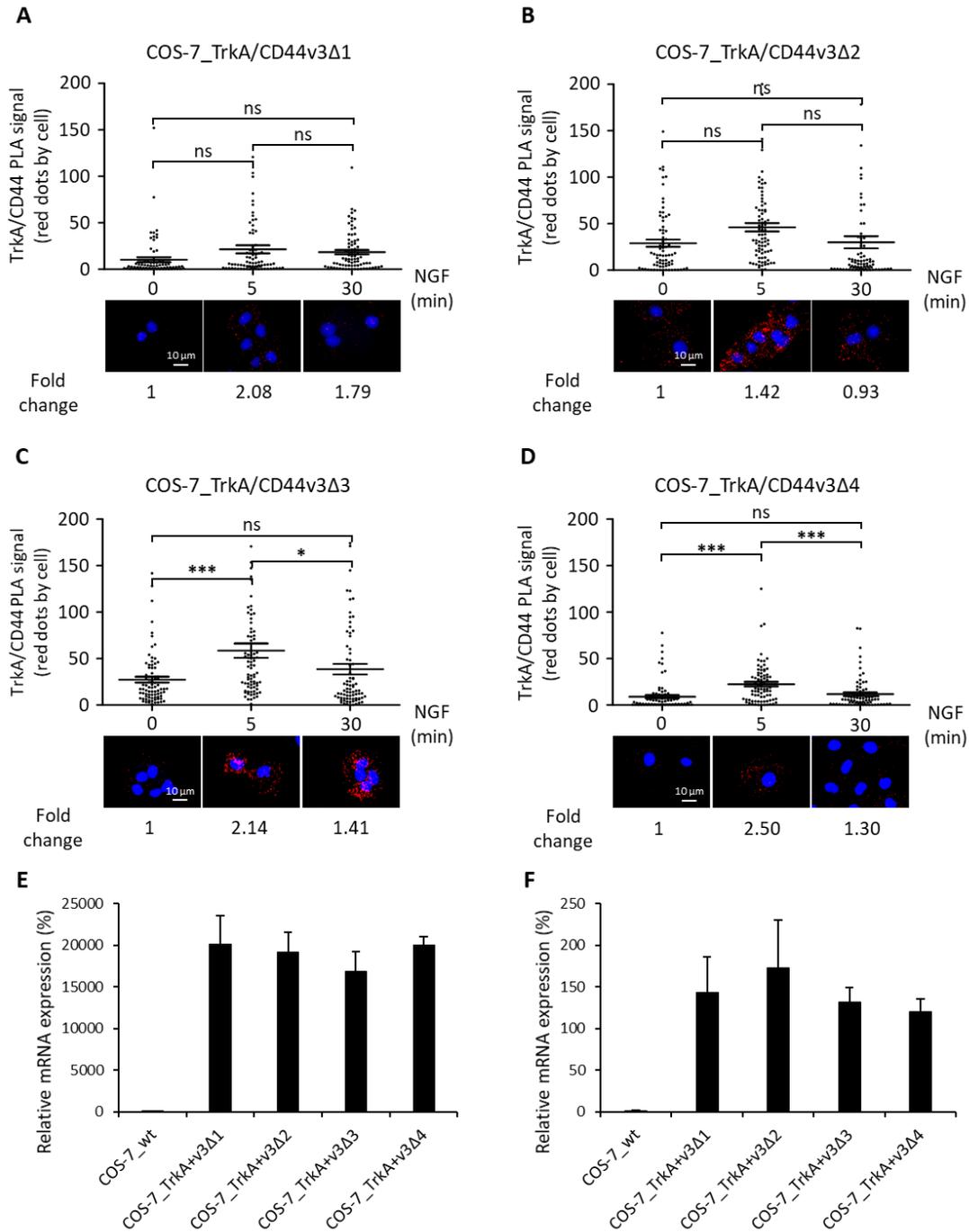


Figure 48 : Détermination des zones de CD44v3 impliquées dans l'interaction avec TrkA sous stimulation au NGF

Les cellules COS-7 ont été transfectées par électroporation avec les plasmides *pdisplay_HA-TrkA* et *pcDNA3.1/Hygro_CD44v3Δ1, Δ2, Δ3* ou *Δ4*. Elles ont ensuite été sévées pendant 24h puis traitées au NGF (16nM) à différents temps (0, 5 ou 30 min). L'association TrkA/CD44 a ensuite été visualisée par PLA dans les cellules COS-7_TrkA/CD44v3Δ1 (A), COS-7_TrkA/CD44v3Δ2 (B), COS-7_TrkA/CD44v3Δ3 (C) et COS-7_TrkA/CD44v3Δ4 (D). Les interactions entre TrkA et CD44 sont visualisées en tant que points rouges. La quantification du nombre de points rouges a été effectuée sur le logiciel Image J. Ces graphes représentent la combinaison de trois expériences indépendantes. Pour la quantification relative (Fold change), le nombre de points PLA dans la condition non stimulée a été considéré comme 1. Les analyses statistiques effectuées sont une ANOVA à un facteur suivie d'un test Bonferroni. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne (SEM). *** $p < 0,001$. (E et F) Quantification des transcrits des gènes *ntrk1* (E) et *CD44* (F) dans les cellules COS-7 transfectées. Moyenne \pm SD.

RÉSULTATS

2. Effets des peptides sur la signalisation pro-tumorale du NGF dans les cellules cancéreuses mammaires

Nous avons tout d'abord procédé à des expériences de PLA dans les cellules MDA-MB-231 en présence ou non des peptides (Figure 49). Les résultats montrent que les peptides 1 et 4 bloquent tous les deux l'augmentation du nombre de complexes dans les cellules MDA-MB-231 (Figure 49.B et C). Cependant, on observe que le peptide 1 semble diminuer plus efficacement le nombre de complexes que le peptide 4. La combinaison des deux peptides diminue légèrement la quantité de complexes TrkA/CD44 dans l'ensemble des conditions et inhibe la stimulation au NGF (Figure 49.A et D). De façon surprenante, le nombre de complexes observés dans ces expériences est largement moins important que dans les expériences menées précédemment dans la même lignée (Figure 42.A et B). Nous estimons que ces changements du nombre de complexes peuvent être dus à des changements dans les tampons utilisés lors de l'expérience de PLA, à des changements dans la culture des cellules (SVF) ou tout simplement à une différence d'affinité des anticorps anti-CD44 et anti-CD44v3.

RÉSULTATS

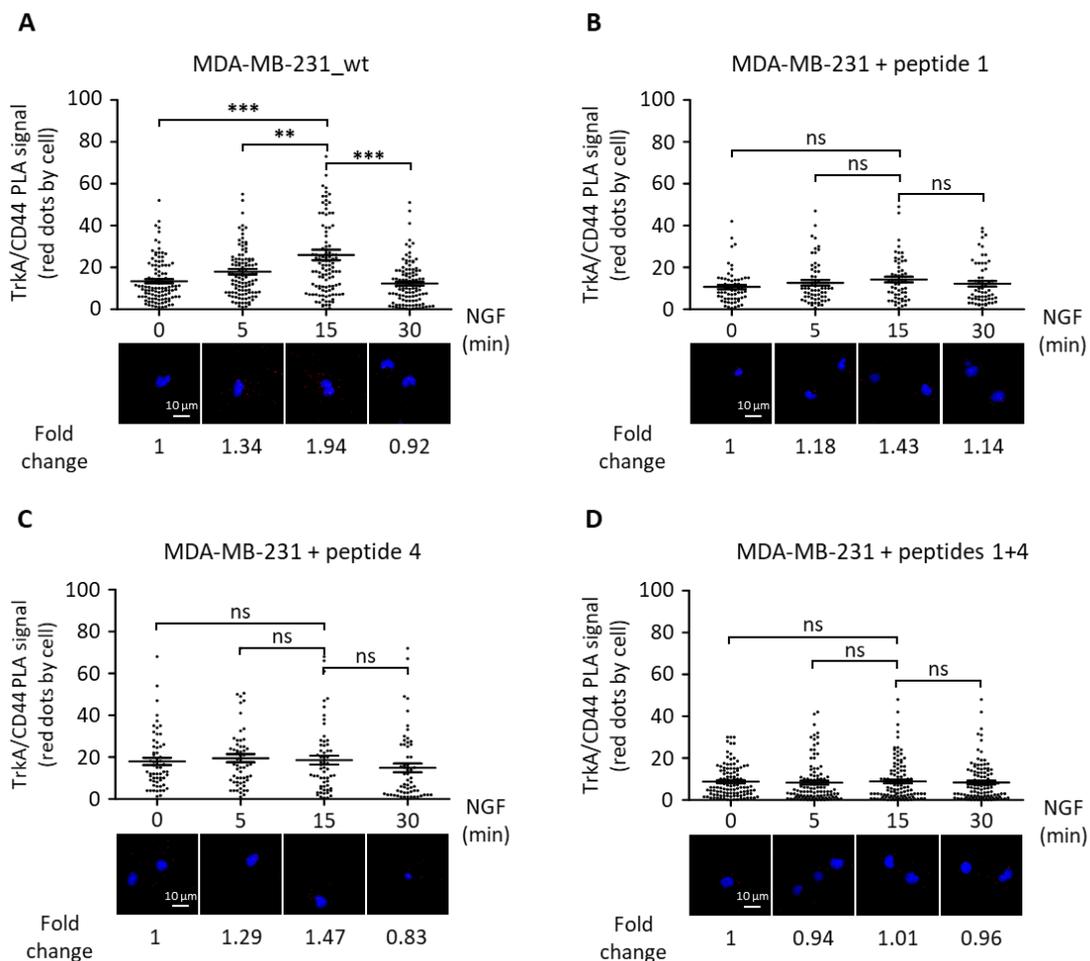


Figure 49 : Effets des peptides 1 et/ou 4 sur la mise en place de l'interaction TrkA/CD44 dans les cellules MDA-MB-231 visualisés par PLA

Les cellules MDA-MB-231 ont été traitées au NGF (16 nM) pendant 0, 5, 15 ou 30 minutes avant que l'interaction TrkA/CD44 ne soit visualisée par PLA (A). Les cellules ont préalablement été traitées avec les peptides 1 (B), 4 (C) ou les deux (D) avant le traitement au NGF. Les interactions entre TrkA et CD44 sont visualisées en tant que points rouges. La quantification du nombre de points rouges a été effectuée sur le logiciel Image J. Ces graphes représentent la combinaison de trois expériences indépendantes. Pour la quantification relative (Fold change), le nombre de points PLA dans la condition non stimulée a été considéré comme 1. Les analyses statistiques effectuées sont une ANOVA à un facteur suivie d'un test Bonferroni. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne (SEM). *** $p < 0,001$.

Les effets des peptides 1 et 4 sur la signalisation pro-tumorale du NGF ont ensuite été testés en tests de clonogénicité. La stimulation des cellules MDA-MB-231 par les peptides, que ce soit le 1 ou le 4, conduit à une diminution de la clonogénicité de ces cellules et abolit les effets positifs du NGF sur la croissance des colonies (Figure 50).

RÉSULTATS

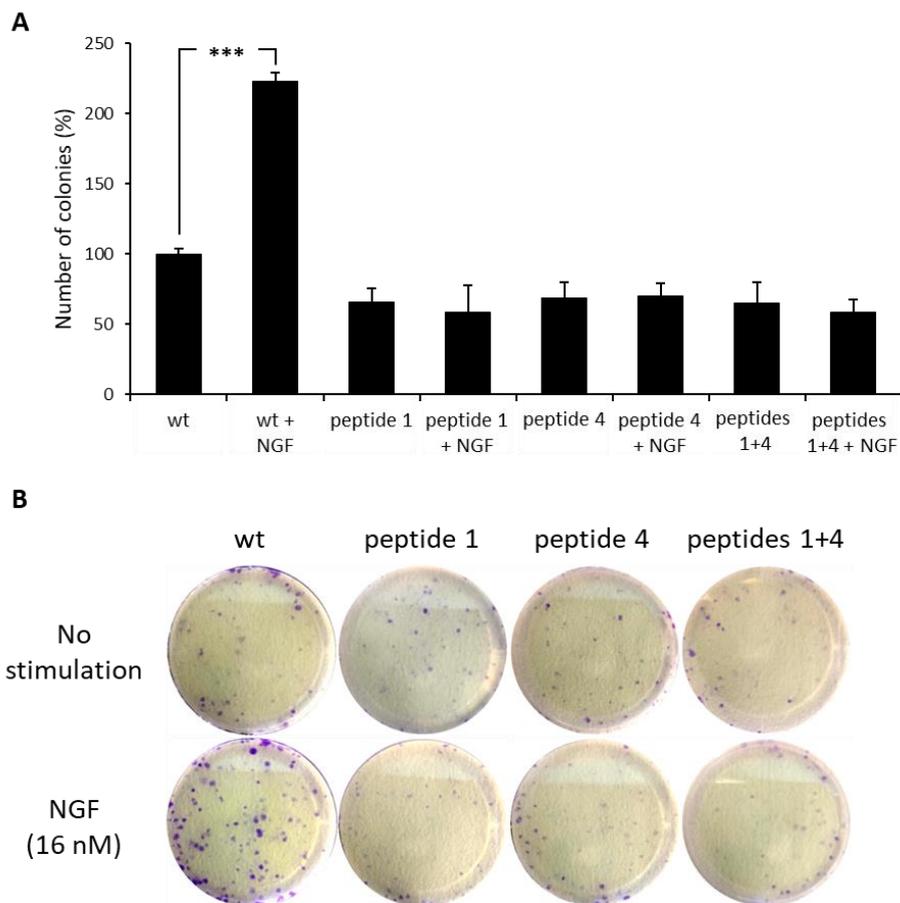


Figure 50 : Les peptides mimétiques 1 et 4 bloquent la croissance tumorale induite par le NGF dans les cellules MDA-MB-231

(A) Quantification du nombre de colonies MDA-MB-231 après stimulation au NGF et stimulations avec les peptides 1 et 4. Seules les colonies contenant plus de 50 cellules sont comptabilisées. La moyenne du nombre de colonies dans la condition non stimulée est considérée comme 100. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne (SEM). Test Mann-Whitney. *** $p < 0,001$. (B) Photos représentatives des résultats obtenus en tests de clonogénicité.

Afin de définir plus précisément les séquences d'interaction, des modélisations informatiques de l'interaction entre le domaine extracellulaire de TrkA (ECD) et la séquence protéique du variant 3 de CD44 ont été entreprises, grâce à une collaboration avec le Dr. Jérôme De Ruyck (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), Université de Lille, France). Les résultats sont également encourageants car ils montrent bien une interaction possible entre TrkA et CD44v3 (Figure 51). De manière intéressante, le nombre d'acides aminés certainement impliqués dans l'interaction est nettement plus élevé dans les domaines 1 et 4 que dans les domaines 2 et 3 (trois fois plus), confirmant ainsi nos précédents résultats.

RÉSULTATS

Ces résultats démontrent que les peptides 1 et 4 bloquent la mise en place de l'interaction TrkA/CD44 ainsi que la signalisation sous-jacente menant à la clonogénicité dans les cellules MDA-MB-231. La modélisation informatique confirme l'importance de ces domaines dans l'interaction avec le domaine extracellulaire de TrkA.

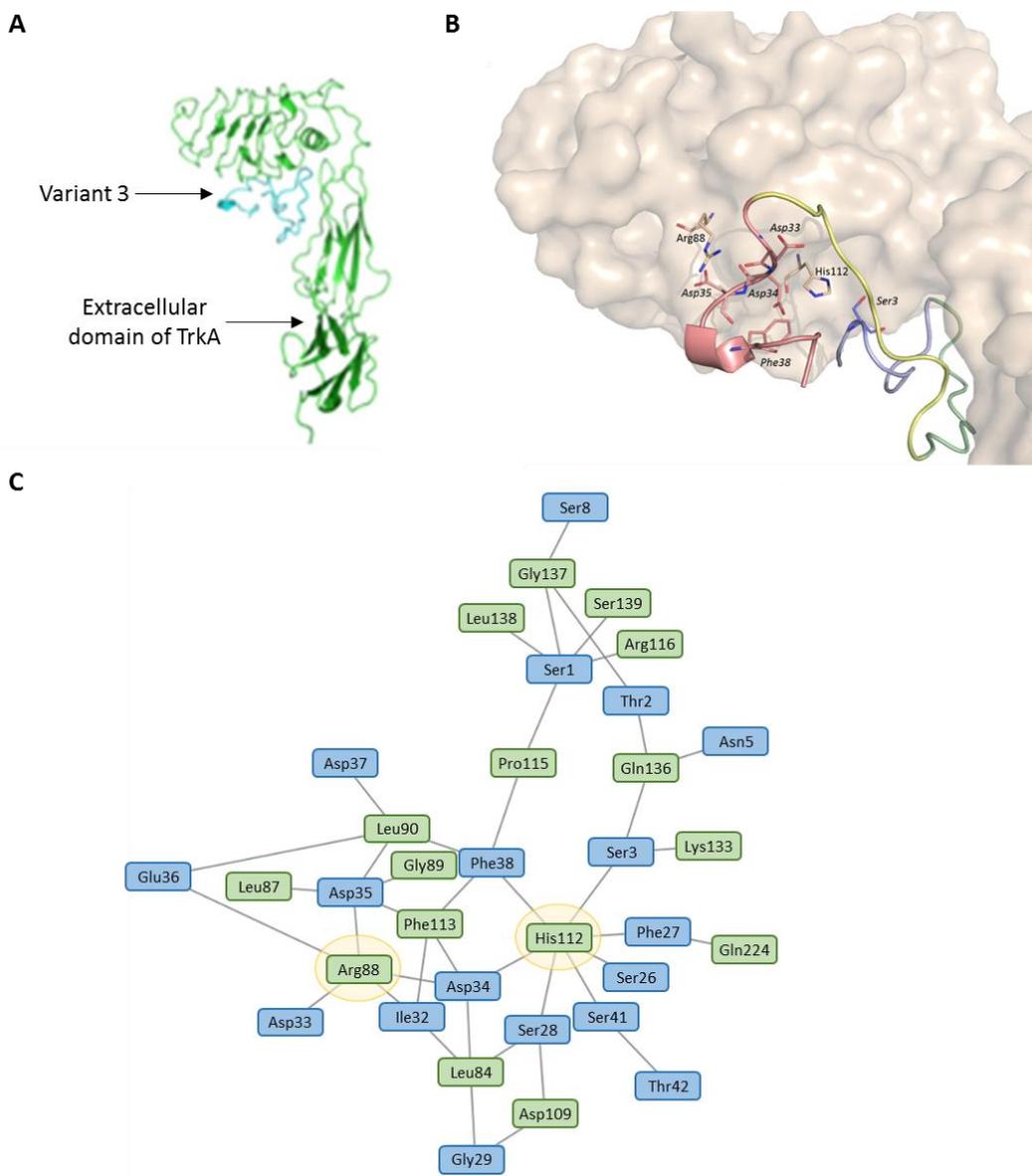


Figure 51 : Modélisation informatique de l'interaction entre le domaine extracellulaire de TrkA et la séquence protéique du variant 3 de CD44

(A) Représentation 3D de l'interaction entre le domaine extracellulaire de TrkA (en vert) et le variant 3 de CD44 (en bleu). (B) Agrandissement de la représentation 3D de l'interaction. Les domaines du variant 3 de CD44 étudiés précédemment sont représentés par différentes couleurs : 1 = bleu, 2 = vert, 3 = jaune et 4 = rouge. (C) Graphique représentant les prédictions d'interactions entre les acides aminés du domaine extracellulaire de TrkA (vert) et ceux du variant 3 de CD44 (bleu). Les acides aminés Arg88 et His112 de TrkA sont au centre des interactions possibles avec les acides aminés de CD44. Les liens représentent des liaisons non covalentes.

II. Plasticité des réseaux de récepteurs membranaires sous stimulation au proNGF dans le cancer du sein : l'interaction Sortiline/TrkA/EphA2

A. Mise en évidence d'un nouveau partenaire de l'interaction sortiline/TrkA : EphA2

1. Détermination des protéines en interaction avec TrkA sous stimulation au proNGF par spectrométrie de masse

Les cellules MDA-MB-231_HA-TrkA ont été stimulées au proNGF (0,5 nM) à différents temps (5 et 30 minutes) puis les protéines purifiées. En utilisant un anticorps spécifique de HA, permettant donc d'isoler le récepteur HA-TrkA ainsi que les différentes protéines en interaction avec ce récepteur, nous avons procédé à des expériences d'immunoprécipitation. Les protéines immunoprécipitées ont été soumises à une migration dans un gel à 10 % de SDS puis mises en évidence par une coloration au bleu de coomassie. Les bandes présentant une plus forte intensité ont alors été découpées puis les protéines purifiées pour une analyse en spectrométrie de masse (Figure 52.A). Une analyse des protéines identifiées, effectuée grâce au logiciel Panther, a permis de mettre en évidence que 7 % de ces protéines étaient impliquées dans la signalisation des récepteurs membranaires (Figure 52.B). Parmi ces protéines, la sortiline a été confirmée comme un partenaire de TrkA sous stimulation au proNGF, comme démontré précédemment par le laboratoire ([Demont et al., 2012](#)) (Figure 52.C). De façon intéressante, le récepteur tyrosine kinase EphA2 a également été identifiée parmi les protéines en interaction avec TrkA (Figure 52.C). Cette protéine est exprimée dans les cellules cancéreuses de sein et participe à l'agressivité tumorale à travers ses rôles dans la croissance cellulaire, l'invasion cellulaire et la formation de métastases ([Song et al., 2017](#); [Zelinski et al., 2001](#)). Différentes protéines de signalisations intracellulaires ont également pu être identifiées (Cf. Article en annexe n°2).

RÉSULTATS

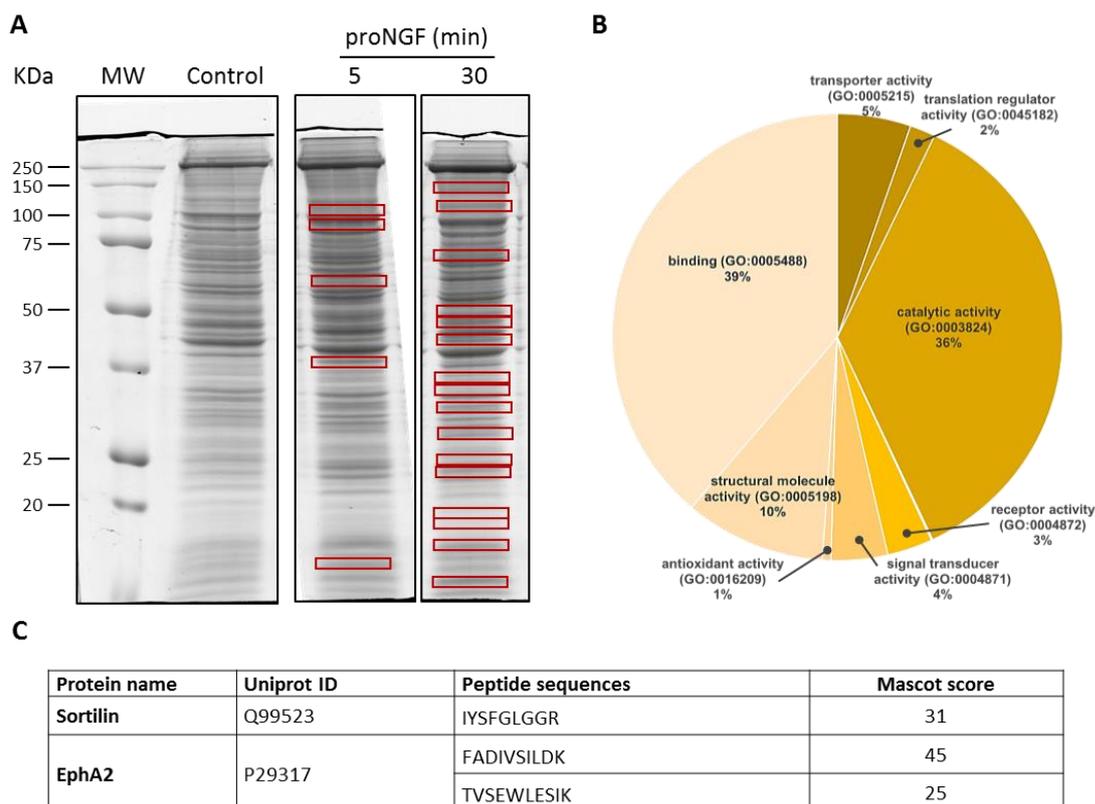


Figure 52 : Identification des protéines en interaction avec le récepteur TrkA sous stimulation au proNGF (0,5 nM) par spectrométrie de masse dans les cellules MDA-MB-231_HA-TrkA

(A) Les cellules MDA-MB-231 ont été stimulées par le proNGF (0,5 nM) à différents temps (0, 5 et 30 min) puis les protéines ont été soumises à une immunoprécipitation en utilisant un anticorps ciblant le peptide HA. Après migration sur un gel SDS 10 %, les protéines ont été mises en évidence par marquage au bleu de coomassie. Les bandes de plus forte intensité par rapport à la condition non stimulée (control) ont été découpées (rectangles rouges) et les protéines purifiées pour analyse au spectromètre de masse. (B) Analyse des protéines identifiées par spectrométrie de masse avec le logiciel Panther. (C) Résultats de l'identification par spectrométrie de masse pour les récepteurs sortiline et EphA2. Les codes Uniprot ID, les séquences des peptides ayant permis l'identification et les Mascot score de chaque peptide sont mentionnés. MW : Molecular Weight ; GO : Gene Ontology.

2. Analyse de la mise en place de l'interaction sortiline/TrkA/EphA2 dans les cellules MDA-MB-231_HA-TrkA

Afin de confirmer ces résultats, des expériences d'immunoprécipitation ciblant à la fois TrkA, EphA2 et la sortiline ont été effectuées dans les cellules MDA-MB-231_HA-TrkA après une stimulation au proNGF (0,5 nM). Les résultats ont montré que le proNGF était nécessaire à l'interaction entre ces complexes (Figure 53). De manière intéressante, une stimulation au NGF ne permet la formation de complexes entre ces trois récepteurs (Figure 53.A). Cependant, une association entre TrkA et la sortiline est observée après 30 minutes de stimulation au NGF, suggérant une participation à l'endocytose de TrkA pour la sortiline, comme reporté dans la

RÉSULTATS

littérature (Nykjaer *et al.*, 2004). Ces résultats ont été confirmés dans les cellules MDA-MB-231_HA-TrkA par des expériences de PLA (Figure 53.B, C, D, E et F). En effet, une augmentation significative du nombre de complexes TrkA/EphA2 (Figure 53. B et C) et sortiline/TrkA (Figure 53.D et E) est observée après 5 minutes de stimulation au proNGF. En revanche, aucun signal n'a été détecté pour l'interaction sortiline/EphA2 (Figure 53.F). Cette dernière observation pourrait être expliquée par une interaction non directe entre les deux récepteurs.

Après traitement à la neurotensine, un inhibiteur de la fixation du proNGF à la sortiline, des expériences de western blot ont montré que TrkA n'était plus capable de s'associer à EphA2, démontrant la nécessité de la fixation du proNGF à la sortiline pour la mise en place du complexe (Figure 54.A). Après transfection de si-TrkA, aucune interaction entre la sortiline et EphA2 n'a été détectée par immunoprécipitation, confirmant que la sortiline ne peut former un complexe avec le récepteur EphA2 en absence de TrkA (Figure 54.B). L'expression d'une forme mutée d'HA-TrkA_kinase dead ne pouvant pas être phosphorylée a également permis de montrer que la phosphorylation de TrkA n'était pas nécessaire à la formation du complexe ternaire (Figure 54.C).

De plus, grâce à l'utilisation d'un si-ARN dirigé contre EphA2, nous avons pu démontrer que la présence de ce récepteur n'était pas requise pour la formation du complexe sortiline/TrkA sous stimulation au NGF (Figure 54.D). Nous avons également pu démontrer, grâce aux mêmes outils, que l'activation sous-jacente de la kinase Src était dépendante de la présence d'EphA2 (Figure 54.E et F).

L'ensemble de ces résultats montrent que la stimulation au proNGF des cellules MDA-MB-231 induit la formation du complexe ternaire sortiline/TrkA/EphA2, conduisant à l'activation des voies de signalisation Akt et Src.

RÉSULTATS

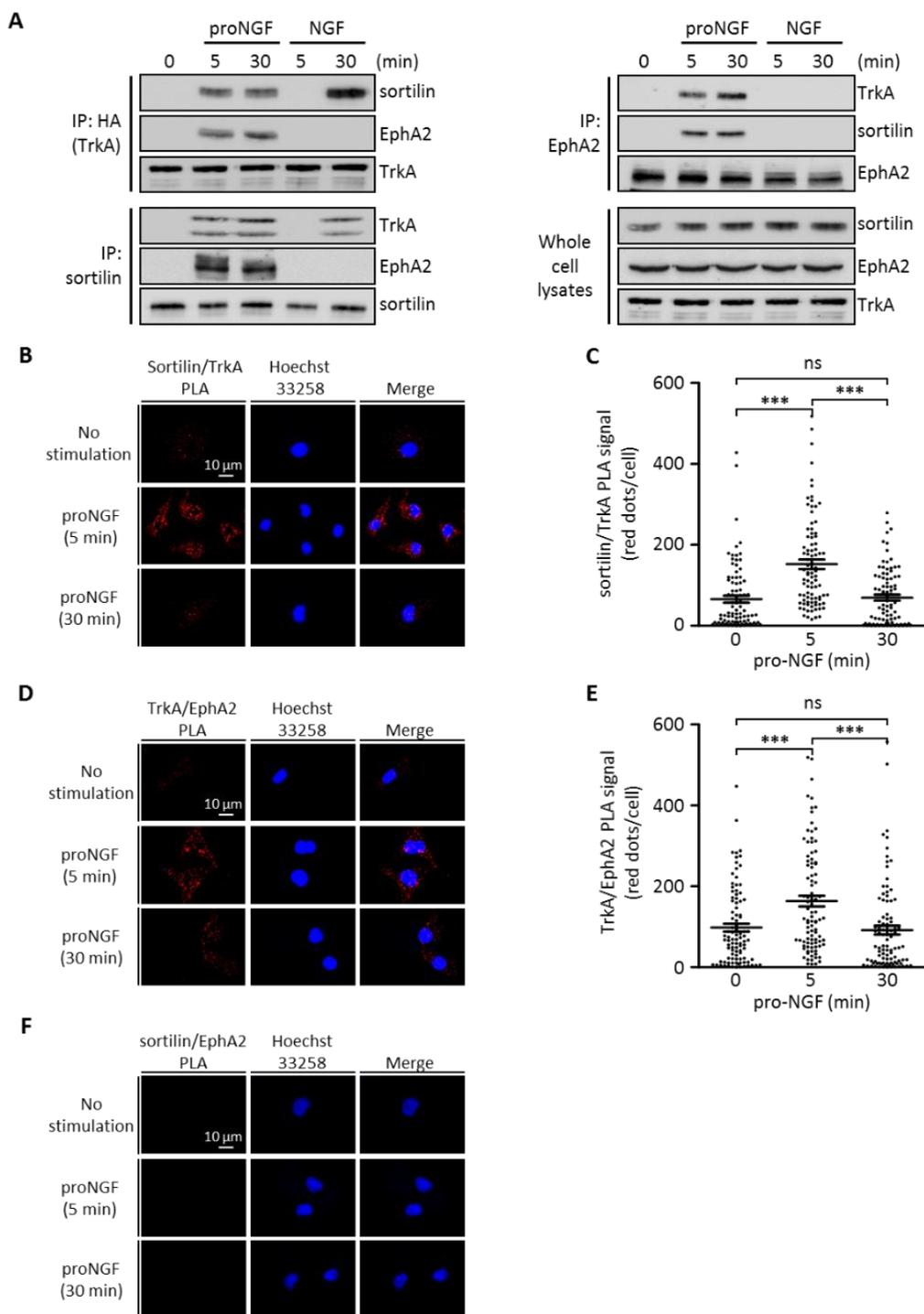


Figure 53 : La stimulation au proNGF conduit à la mise en place d'une interaction ternaire entre la sortiline, TrkA et EphA2 dans la lignée MDA-MB-231_HA-TrkA

Les cellules MDA-MB-231_HA-TrkA ont été stimulées au proNGF (0,5 nM) à différents temps (0, 5 et 30 min). (A) Immunoblots ciblant la sortiline, TrkA ou EphA2 après des immunoprécipitations ciblant HA (TrkA), la sortiline ou EphA2. (B-F) Photos représentatives (B, D et F) et quantifications (C et E) des signaux PLA sortiline/TrkA (B et C), TrkA/EphA2 (D et E) et sortiline/EphA2 (F). La quantification du signal PLA a été effectuée sur trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent le SEM. Les analyses statistiques effectuées sont des ANOVA à un facteur suivi d'un test Bonferroni. *** $p < 0,001$.

RÉSULTATS

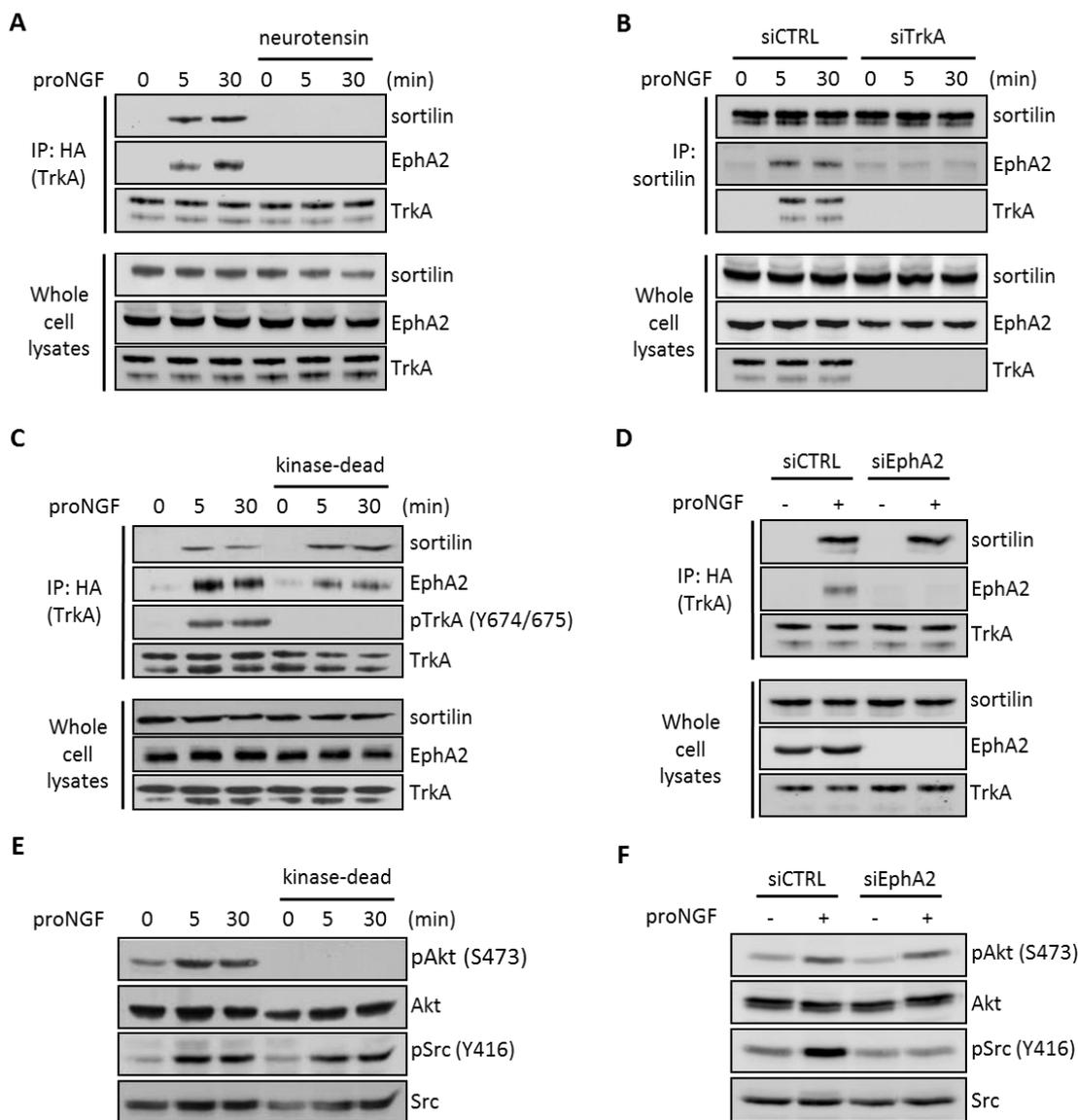


Figure 54 : Le complexe sortiline/TrkA/EphA2 induit par le proNGF met en place une voie de signalisation indépendante de la phosphorylation de TrkA

Les cellules MDA-MB-231_HA-TrkA ou _kinase-dead ont été stimulées au proNGF (0,5 nM) à différents temps (0, 5 et 30 min). (A-D) Immunoblots ciblant la sortiline, TrkA ou EphA2 après des immunoprécipitations ciblant HA (TrkA) ou la sortiline après traitement à la neurotensine (1 μ M) (A), transfection d'un si-TrkA (B), dans les cellules MDA-MB-231_kinase-dead (C) et après transfection d'un si-EphA2 (D). Dans (C), la phosphorylation de TrkA des tyrosines 674/675 a également été évaluée par immunoblot. (E et F) Immunoblots ciblant les protéines Akt et Src ainsi que leurs formes phosphorylées dans des cellules MDA-MB-231_HA-TrkA et _kinase-dead (E) ainsi qu'après transfection d'un si-EphA2 (F).

RÉSULTATS

3. Analyse de l'interaction sortiline/TrkA/EphA2 dans les différents sous-types moléculaires de cancer du sein

a. Niveaux d'expression de la sortiline, d'EphA2 et d'Ephrin-A1

Pour tenter de mieux comprendre la mise en place du complexe, nous avons analysé les niveaux d'expression de différentes protéines pouvant jouer un rôle dans l'établissement du complexe. Nous avons choisi deux lignées triple-négatives (MDA-MB-231 et SUM159-PT), deux lignées luminales (MCF-7 et T-47D) ainsi qu'une lignée HER2+ (HCC-1954). Ainsi, nous avons analysé les taux d'ARNm des gènes *NTR3*, *EPHA2* et *EFNA1* (Figure 55.A, C et E respectivement). Le gène *EFNA1* code pour le ligand principal d'EphA2 : Ephrin-A1. Ces résultats ont ensuite été confirmés par l'analyse des niveaux de protéines correspondantes par western blot (Figure 55.B, D et F respectivement). Les résultats ont montré une forte expression d'EphA2 dans les deux lignées triple-négatives. Les lignées luminales présentent les plus faibles taux d'expression d'EphA2. Concernant le ligand principal d'EphA2, ce sont les lignées luminales qui présentent le plus haut taux d'expression. Ces résultats sont en accord avec la littérature car les taux d'expression d'EphA2 et de son ligand Ephrin-A1 sont inversement corrélés (Macrae *et al.*, 2005). Enfin, la sortiline est exprimée majoritairement par les lignées luminales et, de manière surprenante, la lignée SUM159-PT présente un faible taux d'expression de cette protéine.

RÉSULTATS

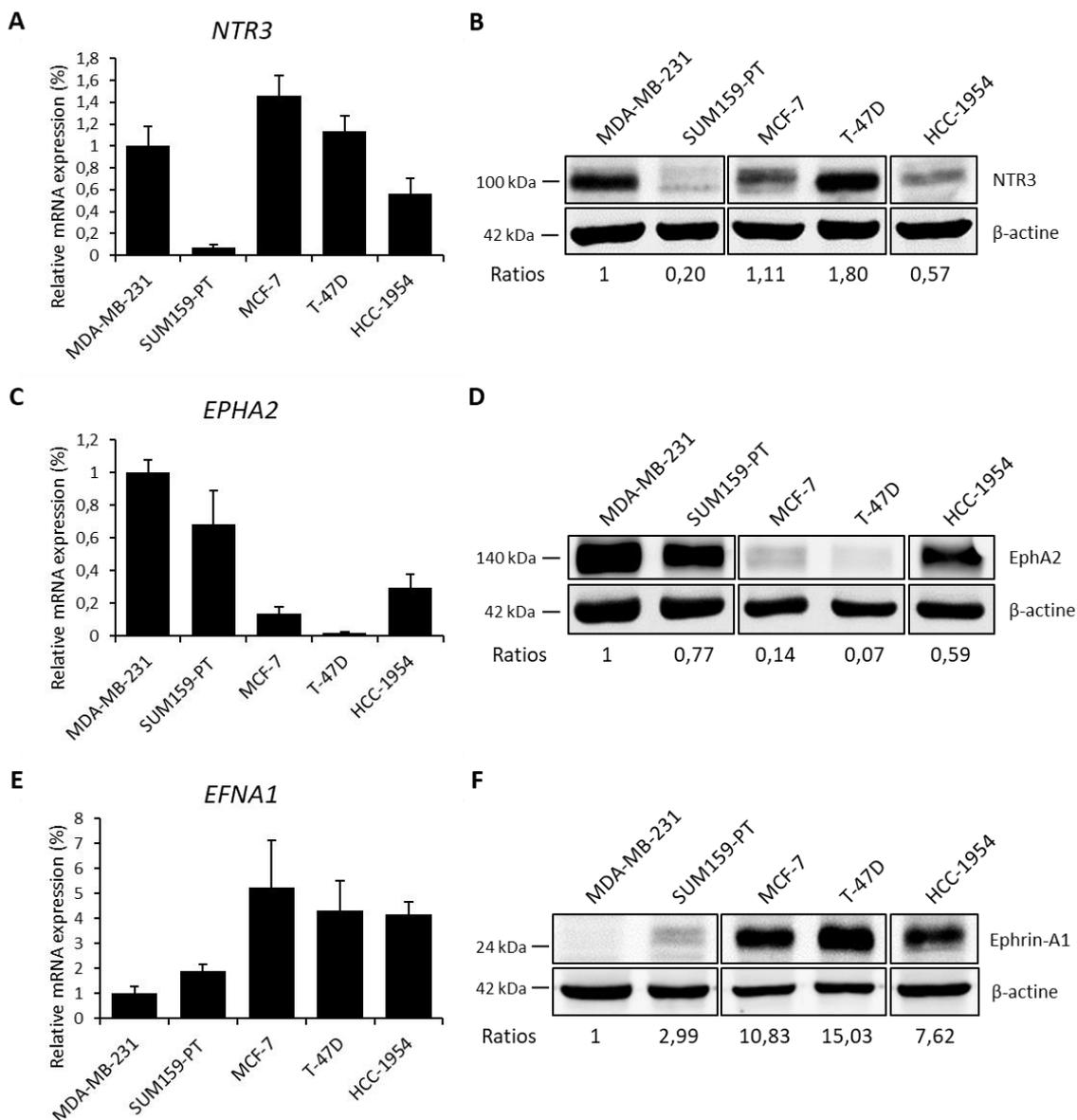


Figure 55 : Analyse des niveaux d'expression de la sortiline (NTR3), d'EphA2 et d'Ephrin-A1

A gauche : Niveaux d'expression relatifs des transcrits des gènes NTR3 (A), EPHA2 (B) et EFNA1 (C) par qPCR dans différentes lignées cancéreuses mammaires. L'expression des ARNm dans la lignée MDA-MB-231 est considérée comme 1. Les résultats sont les moyennes de trois expériences indépendantes \pm SD. A droite : Immunoblots des protéines NTR3 (B), EphA2 (B) et Ephrin-A1 (C) dans différentes lignées cancéreuses mammaires. La quantification a été effectuée par calcul des densités optiques de chaque bande à l'aide du logiciel Multi-Gauge. Le taux protéique de la lignée MDA-MB-231 est considéré comme 1 pour la quantification relative. La protéine β -actine a été utilisée comme contrôle de charge. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

RÉSULTATS

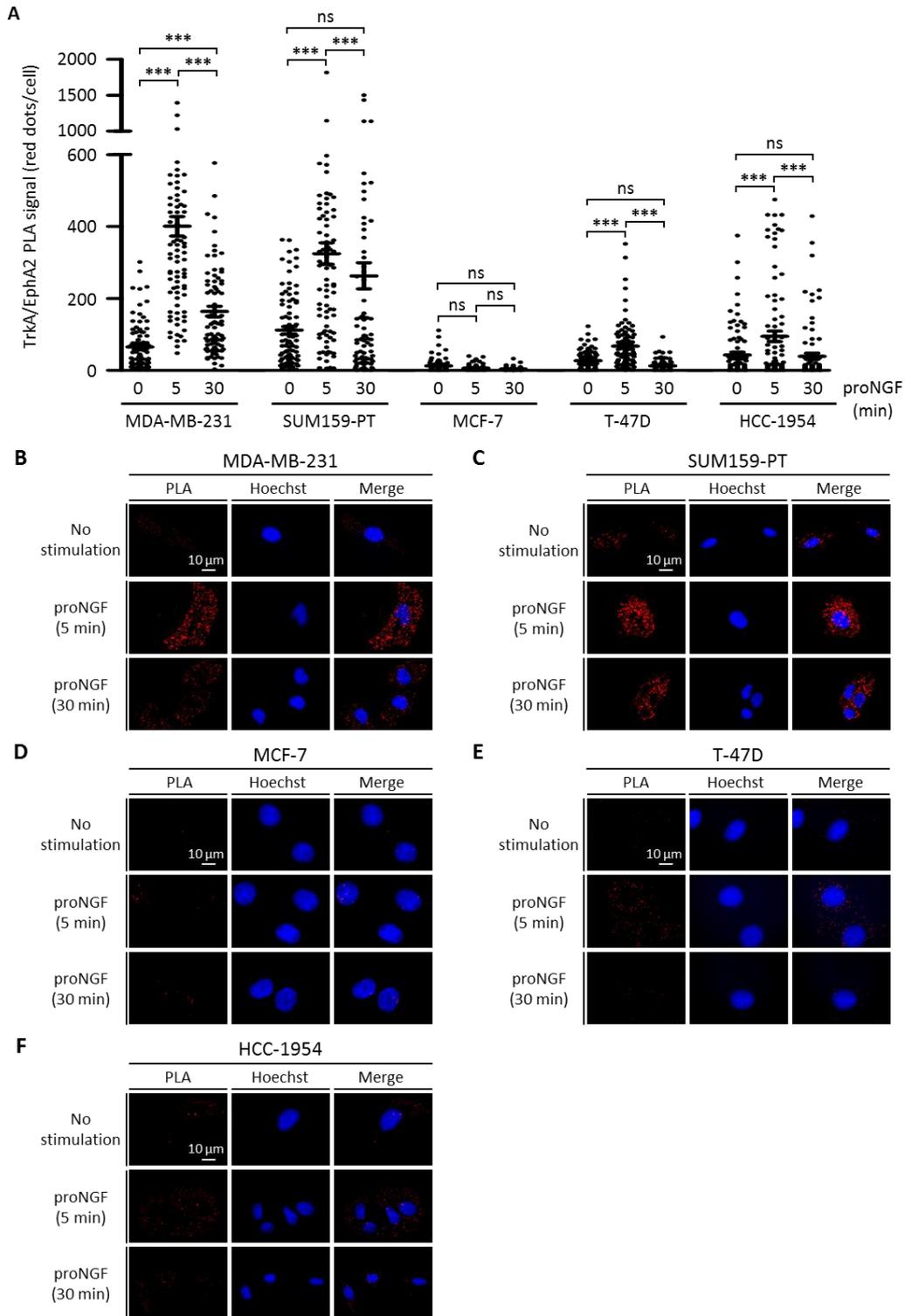


Figure 56 : Mise en évidence de l'interaction TrkA/EphA2 dans différentes lignées cancéreuses mammaires par PLA

(A) Quantification du nombre de complexes TrkA/EphA2 détectés par PLA dans différentes lignées cancéreuses mammaires. La quantification est effectuée sur 90 champs différents grâce au logiciel Image J. Le nombre de points par cellule est estimé en fonction du nombre de noyaux détectés dans chaque champ. Les résultats sont ensuite soumis à un test statistique ANOVA à un facteur suivi d'un test Bonferroni avec le logiciel Prism. *** $p < 0,001$; ns : non significatif.

(B – F) Photos représentatives des différentes conditions.

RÉSULTATS

b. Mise en évidence de l'interaction TrkA/EphA2 dans les différents sous-types moléculaires de cancer du sein

Grâce à des expériences de PLA, nous avons pu mettre en évidence l'existence du complexe TrkA/EphA2 dans les cinq lignées cancéreuses mammaires. En effet, un signal PLA est détecté dans l'ensemble des lignées à un niveau basal, en absence de stimulation au proNGF (Figure 56). Cependant, le nombre de complexes est plus important dans les lignées MDA-MB-231 et SUM159-PT. On observe une augmentation du nombre de complexes TrkA/EphA2 dans l'ensemble des lignées cancéreuses mammaires étudiées après 5 min de stimulation au proNGF exceptée la lignée MCF-7. Suite à cette augmentation, le nombre de complexes diminue à 30 min de stimulation au proNGF. La lignée MCF-7 est la seule lignée dans laquelle nous avons détecté un très faible signal PLA TrkA/EphA2. Ces résultats pourraient être expliqués par les taux d'expression des protéines en jeu pour la mise en place de l'interaction dans cette lignée. En effet, la lignée MCF-7 présente une faible expression de la protéine EphA2 (Figure 55.D) ainsi que de la protéine TrkA (Figure 36.H). De plus, elle présente une expression moyenne de la sortiline par rapport aux autres lignées cellulaires (Figure 55.B). On peut alors imaginer que la balance des niveaux d'expression de ces protéines, nécessaire à la mise en place de l'interaction, n'est pas adéquate dans cette lignée particulière.

B. Implications fonctionelles du complexe sortiline/TrkA/EphA2 dans la signalisation protumorale du proNGF

1. Importance du récepteur EphA2 dans la signalisation pro-tumorale du proNGF dans les cellules cancéreuses mammaires

A l'aide de si-ARNs ciblant la protéine EphA2, nous avons testé l'importance de ce récepteur dans la signalisation protumorale du proNGF dans les cellules cancéreuses mammaires. Pour cela, les cellules ont été transfectées par méthode Interferine (lipofection) avec un si-EphA2 puisensemencées pour des tests de clonogénicité. Les résultats de ces tests ont montré que chaque lignée voit sa clonogénicité augmenter de manière significative suite à une stimulation au proNGF (Figure 57).

RÉSULTATS

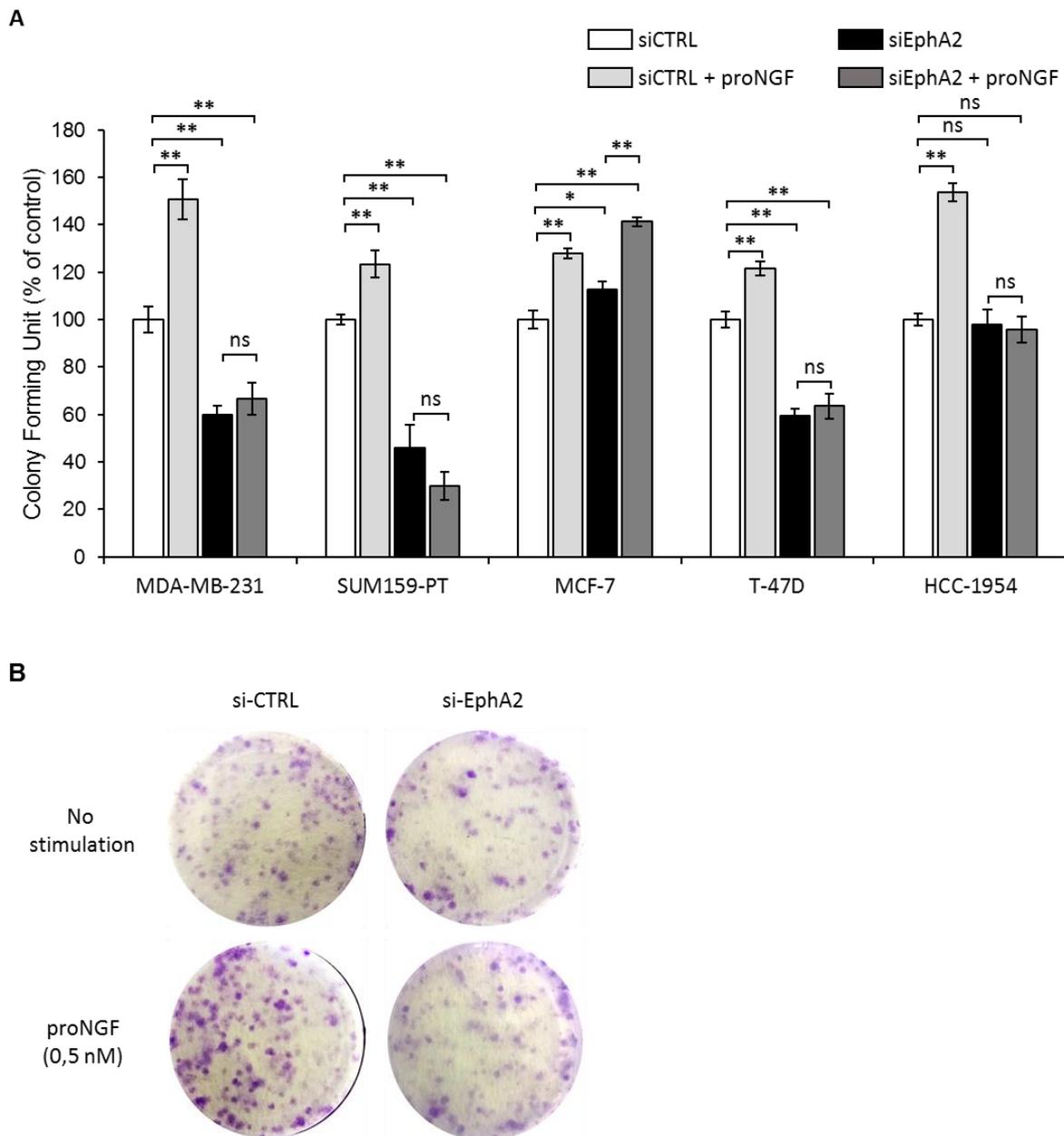


Figure 57 : Evaluation de l'implication d'EphA2 dans la croissance des lignées cancéreuses mammaires par tests de clonogénicité

(A) Après transfection d'un si-CTRL ou d'un si-EphA2, les cellules ont été ensemencées à faible densité dans des plaques 6 puits en présence de milieu + 2 % SVF. Après 10 jours d'incubation à 37°C, les cellules sont fixées puis les colonies marquées au crystal violet. Seules les colonies contenant plus de 50 cellules sont comptabilisées à l'œil nu. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques effectuées sont des tests non paramétriques de Mann-Whitney \pm SEM. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns : non significatif. (B) Photos représentatives des tests de clonogénicité effectuées dans la lignée MDA-MB-231.

La transfection du si-EphA2 n'a en revanche pas les mêmes conséquences sur la biologie de chacune des lignées cancéreuses mammaires. En effet, les lignées MDA-MB-231,

RÉSULTATS

SUM159-PT et T-47D subissent une diminution significative du nombre de colonies que ce soit en présence ou en absence de stimulation au proNGF, suggérant un rôle d'EphA2 dans la clonogénicité des cellules cancéreuses mammaires, indépendamment de la signalisation du pro-NGF. Cependant, l'effet du proNGF est aboli, ce qui démontre l'importance de la protéine EphA2 dans la signalisation du proNGF. Cette inhibition de l'effet positif du proNGF est également retrouvée dans la lignée HCC-1954 dans laquelle on retrouve un nombre de colonies similaire à celui retrouvé dans la condition contrôle sans stimulation au proNGF. Enfin, la transfection d'un si-EphA2 dans la lignée MCF-7 a pour conséquence une augmentation significative du nombre de colonies que ce soit en absence ou en présence de proNGF. Ceci suggère que le récepteur EphA2 ne participe pas à la signalisation du proNGF dans cette lignée, ce qui semble en accord avec les résultats de PLA dans lesquelles l'interaction TrkA/EphA2 n'avait pas été détectée. Au contraire, ces résultats suggèrent que la protéine EphA2 aurait un rôle protecteur des effets pro-tumoraux du proNGF. Ces résultats ont été confirmés grâce à l'utilisation d'un autre si-EphA2 (Song *et al.*, 2017).

L'ensemble des résultats obtenus dans les lignées cancéreuses mammaires confirment l'existence de l'interaction sortiline/TrkA/EphA2 dans les lignées cancéreuses mammaires et soulignent la participation importante du récepteur EphA2 dans les effets pro-tumoraux du proNGF dans certaines lignées.

2. Mise en évidence de l'importance du complexe *in vivo* et ciblage thérapeutique du complexe

Afin d'évaluer l'importance clinique du complexe sortiline/TrkA/EphA2 dans le cancer du sein, nous avons procédé à des marquages immunohistochimiques simples des protéines TrkA et EphA2 ainsi qu'au marquage PLA du complexe TrkA/EphA2 dans une cohorte d'échantillons tumoraux en tissu microarray (TMA) (Figure 58). Les résultats ont montré une corrélation de l'expression de TrkA avec le profil métastatique des tumeurs PR-négatives. De manière intéressante, aucun des marquages simples n'a pu être corrélé avec la survie des patientes mais plutôt le marquage PLA TrkA/EphA2. En effet, la présence importante du complexe dans les échantillons est corrélée avec une diminution significative de la survie globale des patientes et ce, quel que soit le sous-type moléculaire de cancer du sein.

RÉSULTATS

Ces résultats suggèrent l'importance du complexe comme cible thérapeutique potentielle dans le traitement du cancer du sein.

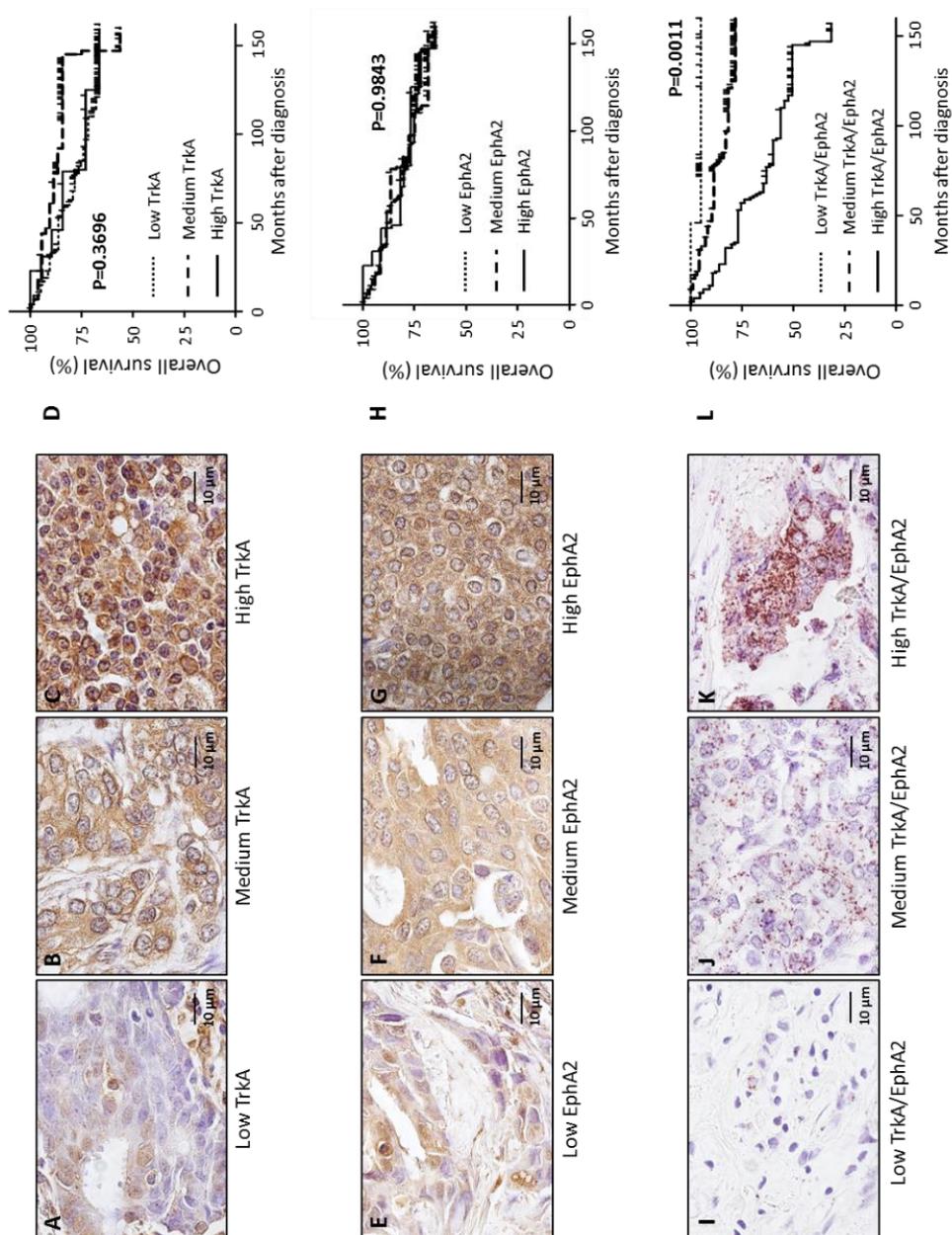


Figure 58 : La présence du complexe TrkA/EphA2 est associé avec une diminution de la survie globale (OS) chez les patientes atteintes d'un cancer du sein

(A-C) Photos représentatives d'immunomarquages de TrkA dans des échantillons de cancers du sein, définis comme faible (A), moyen (B) et fort (C). (D) Graphique de Kaplan-Meier représentant la survie globale de patientes atteintes d'un cancer du sein par rapport à l'immunomarquage de TrkA. (E-G) Photos représentatives d'immunomarquages d'EphA2 dans des échantillons de cancers du sein, définis comme faible (E), moyen (F) et fort (G). (H) Graphique de Kaplan-Meier représentant la survie globale de patientes atteintes d'un cancer du sein par rapport à l'immunomarquage d'EphA2. (I-K) Photos représentatives de marquages PLA TrkA/EphA2 dans des échantillons de cancers du sein, définis comme faible (I), moyen (J) et fort (K). (L) Graphique de Kaplan-Meier représentant la survie globale de patientes atteintes d'un cancer du sein par rapport au marquage PLA TrkA/EphA2. Tests log-rank effectués avec le logiciel Prism.

RÉSULTATS

Nous avons ensuite envisagé la possibilité d'un ciblage combiné des récepteurs TrkA et EphA2 pour inhiber la croissance tumorale mammaire. Ainsi, nous avons tout d'abord testé ce ciblage combiné sur la formation de colonies en soumettant les cellules MDA-MB-231 à un traitement au K252A (10 nM) et/ou à un traitement au si-EphA2 (Figure 59.A-C). Les résultats montrent un effet synergique des traitements en combinaison pour atteindre une diminution de 30 % du nombre de colonies dans ces cellules. Nous avons complété ces résultats par des expériences de xénogreffes en souris immunodéficientes qui ont été soumises à des traitements ciblant TrkA (CEP-701), EphA2 (si-EphA2) ou les deux. Les résultats montrent que, malgré une tendance à la diminution, le ciblage de TrkA ne conduit pas une diminution significative de la taille des tumeurs en souris SCID, confirmant les informations de la littérature et l'existence de mécanismes de résistance au sein des tumeurs mammaires. En revanche, l'introduction d'un si-EphA2 dans les souris conduit à la diminution significative de la taille des tumeurs. **De manière intéressante, l'utilisation combinée du CEP-701 et du si-EphA2 mène à une forte diminution de la taille des tumeurs mammaires dans les souris SCID, soulignant l'intérêt thérapeutique d'un ciblage combiné des deux récepteurs.**

Pour aller plus loin, nous avons également testé l'intérêt d'un ciblage combiné sur le processus métastatique des cellules cancéreuses mammaires. Pour cela, les cellules cancéreuses mammaires ont été injectées en souris SCID et ces souris ont été sacrifiées après une période prolongée afin de laisser les cellules se disséminer dans les différents organes. Après sacrifices des souris, différents organes (poumon, foie et cerveau) sont récupérés, broyés et analysés. La détection des métastases est effectuée par analyse des taux de β 2-microglobuline dans les broyats par qPCR. Nous avons ainsi montré que les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 forment des métastases dans l'ensemble des trois organes étudiés en absence de traitements. Aucun des traitements, qu'ils soient seuls ou en combinaison, ne permet de diminution des métastases aux poumons (Figure 59.D). Un traitement au si-TrkA permet une diminution du nombre de métastases présentes dans le foie (4/10). Un traitement combiné ciblant à la fois TrkA et EphA2 permet une diminution du nombre de métastases dans le foie mais aussi dans le cerveau, ce que des traitements seuls ne permettaient pas. **Ainsi, un ciblage combiné des récepteurs TrkA et EphA2 semble être une option thérapeutique envisageable pour le traitement des cancers du sein et pourrait s'avérer particulièrement avantageux pour contrer le processus métastatique.**

RÉSULTATS

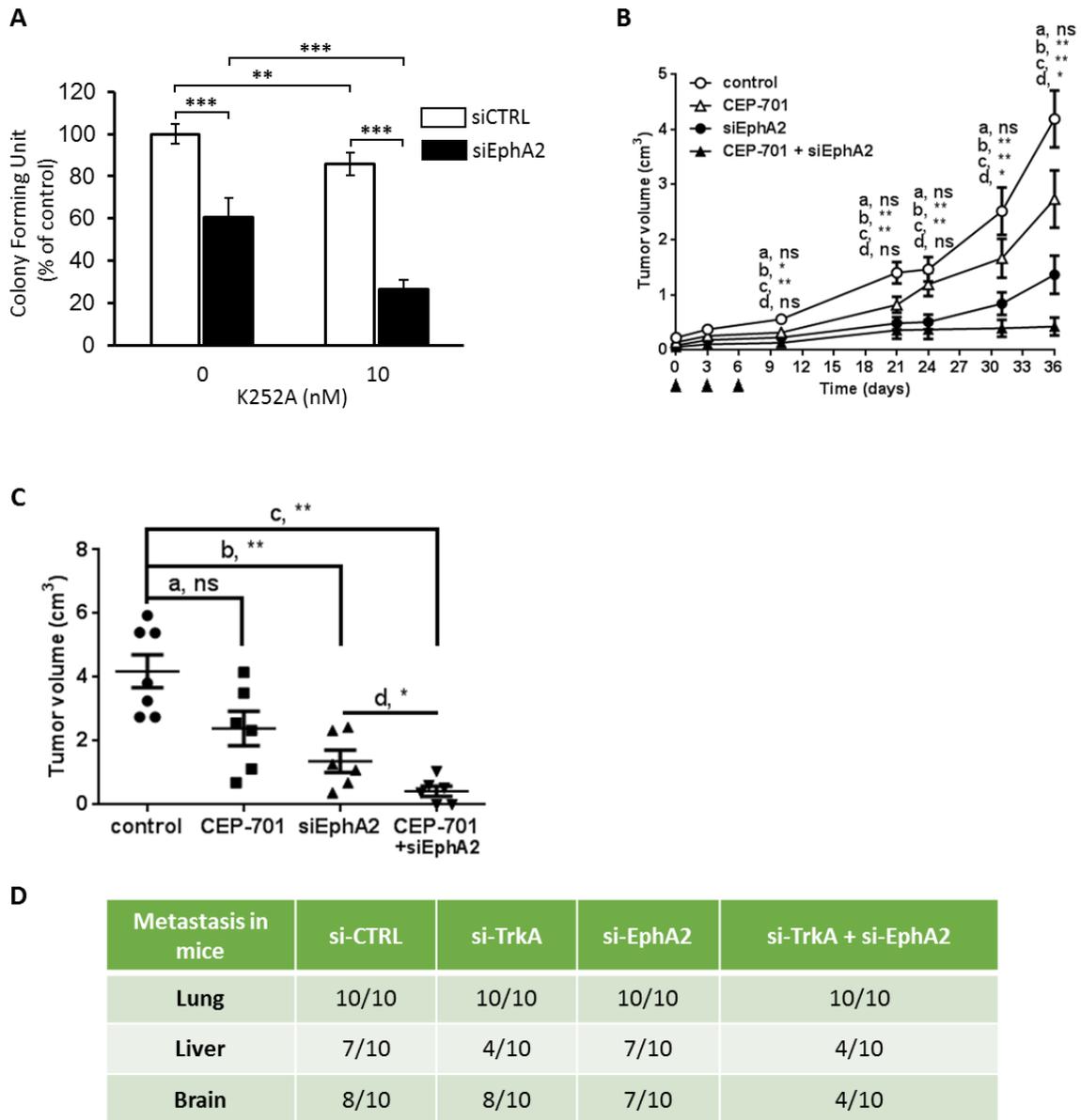


Figure 59 : Un traitement combiné ciblant à la fois TrkA et EphA2 diminue la croissance tumorale et la formation de métastases

(A) Test de clonogénicité dans des cellules MDA-MB-231 transfectées avec un si-CTRL ou un si-EphA2 en présence ou non de K252A (10 nM). Seules les colonies présentant plus de 50 cellules ont été comptabilisées, à l'œil nu. Le nombre de colonies présentes dans la condition si-CTRL non stimulée au K252A est considéré comme 100. Test Mann-Whitney \pm SEM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$. (B-C) Croissance tumorale de xénogreffes de MDA-MB-231 en souris SCID soumises à trois injections (tous les 3 jours, flèches noires) d'un si-CTRL, d'un si-EphA2 ou de CEP-701 (10 mg/kg) seuls ou en combinaison. Le volume tumoral a été mesuré à différents intervalles (B). Les dernières mesures sont représentées par un graphique en nuage de points (C). (D) Détection de métastases de cancer du sein dans des souris SCID xénogreffées avec des cellules MDA-MB-231. Les souris ont été soumises à 5 injections (tous les 3 jours) d'un si-CTRL, d'un si-TrkA, d'un si-EphA2 ou d'une combinaison de si-TrkA et si-EphA2. Les métastases ont été détectées par détection de β 2-microglobuline dans les différents organes (poumon, foie et cerveau) par RT-qPCR.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de mieux caractériser les signalisations associées au récepteur TrkA dans le cancer du sein. Dans un premier temps, mes travaux ont contribué à affiner notre compréhension de l'interaction TrkA/CD44 mise en place sous stimulation au NGF. En effet, notre laboratoire avait mis en évidence cette nouvelle interaction entre les récepteurs membranaires en étudiant l'interactome de TrkA, sous stimulation au NGF, par une analyse en spectrométrie de masse puis l'avait confirmé par des analyses protéomiques en utilisant un anticorps spécifique du récepteur CD44 (Aubert *et al.*, 2015). Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis d'identifier que les isoformes de CD44 contenant l'exon variant 3 sont spécifiquement impliquées dans cette interaction. Suite à cette découverte, nous avons cherché à cribler les domaines du variant 3 nécessaires à l'interaction avec TrkA et nous avons mis en évidence l'implication de deux zones. Cela nous a permis de tester l'impact de deux peptides mimétiques basés sur ces séquences dans la croissance tumorale des cellules cancéreuses mammaires. Bien que préliminaires, ces résultats ont montré des effets encourageants des peptides pour inhiber la croissance des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* et ouvrent la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques dans les cancers du sein, notamment les cancers du sein triple-négatifs.

Dans un second temps, je me suis intéressé à la mise en place de l'interaction sortiline/TrkA dépendante du pro-NGF dans les cellules cancéreuses de sein. Mes travaux ont contribué à la mise en évidence d'un nouveau partenaire membranaire de cette interaction : le récepteur tyrosine-kinase EphA2. En effet, le laboratoire a montré que le précurseur du NGF, le pro-NGF, contribue à la mise en place du complexe sortiline/TrkA (Demont *et al.*, 2012). Grâce à des expériences d'immuno-précipitations du récepteur TrkA suivies d'analyses en spectrométrie de masse, le récepteur EphA2 a été découvert comme interagant de TrkA dans la signalisation dépendante du pro-NGF. L'implication d'EphA2 dans cette interaction a été confirmée par des immunoblots et des expériences de PLA dans différentes lignées cancéreuses mammaires. De plus, ces travaux ont permis de mettre en évidence une nouvelle signalisation sous-jacente exclusive à l'interaction TrkA/EphA2. Ces travaux ouvrent de

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

nombreuses perspectives en matière d'amélioration des traitements car ils permettraient un meilleur ciblage des déterminants des voies de résistance impliquant TrkA.

Enfin, j'ai pu participer aux travaux du Pr. Orian-Rousseau (Karlsruhe Institute of Technology, Allemagne) qui s'intéressent aux interactions pouvant être mises en place dans la signalisation des récepteurs ErbB, notamment par la participation des co-récepteurs CD44. Mes expériences ont permis de confirmer l'existence de l'interaction ErbB1/CD44v6 dans les lignées cancéreuses de sein. L'ensemble de ces résultats montrent encore une fois la complexité et la plasticité de la signalisation membranaire dans les cellules cancéreuses mammaires, augmentées par le recrutement de différents co-récepteurs, et notamment les protéines d'adhésion cellulaire telles que CD44.

L'ensemble de ces résultats permet une meilleure compréhension des mécanismes propres à la signalisation de TrkA mais soulève également de nouvelles questions. En effet, nous avons mis en évidence de nouveaux partenaires inconnus jusqu'à présent dans la signalisation du (pro)NGF et souligné leur importance dans la tumorigénèse mammaire ce qui amène à discuter de l'importance de nouveaux partenaires dans les signalisations pro-tumorales et les résistances aux thérapies conventionnelles. De plus, l'introduction de ces nouveaux partenaires d'interaction laisse supposer une complexité grandissante concernant la mise en place des voies de signalisation propres à chaque interaction : quelle est l'importance de la balance entre chaque récepteur ? L'importance de la présence des ligands ou l'importance de la création de nouveaux sites d'interaction ? Enfin, ces nouvelles interactions ouvrent de nombreuses perspectives quant aux thérapies ciblées dans les cancers.

I. De nouveaux partenaires membranaires dans la signalisation protumorale du (pro)NGF impliquent une plasticité des réseaux de récepteurs membranaires

Le laboratoire INSERM U908 a récemment mis en évidence l'implication de la glycoprotéine de surface membranaire CD44 dans la signalisation protumorale du NGF *via* son interaction avec le récepteur TrkA (Aubert *et al.*, 2015).

CD44 est impliqué dans les interactions entre cellules et entre cellule et matrice extracellulaire notamment grâce à son rôle de premier récepteur à l'acide hyaluronique. Il peut également fixer d'autres composants de la matrice extracellulaire tels que l'ostéopontine, la fibronectine ou la laminine (Goodison *et al.*, 1999). CD44 a la particularité de pouvoir interagir avec de nombreuses molécules et on lui attribue d'ailleurs un rôle de « plateforme de signalisation » qui conduit à une diversification des processus dans lesquels il est impliqué (Ponta *et al.*, 1998). De plus, l'implication de CD44 dans différents cancers est maintenant clairement établi, à travers ses rôles dans différents processus pro-tumoraux tels que la prolifération cellulaire, la différenciation, l'invasion ou encore l'angiogenèse (Naor *et al.*, 2002). Le phénotype CD44+/CD24- a d'ailleurs été corrélé avec les cancers du sein de type triple-négatifs (Honeth *et al.*, 2008). Néanmoins, les nombreuses études portant sur l'implication de CD44 dans le cancer rapportent des résultats contradictoires. Ces contradictions peuvent facilement être expliquées par l'insertion de nombreux exons variants dans la structure de CD44 qui donnent naissance à des isoformes possédant des propriétés spécifiques et dont l'importance a longtemps été négligée (Martegani *et al.*, 1999). Des différences de méthodologies peuvent également expliquer ces résultats contradictoires et notamment l'utilisation d'anticorps non spécifiques. Ainsi, certaines études ont établi l'implication de CD44s en utilisant un anticorps ciblant la région standard de CD44, ce qui permet la mise en évidence de toutes les isoformes de CD44 et non pas du CD44s (Diaz *et al.*, 2005). La recherche de l'implication des variants de CD44 dans les différents processus cellulaires se heurte donc à des verrous technologiques et la multitude d'isoformes présentes dans chaque lignée cancéreuse mammaire, qui ne sont pas toujours caractérisables, est également une difficulté de plus à surmonter. Ainsi, nous avons établi une « cartographie » de l'expression des variants de CD44 dans les cellules cancéreuses de sein par RT-PCR. Nos

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

résultats confirment les études qui montrent que l'expression de CD44 est dérégulée dans les tumeurs mammaires avec une expression de nombreuses isoformes (Naor *et al.*, 1997). Nous avons également montré que les profils d'expression des isoformes de CD44 semblent être associés à la différenciation des cellules tumorales dans le sein, et notamment leur profil épithélio-mésenchymateux. En effet, nous avons montré que les lignées luminales, qui sont des cellules bien différenciées et qui expriment des marqueurs épithéliaux, présentent des isoformes de hauts poids moléculaires (contenant plus de trois exons variables). Par contre, les cellules triple-négatives, qui ont des caractéristiques de cellules stromales et peu différenciées, semblent exprimer des isoformes plus courtes avec 1 à trois exons hypervariables par molécule. Dans les cellules HER2+, il semblerait également que l'expression des isoformes soit dépendante de la différenciation luminale ou basale. En effet, les phénotypes épithélio-mésenchymateux définis précédemment par l'équipe de Blick pour ces lignées sont en accord avec notre hypothèse et les profils des isoformes de CD44 que nous avons défini (Blick *et al.*, 2008). Une étude avait déjà montré un lien entre l'EMT et le profil d'expression des isoformes de CD44 en montrant que l'expression de CD44s était essentielle pour l'EMT des cellules cancéreuses mammaires (Brown *et al.*, 2011). Compte tenu de nos résultats, nous pouvons supposer que la présence de CD44s n'est pas essentielle pour l'EMT, mais plutôt l'expression d'isoformes courtes de CD44. L'ensemble de ces résultats est également en accord avec les travaux d'Olsson *et al.* (2011) qui démontrent que les lignées luminales expriment majoritairement de longues isoformes (CD44v2-v10 et CD44v3-v10) contrairement aux cellules basales qui expriment des isoformes contenant peu ou pas d'exons hypervariables (CD44s et CD44v8-v10). De plus, le phénotype EMT des tumeurs primaires a été associé à l'agressivité tumorale des cellules cancéreuses mammaires, et notamment les capacités métastatiques (Thompson *et al.*, 1992; Willipinski-Stapelfeldt *et al.*, 2005). Ainsi, le profil d'isoformes courtes de CD44 semble être étroitement lié au caractère agressif des lignées triple-négatives. Il serait particulièrement intéressant de tester si la taille des isoformes contenant le variant 3 est importante dans la mise en place de l'interaction TrkA/CD44 en transfectant des isoformes longues dans la lignée COS-7 et en étudiant les complexes TrkA/CD44 par PLA. Ceci pourrait fournir une explication quant au plus grand nombre de complexes retrouvé dans les lignées basales. D'autre part, CD44v3 est la seule isoforme de CD44 pouvant être modifiée par une chaîne d'héparane sulfate (Bennett *et al.*, 1995). Cette chaîne d'héparane sulfate peut être ajoutée à la structure de CD44v3 au niveau

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

de son domaine SGSG (Greenfield *et al.*, 1999). L'ajout de cette chaîne d'héparane sulfate lui confère des propriétés d'interactions spécifiques et CD44v3 peut notamment fixer différents facteurs de croissance tels que le FGF ou encore le VEGF, lui permettant d'interagir avec d'autres récepteurs membranaires (Jones *et al.*, 2000; Orian-Rousseau et Ponta, 2008). Par exemple, il a été montré que CD44v3 est nécessaire à l'activation d'ErbB4 par son ligand HB-EGF (Yu *et al.*, 2002). Dans ce système, CD44v3 recrute la MMP7 à la membrane et participe à la maturation du facteur de croissance HB-EGF par clivage protéolytique, conduisant à l'activation de son récepteur ErbB4 (Morath *et al.*, 2018). Dans notre étude, la chaîne d'héparane sulfate présente sur CD44v3 ne semble pas impacter la mise en place du complexe TrkA/CD44 car la délétion du domaine 3, contenant le motif SGSG, n'a pas inhibé la formation du complexe par PLA. Cependant, compte tenu des nombreuses interactions dans lesquelles CD44v3 est impliqué, il serait intéressant de déterminer l'impact d'autres récepteurs et d'autres ligands connus de CD44v3 dans la formation du complexe TrkA/CD44 sous stimulation au NGF. Ainsi, la diversité des isoformes de CD44 peut expliquer en partie la plasticité des interactions membranaires dans les cellules cancéreuses mammaires et dans d'autres types de cancers.

Les résultats obtenus pendant ma thèse ont également contribué à mettre en évidence un nouveau partenaire dans la signalisation pro-tumorale du précurseur du NGF : le proNGF. En effet, une stimulation au proNGF induit la formation d'un complexe ternaire sortiline/TrkA/EphA2 conduisant à l'activation de la voie sous-jacente Src. L'implication de ce récepteur dans les cancers du sein, et particulièrement les cancers de type triple-négatif, a récemment été démontrée. En effet, le ciblage d'EphA2 par une petite molécule inhibitrice du domaine kinase d'EphA2, l'ALW-II-41-27, conduit à une diminution de la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes dérivées de tumeurs de patientes atteintes d'un cancer du sein (Song *et al.*, 2017). Le récepteur EphA2 a été découvert en 1990 par l'analyse de régions conservées des protéines tyrosines kinases d'une banque d'ADNc de cellules épithéliales (Lindberg et Hunter, 1990). Son ligand, la protéine membranaire Ephrin-A1, fut découvert comme un nouveau produit de l'induction par le TNF- α (Holzman *et al.*, 1990), puis plus tard comme le ligand d'EphA2 (Bartley *et al.*, 1994). Ephrin-A1 pourrait également jouer un rôle dans la mise en place du complexe sortiline/TrkA/EphA2 que nous avons mis en évidence. En effet, la surexpression d'EphA2 conduit à l'agressivité tumorale, notamment *via* le processus

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

métastatique, principalement grâce à une activation d'EphA2 indépendante de son ligand (Zelinski *et al.*, 2001). La liaison d'Ephrin-A1 à EphA2, que ce soit sous forme soluble ou par présentation par d'autres cellules, conduit à une inactivation des effets pro-tumoraux d'EphA2 en augmentant sa dégradation mais aussi en inhibant ses voies de signalisation (Duxbury *et al.*, 2004). Ainsi, une stimulation des cellules cancéreuses par EphrinA1-Fc, un Ephrin-A1 recombinant soluble, cause une dégradation d'EphA2 suite à son internalisation et son association avec la protéine adaptatrice c-Cbl (Walker-Daniels *et al.*, 2002). De plus, suite à la fixation d'Ephrin-A1 sur EphA2, la phosphatase SHP-2 est recrutée au niveau d'EphA2, menant à la déphosphorylation de FAK et à la diminution des capacités invasives des cellules tumorales (Miao *et al.*, 2000). Bien que nous ayons montré que la formation du complexe ternaire sortiline/TrkA/EphA2 active une autre voie dépendante de Src, on ne peut exclure un impact du ligand Ephrin-A1. La présence du ligand Ephrin-A1 dans les cellules MCF-7 pourrait même expliquer les résultats que nous avons obtenu en PLA, qui montraient une faible présence du complexe TrkA/EphA2 dans cette lignée. De plus, une inhibition d'EphA2 par si-ARN conduit à une augmentation de la clonogénicité des cellules MCF-7, ce qui laisse penser qu'EphA2 aurait un effet protecteur dans cette lignée, possiblement *via* sa liaison avec Ephrin-A1. Une étude différentielle du complexe Ephrin-A1/EphA2 par PLA dans les lignées cancéreuses mammaires pourrait être envisagée pour vérifier cette hypothèse. Par ailleurs, il serait intéressant d'observer la libération de la forme soluble d'Ephrin-A1 dans les différentes lignées cancéreuses mammaires ainsi que l'expression des différentes métalloprotéases responsables de son clivage, telles que les MMPs-1,-2,-9 et-13 (Beauchamp *et al.*, 2012).

La formation des complexes sortiline/TrkA/EphA2 et TrkA/CD44 est dépendante du proNGF et du NGF respectivement. Les niveaux d'expression respectifs de ces deux formes de NGF vont permettre la mise en place de l'une ou l'autre interaction. En effet, des résultats préliminaires ont montré qu'une stimulation au proNGF dans les cellules MDA-MB-231 conduisait à la diminution du nombre de complexes TrkA/CD44 dans cette lignée et inversement, qu'une stimulation au NGF dans cette même lignée conduisait à une diminution du nombre de complexes TrkA/EphA2 (données non montrées). Ainsi, la balance d'expression entre ces deux formes semble être un déterminant majeur de la plasticité des complexes membranaires impliquant TrkA. Il serait dès lors intéressant d'observer la mise en place de

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

ces deux complexes dans les cellules cancéreuses mammaires en présence des deux formes du NGF, afin de déterminer si la formation d'un complexe est préférentielle dans ces lignées.

L'importance des co-récepteurs dans la signalisation pro-tumorale n'est plus à démontrer. Parmi ces co-récepteurs, il en est un particulièrement important dans la signalisation du (pro)NGF : le récepteur p75^{NTR}. En effet, le récepteur p75^{NTR} est connu pour son implication dans la fixation à la fois du proNGF et du NGF. Après une stimulation au proNGF, la sortiline fixe le proNGF par son prodomaine et permet d'augmenter l'affinité de la partie mature pour p75^{NTR} (Feng *et al.*, 2010). En ce qui concerne l'interaction sortiline/TrkA/EphA2, des résultats préliminaires ont montré que la transfection d'un si-p75^{NTR} dans les cellules MDA-MB-231 n'empêchait pas la formation du complexe ainsi que l'activation de la voie Src sous-jacente, suggérant que p75^{NTR} ne participe à la formation de ce complexe. De la même manière, il serait particulièrement intéressant d'étudier la mise en place du complexe TrkA/CD44 en présence d'un si-p75^{NTR} dans les cellules cancéreuses mammaires. En effet, la fixation du NGF sur p75^{NTR} permet la formation d'un complexe avec TrkA et augmente l'affinité du NGF pour TrkA (Barker et Shooter, 1994; Mahadeo *et al.*, 1994). Ces études pourraient fournir de nouvelles explications quant à la mise en place différentielle du complexe dans les différentes lignées cancéreuses mammaires. Cette interaction pourrait par ailleurs faire intervenir un changement de conformation de TrkA dont le domaine extracellulaire serait courbé pour permettre une interaction directe entre p75^{NTR} et le domaine riche en leucine de TrkA (Zaccaro *et al.*, 2001). Un mécanisme similaire pourrait également être à l'origine de l'interaction entre TrkA et CD44v3. En effet, suite à la modélisation informatique de l'interaction entre le domaine extracellulaire de TrkA et la séquence protéique du variant 3 que j'ai présenté dans mes résultats, nous avons découvert que l'interaction impliquerait plus probablement la partie N-terminale du récepteur TrkA. Ce changement conformationnel pourrait également expliquer la différence de signalisation intracellulaire mise en place par le complexe TrkA/CD44v3 qui induit l'activation de la voie p115RhoGEF indépendamment de la phosphorylation de TrkA. Ces résultats restent préliminaires et il est nécessaire de les confirmer en effectuant par exemple des mutagenèses dirigées contre les acides aminés mis en évidence par la modélisation informatique de TrkA.

La découverte de nouveaux partenaires de TrkA dans la signalisation protumorale du (pro)NGF améliore notre compréhension des mécanismes à l'origine de la croissance tumorale

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

et de la résistance aux thérapies. Le domaine de recherche des interactions entre protéines (PPI) est d'ailleurs en pleine expansion. Nous avons procédé à des expériences d'immunoprécipitations suivies par des analyses en spectrométrie de masse ainsi qu'à la technique PLA pour découvrir ces partenaires. D'autres techniques basées sur la fluorescence peuvent également être utilisées telles que le FRET ou le BRET ([Matoulková et Vojtěšek, 2014](#)). Ces techniques sont cependant difficiles à appliquer pour ce qui est de l'analyse à grande échelle des interactions protéiques. De nouvelles techniques ont récemment été mises au point pour effectuer des analyses à large échelle de protéines interagissant avec les récepteurs membranaires. Parmi elles, un dérivé de la technique du double-hybride bactérien a permis une analyse à large échelle des protéines interagissant avec les GPCRs ([Sokolina et al., 2017](#)). Dans cette étude, le système du double hybride bactérien a été modifié pour permettre l'étude des GPCRs correctement intégrés à la membrane cellulaire et une étude à large échelle des protéines en interaction. Afin de sélectionner les meilleurs candidats pour une étude fonctionnelle des protéines en interaction, une analyse informatique a été utilisée. Les outils d'analyses bioinformatiques s'avèrent également être une aide non négligeable pour aider à la découverte de nouveaux partenaires protéiques mais aussi pour la compréhension de la mise en place des interactions. En effet, les nombreux facteurs affectant le récepteur TrkA et ses interactions avec les neurotrophines doivent être pris en compte pour comprendre comment les complexes TrkA/EphA2 et TrkA/CD44 se mettent en place. Cela inclut notamment l'expression quantitative des récepteurs et co-récepteurs en jeu, l'épissage alternatif des récepteurs, l'expression de modulateurs comme p75^{NTR}, la coexpression des neurotrophines ou encore les changements structuraux entraînant le démasquage de nouveaux sites d'interaction. Des systèmes d'analyses bioinformatiques de plus en plus puissants permettent d'intégrer ces variables dans des simulations d'interactions entre protéines et aident à la compréhension de cette dynamique complexe ([Chen et al., 2017](#); [Haddad et al., 2017](#)). Ces outils pourraient également s'avérer utiles pour prévoir les effets secondaires non désirables de certaines molécules thérapeutiques, notamment les peptides mimétiques.

II. De nouveaux partenaires membranaires dans la signalisation protumorale du (pro)NGF impliquent une plasticité des voies de signalisation induites

Après avoir validé la nécessité des isoformes de CD44 contenant le variant 3 pour la mise en place du complexe TrkA/CD44 sous stimulation au NGF, nous nous sommes intéressés aux effets biologiques engendrés par cet axe. Pour cela, nous avons utilisé un si-CD44v3 et étudié l'impact de sa transfection sur différents processus protumoraux dans les cellules cancéreuses mammaires. Les résultats obtenus ont montré une implication de CD44v3 dans la clonogénicité, la migration et l'invasion de plusieurs lignées cancéreuses mammaires en relation avec une stimulation au NGF. On peut alors se demander quelles voies de signalisation intracellulaires permettent d'aboutir à ces mécanismes.

Les travaux précédents du laboratoire qui avaient démontré l'existence de TrkA/CD44 avaient permis de montrer, par utilisation d'un si-CD44, que cette interaction ne permettait pas l'activation des voies sous-jacentes Akt et Src dépendantes de la phosphorylation de TrkA (Aubert *et al.*, 2015). En revanche, il a été montré que l'interaction TrkA/CD44 permettait l'activation de la voie p115RhoGEF/RhoA et RhoC/ROCK1. Afin de confirmer ces résultats et de les relier à mes travaux concernant CD44v3, il serait intéressant d'utiliser un si-CD44v3 pour déterminer si cette voie est dépendante de CD44v3. On peut également se demander comment la protéine p115RhoGEF est activée par le complexe TrkA/CD44v3. Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le mécanisme. Tout d'abord, il est possible que p115RhoGEF s'associe directement au récepteur TrkA, comme cela a été démontré pour d'autres RhoGEFs et RTKs (Schiller, 2006). En effet, il a été montré que les RhoGEFs peuvent interagir directement avec TrkA au niveau de son domaine HIKE (H⁵⁰⁷IKRQDIILKWE⁵¹⁸) *via* leur domaine PH (Pleckstrin Homology domain) (Alberti, 1998; Robinson *et al.*, 2005). Ainsi, p115RhoGEF pourrait également interagir avec TrkA car il possède un domaine PH (Wells *et al.*, 2001). Pourtant, des analyses ont montré que l'interaction entre TrkA et p115RhoGEF était impactée par le résidu Y⁴⁹⁰ de TrkA (données non montrées). Des analyses complémentaires sont cependant nécessaires pour déterminer l'apport du domaine HIKE de TrkA dans cette interaction, en utilisant une forme mutée de TrkA pour ce domaine par exemple. Une autre hypothèse avancée pour expliquer le recrutement de p115RhoGEF serait la participation de

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

RCPGs connus pour permettre la transactivation de différents RTKs, dont TrkA (Cattaneo *et al.*, 2014; El Zein *et al.*, 2010; Moughal *et al.*, 2004). En effet, une des protéines identifiées par l'analyse en spectrométrie de masse était la protéine Gα13 (*Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13*) qui est connue pour sa participation à la signalisation des RCPGs et à l'activation de p115RhoGEF (Chen *et al.*, 2012; Kozasa *et al.*, 2011). Enfin, la participation des protéines ERM (*Ezrin, Radixin, Moesin*) pourrait également expliquer le recrutement de p115RhoGEF à TrkA (Ponuwei, 2016). Ces protéines font le lien entre la signalisation de la membrane plasmique et le cytosquelette et sont connues pour leur implication dans les signalisations de CD44, des RhoGTPases et des RTKs (Clucas et Valderrama, 2014). Il a notamment été montré que les ERMs permettaient l'activation sous-jacente de Ras suite à la mise en place de l'interaction c-Met/CD44v6 dépendante de l'HGF (Hasenauer *et al.*, 2013; Orian-Rousseau *et al.*, 2007). Pour approfondir nos résultats, nous pourrions notamment utiliser des formes de CD44v3 mutées dans la zone d'interaction avec les ERMs.

La dernière protéine identifiée dans la signalisation sous-jacente au complexe TrkA/CD44 fut ROCK1. De manière intéressante, la protéine sérine/thréonine kinase ROCK1 est au cœur de nombreuses voies de signalisation différentes grâce à son rôle essentiel dans la contraction du cytosquelette d'actomyosine (Julian et Olson, 2014). Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la migration, l'apoptose, la survie ou encore la prolifération cellulaire. Le rôle de ROCK1 dans la progression tumorale a été démontré grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques tels que l'Y-27632, dans différents cancers, notamment les leucémies (Mali *et al.*, 2011), mélanomes (Routhier *et al.*, 2010), les cancers de la prostate (Zhang *et al.*, 2014), des ovaires (Jeong *et al.*, 2012) ou encore du sein (S. Liu *et al.*, 2009). Or, nos travaux ont montré que l'inhibition de CD44v3 dans les cellules cancéreuses mammaires conduisait à une diminution de la clonogénicité et de la migration induite par le NGF. Ces conséquences pourraient s'expliquer par le lien entre le complexe TrkA/CD44v3 et la voie p115RhoGEF/RhoA et RhoC/ROCK1 et par les protéines sous-jacentes à la signalisation de ROCK1. En effet, ROCK1 phosphoryle LIMK1 et LIMK2 au niveau des Thr508 (Ohashi *et al.*, 2000) et Thr505 (Katoh *et al.*, 2001; Sumi *et al.*, 2001) respectivement. LIMK1 et LIMK2 sont des sérines/thréonines kinases qui régulent le cytosquelette d'actine à travers la phosphorylation et l'inhibition de l'activité du facteur de dépolymérisation de l'actine, la cofiline (Schofield et Bernard, 2013). Plus précisément, après activation des LIMKs par ROCK1, celles-ci vont phosphoryler la

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

cofiline, inhibant alors son interaction avec l'actine-F. Ceci aura alors pour conséquence d'inhiber la dépolymérisation de l'actine et le recyclage des filaments conduisant à une forte augmentation d'actine-F dans la cellule et résultant en une augmentation de la migration cellulaire (Moriyama *et al.*, 1996; Nebl *et al.*, 1996). Or, nous avons mis en évidence grâce à des expériences de western blot qu'une stimulation au NGF dans les cellules cancéreuses mammaires conduisait à une augmentation de la phosphorylation de la cofiline (données non montrées). Ces résultats restent préliminaires mais il serait intéressant de tester si cette augmentation de phosphorylation est dépendante de l'interaction TrkA/CD44v3 en utilisant un si-CD44v3. Les changements de phosphorylation de la cofiline pourraient être causés par l'activation de ROCK1 suite à la stimulation au NGF et pourraient expliquer les résultats obtenus en migration. ROCK1 peut également conduire à la prolifération cellulaire notamment grâce à son action sur certaines protéines de régulation du cycle cellulaire (Izawa *et al.*, 1998; Pawlak et Helfman, 2002). En effet, l'activation de ROCK1 conduit à l'induction de la cycline D1, *via* la voie Ras/MAPK, ce qui mène à une progression dans le cycle cellulaire (Croft et Olson, 2006). De plus, l'activation de ROCK1 induit une augmentation de l'expression de β -caténine ainsi que de sa cible transcriptionnelle c-myc, menant également à une augmentation de la prolifération cellulaire (Samuel *et al.*, 2011). Nos résultats ont montré qu'une inhibition de CD44v3 dans les cellules cancéreuses mammaires inhibait la clonogénicité de ces cellules induites par le NGF. Il serait intéressant de déterminer si ces résultats sont dus à une modulation du cycle cellulaire par l'interaction TrkA/CD44v3 et l'activation sous-jacente de ROCK1, par exemple par des études de distribution des cellules dans le cycle cellulaire par cytométrie en flux. Toutefois, l'activation de ROCK1 ne semble pas mener aux mêmes effets dans toutes les lignées cancéreuses mammaires. En effet, l'inhibition de ROCK1 dans la lignée MCF-7 conduit à leur prolifération et augmente leur migration et invasion tandis que dans la lignée MDA-MB-231, l'inhibition de ROCK1 diminue leur prolifération (Yang et Kim, 2014). Les mécanismes expliquant ces différences ne sont pas totalement compris mais ces données pourraient expliquer les différences que nous avons nous même obtenus en tests de clonogénicité entre les lignées MDA-MB-231 et MCF-7. En effet, l'inhibition de CD44v3 dans ces deux lignées conduit à des effets inverses, malgré la présence du complexe TrkA/CD44v3 dans les deux lignées. Ainsi, on peut supposer que l'activation de ROCK1 dépendante du complexe TrkA/CD44v3 conduit à des effets prolifératifs dans la lignée MDA-MB-231 et antiprolifératifs dans la lignée MCF-7. Des recherches

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

supplémentaires doivent être entreprises afin de confirmer l'ensemble de ces hypothèses et préciser notre connaissance des voies intracellulaires sous-jacentes à l'interaction TrkA/CD44v3.

Contrairement au NGF, le proNGF va induire la formation d'un complexe ternaire sortiline/TrkA/EphA2 dans les cellules cancéreuses mammaires. Le recrutement d'EphA2 conduit à l'activation sous-jacente de Src, de manière indépendante de la phosphorylation de TrkA. En revanche, l'activation sous-jacente de la voie PI3k/Akt a été montrée comme dépendante de l'activité kinase de TrkA. Plusieurs études ont déjà démontré que l'activation d'EphA2, indépendamment de son ligand Ephrin-A1, conduisait à l'activation de différentes voies sous-jacentes telles que les MAPKs, les Rho-GTPases ou encore Src (Fang *et al.*, 2008; Hiramoto-Yamaki *et al.*, 2010; Miao *et al.*, 2009). De manière intéressante, l'analyse protéomique de l'interactome de TrkA par spectrométrie de masse nous a permis d'identifier des protéines impliquées dans les signalisations de Src et/ou EphA2. Ainsi, nous avons par exemple identifié la protéine SHEP-1 (*SH2 domain-containing Eph receptor-binding protein 1*). SHEP-1 favorise la phosphorylation de p130 Cas/BCAR1 (*p130 Crk-associated substrate / Breast cancer anti-estrogen resistance 1*) par Src (Roselli *et al.*, 2010), via son recrutement et sa phosphorylation par EphA2 (Dail *et al.*, 2004). Or, la phosphorylation de p130 Cas par Src participe à la survie, à la migration et à l'invasion des cellules cancéreuses de sein (Brábek *et al.*, 2005; Cunningham-Edmondson et Hanks, 2009; Sánchez-Bailón *et al.*, 2012). De plus, nous avons pu identifier la protéine PTPN12 (*Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12*) qui peut elle aussi interagir avec la protéine p130 Cas et participer à sa régulation (Garton *et al.*, 1996). Il a de plus été démontré dans les ostéoclastes que PTPN12 pouvait activer Src, conduisant à la phosphorylation de la cortactine et à une augmentation de l'invasion cellulaire (Chellaiah et Schaller, 2009). Cette augmentation de l'invasion cellulaire serait due à la formation de protrusions membranaires spécifiques appelées invadopodes, participant également à la migration des cellules ainsi qu'à la dégradation de la matrice extracellulaire (Guarino, 2010; Murphy et Courtneidge, 2011; Ren *et al.*, 2018; Yamaguchi, 2012). Or, nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de la cortactine après stimulation par le proNGF dans les cellules MDA-MB-231 (données non montrées). Ainsi, il serait intéressant d'approfondir l'étude de cette voie de signalisation et notamment son lien avec les invadopodes.

III. Ciblage thérapeutique des complexes membranaires : vers un meilleur ciblage ?

L'axe (pro)NGF/TrkA a été largement étudié dans de nombreux types de cancers différents et différentes études ont permis de définir son importance en tant que cible thérapeutique dans les cancers du sein (Hondermarck, 2012), de l'ovaire (Davidson *et al.*, 2001; Tapia *et al.*, 2011), de la prostate (Arrighi *et al.*, 2010), du poumon (Gao *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2014), du pancréas (Ceyhan *et al.*, 2010; Diao *et al.*, 2012), du foie (Yang *et al.*, 2014), de la thyroïde (Faulkner *et al.*, 2018), ou encore dans le mélanome (Pasini *et al.*, 2015; Truzzi *et al.*, 2008). L'ensemble de mes travaux confirment que les signalisations du NGF mais aussi de son précurseur le proNGF sont des opportunités importantes pour l'amélioration des traitements anti-cancéreux dans le cancer du sein.

Comme déjà mentionné dans l'introduction, l'axe (pro)NGF/TrkA a déjà fait l'objet de divers ciblage thérapeutiques par différentes méthodes et dans différents cancers (Demir *et al.*, 2016). Une de stratégies utilisées est le ciblage de l'activité kinase du récepteur TrkA (Griffin *et al.*, 2018). En effet, les effets anti-prolifératifs de composés tels que le K252a ont été démontrés *in vitro* dans le cancer de la prostate (Sortino *et al.*, 2000) puis confirmés dans des modèles de xénogreffes murins (Festuccia *et al.*, 2007; Weeraratna *et al.*, 2001). Cependant, les essais cliniques utilisant ces types d'inhibiteurs n'ont pas montré de résultats significatifs (Marshall *et al.*, 2005). Ce manque d'efficacité a été attribué à une biodisponibilité insuffisante de la drogue (Collins *et al.*, 2007) ou encore à l'activation de voies de signalisations compensatoires telles qu'une suractivation de la voie NF- κ B (Holz *et al.*, 2013). De plus, ce type d'inhibiteurs cible également d'autres récepteurs tyrosine kinase tels que les CAM-kinases ou FLT3, ce qui accroît la possibilité de générer des effets secondaires non désirés. Ainsi, des études ont montré l'intérêt majeur d'inhibiteurs plus spécifiques de TrkA (Lange et Lo, 2018). Les plus prometteurs, actuellement en phase d'essai clinique II, sont le Larotrectinib (ou LOXO-101) (NCT03213704), l'Entrectinib (NCT02568267), le Cabozantinib (NCT01639508) ou encore le Merestinib (NCT02920996). Cependant, ces inhibiteurs ne présentent d'intérêt clinique que dans les cancers présentant des fusions chimériques de TrkA (Vaishnavi *et al.*, 2015). Or, la proportion de cancers présentant ce genre de fusions est très faible, allant de 1

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

à 15 % dans l'ensemble des cancers reportés. Il est donc d'une importance majeure de poursuivre les études concernant le ciblage de l'axe (pro)NGF/TrkA dans les cancers. L'ensemble de ces observations suggère l'existence de mécanismes de résistance mis en place par les cellules cancéreuses pour contrer les thérapies ciblant l'activité kinase des RTKs, notamment TrkA. Mes résultats ont permis de mettre en évidence l'existence de deux complexes de récepteurs membranaires impliquant TrkA qui pourraient faire office de voies de résistance à ces thérapies. En effet, les complexes sortiline/TrkA/EphA2 et TrkA/CD44v3, respectivement induits par le proNGF et le NGF, mettent en place des voies de signalisation sous-jacentes indépendantes de la phosphorylation de TrkA. Pour confirmer nos observations, il serait particulièrement intéressant d'étudier la mise en place de ces complexes de résistances dans nos modèles cellulaires en traitant les lignées de manière prolongée avec des inhibiteurs spécifiques de l'activité kinase de TrkA tels que l'entrectinib, en présence ou non de proNGF non clivable ou de NGF.

Les complexes de récepteurs que j'ai contribué à mettre en évidence pourraient également présenter un intérêt pronostique majeur. En effet, les marquages d'échantillons de tumeurs mammaires nous ont permis de démontrer l'existence des deux complexes TrkA/EphA2 et TrkA/CD44v3. De plus, ces complexes semblent être spécifiques des tissus cancéreux car nous n'avons pas pu détecter ces complexes dans les échantillons de tissus adjacents sains. De précédentes études avaient déjà corrélé l'expression des récepteurs impliqués dans ces complexes avec des critères clinico-pathologiques dans différents cancers, mais à l'aide de marquages simples. Pour TrkA et CD44 notamment, ces études ont souvent abouti à des résultats contradictoires. Ainsi, le laboratoire a démontré par analyse transcriptomique que l'expression de TrkA est liée avec l'augmentation de la survie ([Descamps et al., 2001a](#)) alors que Davidson et son équipe ont démontré que la phosphorylation de TrkA est un facteur péjoratif ([Davidson et al., 2004](#)). Pour CD44v3, il a été montré que les isoformes de CD44 contenant le variant 3 ne sont pas corrélées avec le pronostic ([Wu et al., 2015](#)) alors que Ryś et ses collègues montrent une association avec l'envahissement ganglionnaire ([Ryś et al., 2003](#)). Enfin, le laboratoire a également recherché d'éventuelles corrélations avec l'expression de TrkA dans les cancers du sein sans trouver de valeur pronostique (Communication personnelle : Méta-analyse de tissus-microarrays réalisée sur 6152 tumeurs de sein par le Pr Bertucci, Institut Paoli Calmettes, Marseille). Dans mes travaux, les marquages

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

effectués sur coupes de tumeurs montrent cependant une corrélation de la présence du complexe TrkA/CD44v3 avec la survie globale de patientes atteintes d'un cancer du sein triple-négatif. Ces différences s'expliquent probablement par le fait que la technique PLA permet de mettre en évidence non plus la co-expression de TrkA et CD44v3 mais une interaction fonctionnelle entre les deux protéines. Par ailleurs, en collaboration avec l'équipe du Pr. Dominique Chevalier (CHRU de Lille), nous avons pu mettre en évidence les complexes TrkA/CD44v3 et TrkA/EphA2 dans des échantillons de tumeurs provenant d'une cohorte de patients atteints d'un cancer des voies aéro-digestives supérieures (VADS). Les résultats préliminaires ont même montré une corrélation entre la survie globale de ces patients et le complexe TrkA/CD44v3. Ces résultats sont encourageants et méritent d'être approfondis. En effet, les isoformes de CD44v3 ont déjà été reportés comme participant à la tumorigenèse des cancers des VADS ([Bourguignon et al., 2012](#); [Franzmann et al., 2001](#); [Reategui et al., 2006](#)) et ont même été associés au phénotype souche des cellules cancéreuses ([Todoroki et al., 2015](#)). L'ensemble de ces données souligne l'importance de la mise en évidence des complexes membranaires plutôt que les récepteurs seuls comme outils pronostics. Dans ce sens, la technique PLA semble être une méthode simple et efficace pour permettre la détection des complexes membranaires.

Au vu de ces observations, il semblerait que le ciblage des protéines impliquées dans les complexes sortiline/TrkA/EphA2 et TrkA/CD44v3 présente un intérêt clinique potentiel. En effet, nous avons pu montrer que l'administration conjointe de CEP-701 et d'un si-ARN ciblant soit CD44 soit EphA2 réduit significativement la taille des tumeurs xénogreffées en comparaison à une monothérapie avec le CEP-701 ou l'un des deux si-ARNs. Ainsi, l'inhibition conjointe de TrkA et d'EphA2 ou CD44 pourrait empêcher l'apparition de voies de résistances et s'avérer plus efficace que les traitements ciblant l'un ou l'autre récepteur. Dans ce sens, le laboratoire avait déjà déposé un brevet pour une utilisation conjointe d'inhibiteurs de TrkA et d'EphA2 pour le traitement des cancers. Différentes études pointent d'ailleurs un intérêt grandissant pour les thérapies moins spécifiques, ciblant de multiples récepteurs plutôt qu'un seul récepteur spécifique ([Petrelli et Giordano, 2008](#)). De même, l'utilisation conjointe d'un inhibiteur de l'activité kinase de TrkA et d'un inhibiteur de CD44v3 semble être une option thérapeutique intéressante. Le ciblage thérapeutique de certains variants de CD44, les isoformes contenant le variant 6 par le Bivatuzumab notamment, avait déjà été entrepris et

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

avaient montré des résultats encourageants (Börjesson *et al.*, 2003; Colnot *et al.*, 2003). Malgré cela, le décès d'un patient et des problèmes de toxicités mirent fin aux essais cliniques sur le Bivatuzumab (Orian-Rousseau, 2010; Tijink *et al.*, 2006). Ces observations soulignent le fait que le ciblage d'une protéine peut conduire à la dérégulation de l'ensemble des voies de signalisations résultant de son activation, des voies de signalisation qui peuvent s'avérer d'un intérêt crucial pour le métabolisme des cellules saines. Ainsi, il pourrait être plus intéressant d'affiner le ciblage des voies spécifiquement mises en place par les cellules cancéreuses afin de minimiser les effets secondaires des traitements. Dans cette optique, le blocage des interactions membranaires pourrait être extrêmement intéressant. Nous avons choisi d'étudier l'option des peptides mimétiques pour bloquer l'interaction entre TrkA et CD44v3. La stratégie des peptides mimétiques pour le blocage des interactions a déjà été envisagée pour bloquer l'interaction entre CD44v6 et c-MET (Matzke *et al.*, 2005). Les résultats prometteurs obtenus *in vitro* suggèrent qu'ils pourraient être utilisés en essais cliniques. Leur efficacité est actuellement testée dans des modèles de xénogreffes de cancer du sein et de l'œsophage (Orian-Rousseau, 2010). L'amélioration de ces peptides est également en cours d'exploration pour augmenter leur efficacité *in vivo* (L. Li *et al.*, 2017). De notre côté, nous avons procédé à des délétions de domaines dans la séquence du variant 3 puis cribler l'importance de ces domaines pour la mise en place de l'interaction avec TrkA dans un modèle cellulaire n'exprimant pas ou peu de CD44. Les interactions entre TrkA et CD44 ont été mises en évidence par PLA et nous avons pu déterminer que deux domaines étaient particulièrement importants car leur absence empêche la formation du complexe induit par le NGF. Nous avons alors synthétisé deux peptides mimétiques de ces domaines et avons tenté de déterminer s'ils pouvaient inhiber la formation du complexe TrkA/CD44. Les résultats ont montré que les deux peptides conduisaient à une inhibition du nombre de complexes par PLA et des résultats préliminaires ont montré qu'une stimulation des cellules cancéreuses mammaires avec ces peptides conduisait à une diminution de leur clonogénicité. Ces résultats sont encourageants et doivent être approfondi pour confirmer l'intérêt clinique de ces peptides mimétiques. Dans la même optique, il serait particulièrement intéressant de déterminer les séquences précises d'interaction entre TrkA et CD44v3 afin de réduire la taille des peptides mimétiques, dans le but de faciliter leur prise en charge par les patients. Il serait également intéressant de déterminer les zones d'interaction entre TrkA et EphA2 afin de tenter de bloquer l'interaction par peptides mimétiques également. Par ailleurs, des études

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

menées actuellement au sein du laboratoire INSERM U908 visent à déterminer les séquences d'interactions entre p115RhoGEF et TrkA. Cette approche pourrait s'avérer être également une autre option thérapeutique envisageable.

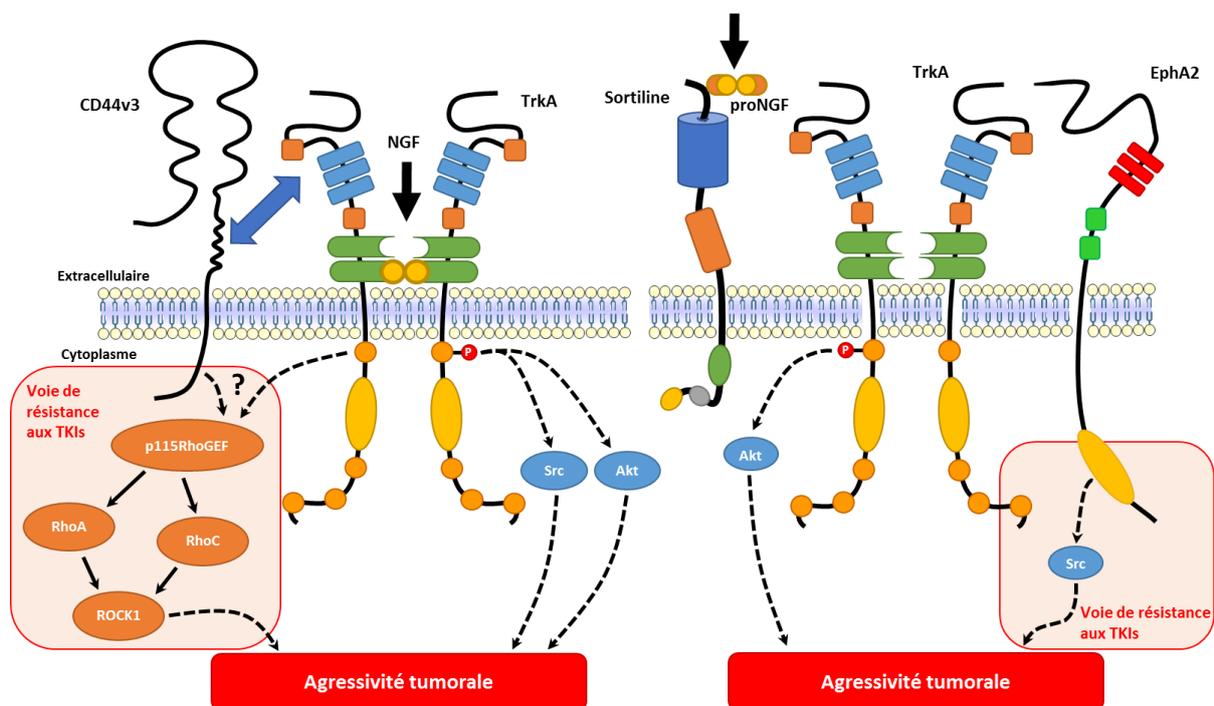


Figure 60 : Schéma récapitulatif des voies de résistance aux TKIs mises en évidence dans ces travaux pour les voies de signalisation du NGF (à gauche) et du pro-NGF (à droite) dans les cancers du sein.

En conclusion, mes travaux de thèse ont contribué à la mise en évidence de nouveaux réseaux de récepteurs membranaires induits par le NGF et son précurseur dans le cancer du sein. Ainsi, les complexes de récepteurs sortiline/TrkA/EphA2 et TrkA/CD44v3 soulignent encore l'extraordinaire plasticité des cellules cancéreuses mammaires pour mettre en place des résistances aux thérapies ciblées. La mise en évidence de ces complexes et leur ciblage s'inscrit dans une volonté d'améliorer les stratégies thérapeutiques actuelles en proposant de nouvelles options qui pourraient présenter un intérêt clinique potentiel.

ANNEXES

ANNEXE N°1

Article original

Differential recruitment of CD44 isoforms by ErbB ligands reveals an involvement of CD44 in breast cancer

Morath I., Jung C., Lévêque R., Linfeng C., Toillon RA., Warth A. and Orian-Rousseau V.



Differential recruitment of CD44 isoforms by ErbB ligands reveals an involvement of CD44 in breast cancer

Iris Morath¹ · Christian Jung¹ · Romain Lévêque² · Chen Linfeng³ · Robert-Alain Toillon² · Arne Warth⁴ · Véronique Orian-Rousseau¹

Received: 21 March 2017 / Revised: 24 October 2017 / Accepted: 31 October 2017
© Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature 2018

Abstract

Members of the CD44 family of transmembrane glycoproteins control cell signaling pathways from numerous cell surface receptors, including receptor tyrosine kinases (RTKs). The decisive factor (ligand, RTKs or both) that controls the recruitment of specific CD44 isoforms is still unknown. We investigated this question by using the EGFR signaling pathway, in which one receptor can be activated by a broad range of ligands. By means of siRNA-mediated downregulation of CD44 expression and blocking experiments, we identified CD44v6 as a co-receptor for EGF- and ER-induced ErbB1 activation and for NRG1-induced ErbB3 and ErbB4 activation. In contrast, TGF α is independent of all CD44 isoforms, even though it addresses the same receptor pairs as EGF. Moreover, the heparin-sulfated CD44v3 isoform is required for HB-EGF-induced EGFR signaling. These data suggest that specific CD44 isoforms are recruited in a ligand-dependent manner as co-receptors in the EGFR signaling pathways and that the specificity is determined by the ligand and not by the receptors themselves. The *in vivo* relevance of this interplay between CD44 isoforms and EGFR ligands is underlined by the decreased metastatic spreading of mammary carcinomas in mice treated with a CD44v6-specific peptide. Most importantly, we found a clear correlation between the presence of CD44v6/ErbB1 complexes in breast cancer patients and lymph node metastases.

Introduction

CD44 isoforms are involved in many physiological events, including limb development, haematopoiesis and regeneration [1] and their expression has been strongly linked to tumorigenesis [2]. The CD44 family of cell adhesion molecules comprises many members that are generated by alternative splicing of ten variant exons [3]. Theoretically, more than 700 hundred different CD44 isoforms could be

produced, twenty of which have been identified till now [1]. Additional heterogeneity is generated by post-translational modifications such as glycosylations. However, a functional explanation of the necessity for such a large number of CD44 isoforms is still lacking. Various members of the CD44 family have been shown to control several signaling pathways [4]. One possible justification for such a huge variety of isoforms might be the recruitment of CD44 proteins by specific growth factors.

One of the best studied isoform-specific functions of CD44 concerns CD44v6 as a co-receptor for several receptor tyrosine kinases (RTKs) including MET and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2) [5]. In that case, CD44v6 binds to the ligands Hepatocyte Growth Factor (HGF) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and controls the activation process of MET and VEGFR-2, respectively. Signaling from these two RTKs relies on the binding of the CD44 cytoplasmic tail to the cytoskeleton through Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) proteins [6]. This co-receptor function of CD44v6 is relevant for tumor progression and metastasis [7, 8] but also for physiological processes such as regeneration [9]. Another family member, CD44v3, the only heparin-sulfated isoform

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41388-017-0030-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Véronique Orian-Rousseau
veronique.orian-rousseau@kit.edu

¹ Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe, Germany

² Univ. Lille, Inserm, U908—CPAC—Cell Plasticity and Cancer, Lille, France

³ Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA

⁴ Institute of Pathology, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany

of CD44 [10] is involved in limb development [11], in collaboration with Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR).

Several studies have pointed towards a collaboration between members of the CD44 family and the ErbB receptors. For example, hyaluronan (HA) induces a complex containing CD44, ErbB2 and Ezrin regulating constitutive signaling in cancer cells [12, 13]. HA binding to CD44 promotes ErbB2 activation in ovarian carcinoma cell lines [14].

Besides its HA binding ability, other properties of CD44 also seem relevant due to their involvement in EGFR activation. For example, the CD44v3-MMP7 interaction activates pro-heparin-binding EGF (HB-EGF) that is instrumental in the tumorigenesis of cutaneous squamous cell carcinoma [15] and of mammary epithelial cell lines [16]. The CD44v3/EGFR cooperation was also reported in female reproductive organ remodeling [17]. In summary, the interplay between CD44 family members and members of the EGFR family is often dependent on specific isoforms and can be mediated in different ways.

In the present study, we determined whether CD44 isoforms are recruited in a ligand-specific, receptor-specific or ligand/receptor-specific manner by members of the EGF/

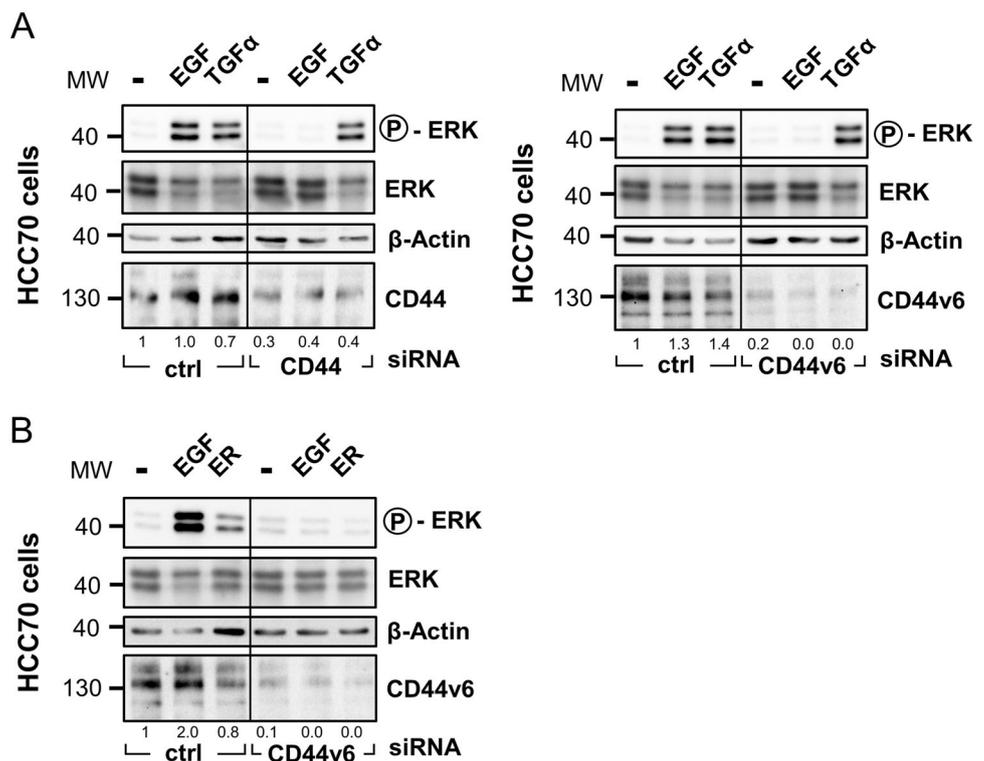
EGFR family. We showed that CD44v6 is required for EGF, Epiregulin (ER) and Neuregulin 1 (NRG1) activation of EGFR, whereas HB-EGF requires CD44v3. In contrast, we showed that TGF α activation of EGFR is independent of all CD44 isoforms. CD44 isoforms appear to be recruited in a ligand-specific manner. The *in vivo* relevance of the collaboration between CD44v6 and EGFR activation is demonstrated by interfering with the metastatic spreading of EGFR-dependent murine mammary tumor cells by inhibition of CD44v6. Most importantly, complexes between EGFR and CD44v6 were detected in primary tumors of breast cancer patients positive for lymph node metastasis.

Results

CD44 is required for activation of EGF receptors by EGF but not TGF α

We investigated whether the ligand, the RTK or both were responsible for the recruitment of specific CD44 isoforms as co-receptors. To do so, we chose the family of EGF RTKs, which offers several advantages. For example, more than eleven ligands induce members of the EGFR family

Fig. 1 EGF-induced and ER-induced EGFR signaling is dependent on CD44v6 whereas TGF α is independent of all CD44 isoforms. **a** HCC70 cells were transfected with siRNA against all CD44 isoforms, CD44v6-specific siRNA or control siRNA as indicated. They were induced with 20 ng/ml of EGF or TGF α as indicated. The cell lysates were resolved by SDS-PAGE. Western-blotting was used to detect CD44 or CD44v6 respectively and EGF- and TGF α -induced ERK phosphorylation. **b** HCC70 cells were transfected with CD44v6-specific siRNA or control siRNA and induced with 20 ng/ml of EGF or ER as indicated. The cell lysates were resolved by SDS-PAGE. Western-blotting was used to detect CD44v6 and EGF-induced and ER-induced ERK phosphorylation. In all cases, total ERK and β -Actin were used as loading controls. Quantification of the intensity of the CD44 or CD44v6 bands relative to β -Actin was done using ImageJ and is indicated underneath the CD44 blot



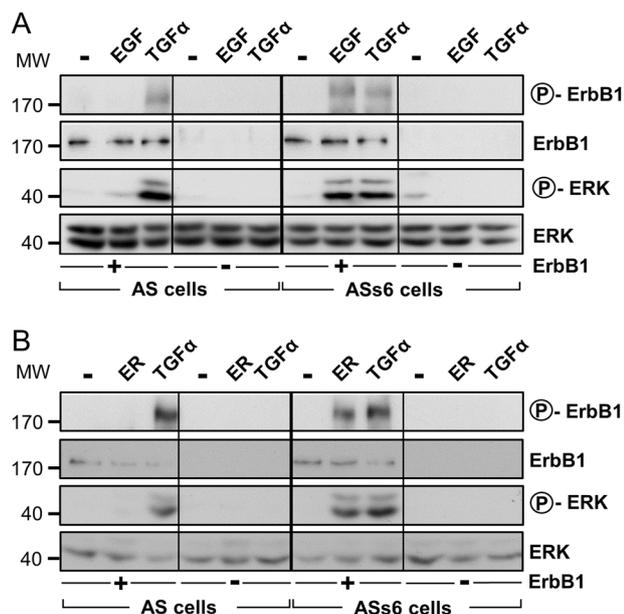


Fig. 2 EGF and ER can induce ErbB1 homodimers only in cells expressing CD44v6 whereas TGF α can do so independently of CD44v6 expression. **a** BSp73AS and BspASs6 cells were transfected with the ErbB1 receptor expression vector or a control vector by means of the retroviral ecopack 2–293 system as described in Material and Methods. Afterwards the transfected cells were starved and induced with 20ng/ml of EGF or TGF α . The cell lysates were resolved by SDS-PAGE. Western-blotting was used to detect EGF-induced and TGF α -induced ErbB1 and ERK phosphorylation. **b** BSp73AS cells and the BspASs6 cells were transfected with the ErbB1 receptor expression vector or a control vector by means of the retroviral ecopack 2–293 system. Afterwards the transfected cells were starved and induced with 20 ng/ml of ER or TGF α . The cell lysates were resolved by SDS-PAGE. Western-blotting was used to detect ER- and TGF α -induced ErbB1 and ERK phosphorylation. In all cases, total ERK was used as loading control

(Supplementary Fig. 1A) [18] and several of these ligands including EGF and TGF α bind to the same receptor, ErbB1. Other ligands, such as HB-EGF, can bind different receptors, ErbB1 and ErbB4 (Supplementary Fig. 1A). A third group is composed of Neuregulins (NRGs), which are divided into two subgroups based on their capacity to bind ErbB3 and ErbB4 (Supplementary Fig. 1A).

We tested whether CD44 was at all recruited by EGFR in the breast cancer cell line HCC70 that lacks overexpression of ErbB2 and in which the growth is highly dependent on ErbB1. A run-off analysis (Supplementary Fig. 2A) revealed the presence of the smallest CD44 isoform (CD44 standard, CD44s) and at least one CD44 isoform including all variant exons. An additional western blot analysis using an anti-CD44 antibody against all CD44 isoforms (pan CD44) detected several bands arising from alternative splicing and/or posttranslational modifications (Supplementary Fig. 2B). The most prominent band runs at 130 kDa.

Expression of all CD44 isoforms was downregulated with siRNA, and HCC70 cells were induced with EGF and TGF α (Fig. 1a, left side). EGF-induced ERK phosphorylation was inhibited upon downregulation of all CD44 isoforms. Surprisingly, although TGF α addresses the same receptor pair, TGF α -induced ERK activation was not affected. The results obtained in HCC70 cells were confirmed in the breast cancer cell line HCC1954 and a colorectal carcinoma cell line (HT29) expressing all four ErbB receptors [19] (Supplementary Fig. 1B).

EGF, ER, and NRG1 induced activation of ErbB receptors is dependent on CD44v6

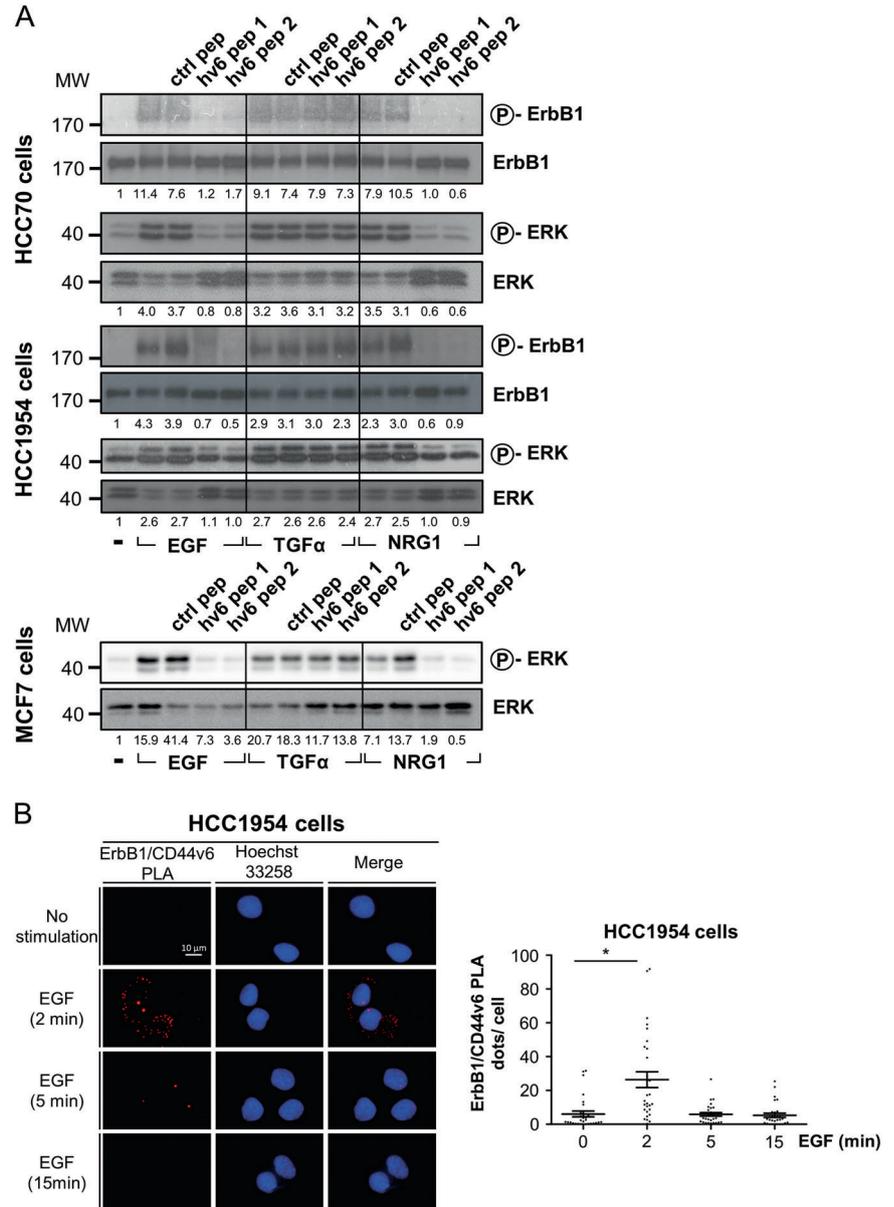
CD44v6 plays a major role in tumor progression and metastasis [3]. The function of CD44v6 in various aspects of tumorigenesis is due, in part, to its ability to act as a co-receptor for RTKs such as MET and VEGFR-2 [20, 8]. Therefore, in a next step we specifically addressed the possible recruitment of CD44v6 isoforms as co-receptors for EGFR family members by specifically downregulating CD44v6 molecules. Indeed, we observed that this downregulation inhibited EGF-induced ERK activation but not that of TGF α in HCC70 cells (Fig. 1a, right side) and HT29 cells (Supplementary Fig. 1C). Interestingly, the activation of ErbB1 by Epregrulin (ER) also depends on CD44v6 as demonstrated for HCC70 (Fig. 1b) and HT29 cells (Supplementary Fig. 1D).

Of note, the CD44v6 antibody detects similar bands to those detected by the pan CD44 antibody suggesting that most CD44 isoforms expressed by HCC70 cells contain the exon v6. The main band running at 130 kDa contains the exon v6.

As mentioned above, EGFR ligands induce several ErbB receptor pairs (Supplementary Fig. 1A and [18]). In order to test whether ErbB1 homo- or heterodimers require CD44 for activation, we used the BSp73AS pancreatic cancer cells that do not express any EGFRs and transfected them exclusively with ErbB1 (Fig. 2). Since the BSp73AS cells express only CD44s we also used the ASs6 cells that express in addition CD44v6 [21]. Indeed, in the ErbB1-transfected BSp73AS cells, activation of ErbB1 by EGF was not possible whereas activation by TGF α could take place (Fig. 2a left side). In ErbB1 transfected ASs6 cells, however, EGF induced both its authentic receptor and ERK (Fig. 2a right side). A similar experiment performed with ER indicated that this growth factor also requires CD44v6 for its activation (Fig. 2b).

To confirm the requirement of CD44v6 in the EGFR family activation, we used CD44v6 peptides specifically targeting CD44v6 and shown to block the co-receptor function of CD44v6 for several RTKs [22, 8].

Fig. 3 The requirement of CD44v6 in EGFR signaling is ligand dependent. **a** Serum-starved HCC70, HCC1954 and MCF7 cells were pre-incubated for 10 min with 100 ng/ml of CD44v6-specific peptides (hv6 pep 1 refers to a 5 mer, hv6 pep 2 to a 14 mer) or a control peptide. Afterwards the cells were induced with 20 ng/ml of EGF, TGF α or NRG1 and lysed. The cell lysates were resolved by SDS-PAGE. Western-blotting was used to detect EGF-induced, TGF α -induced, and NRG1-induced ErbB1 and ERK-kinase phosphorylation and thereby activation. To confirm the equal loading of the samples, the membrane was stripped from all antibodies and re-probed with an antibody against all ErbB1 or ERK proteins respectively. Quantification of the intensity of the bands was done using ImageJ and is indicated underneath the blots. **b** HCC1954 cells were treated with EGF as indicated. Representative pictures of ErbB1/CD44v6 complexes visualized by a Proximity Ligation Assay (PLA) (see Materials and methods) are shown; interactions between ErbB1 and CD44v6 are shown as red spots. The number of red spots was quantified by Image J software on 30 photos by condition. A one-way ANOVA analysis followed by Bonferroni test was performed between the different conditions. **p*-value < 0,001



Besides the triple negative HCC70 and hormone receptor negative HCC1954 cells, we also tested the MCF7 cell line, a luminal A subtype expressing hormone receptors and ErbB1 [23]. Furthermore, we included NRG1 that specifically activates ErbB3 and ErbB4 containing receptor heterodimers including other family members like ErbB1 (Supplementary Fig. 1A and [18]). Prior to induction with EGF, TGF α and NRG1, cells were treated with a CD44v6 peptide where indicated (Fig. 3a). The CD44v6 peptide blocked EGF- and NRG1-induced ErbB1 activation and downstream signaling to ERK in all 3 cell lines. In contrast, no effect was observed on TGF α -induced activation of ErbB1 (Fig. 3a).

To test whether CD44v6 and ErbB1 were in direct contact we used the proximity ligation assay (PLA). A

complex between these molecules was detectable in HCC1954 cells (Fig. 3b) and as well in HCC70 and MCF7 cells (Supplementary Fig. 3A, B).

A CD44v3 heparin-sulfated isoform is recruited by HB-EGF for activation of EGFR

We expanded our studies to HB-EGF, a heparin-binding growth factor [24] that binds ErbB1 and ErbB4 (Supplementary Fig. 1A). HB-EGF also binds CD44v3, the only CD44 isoform that is heparin-sulfated [10]. To test whether heparin-sulfate is required for HB-EGF-induced signaling, we treated the breast cancer cells with heparinase and measured the impact on ERK phosphorylation upon HB-EGF treatment (Fig. 4b). After 3 h of incubation with

heparinase, HB-EGF-induced activation of ERK was blocked in MCF7, (Fig. 4b), HCC70 and HCC1954 cells (Supplementary Fig. 4A). In contrast, EGF signaling was not affected by the heparinase treatment.

To directly address a possible requirement of CD44v3 for HB-EGF-mediated ERK induction in MCF7 cells, we downregulated CD44v3 using siRNA and tested the impact on HB-EGF-induced ERK activation. Indeed, upon downregulation of CD44v3 expressing isoforms the activation of ERK was blocked (Fig. 4c). In addition, MCF7 cells were serum starved, pre-incubated with the CD44v6-specific peptide or a control peptide (Fig. 4d) and induced with either EGF (as control) or HB-EGF. HB-EGF-induced signaling was not inhibited by the CD44v6 peptide, in contrast to EGF-induced signaling (Fig. 4d).

In HCC70 cells as well, downregulation of CD44v3 by siRNA blocked HB-EGF-induced activation of ERK (Supplementary Fig. 4B). No effect was observed on TGF α -

induced activation of ERK. However, in contrast to MCF7 cells, in this cell line also EGF-induced signaling was inhibited upon transfection of CD44v3 siRNA. This is probably due to the fact that the exons v3 and v6 are present on the same mRNA in HCC70 cells (run-off analysis, Supplementary Fig. 2A).

Of note, in ErbB1 transfected ASs6 cells, expressing CD44s and CD44v6, HB-EGF did not activate its receptor, in contrast to EGF (Fig. 4a). However, in ErbB1 transfected ASv1-v10 cells that express a CD44 isoform including all variant exons, the induction by HB-EGF was possible (Fig. 4a).

The CD44v6 ectodomain competes with endogenous CD44v6 for binding of EGF and NRG1

Since CD44v6 is a collaborating partner for EGF-dependent and NRG1-dependent EGFR activation, we used an indirect approach to test whether these ligands bind to CD44v6. We tested a potential competition between the CD44v6 ectodomain and endogenous CD44v6 for binding to these growth factors (Fig. 5a) as previously shown for HGF [25].

We therefore pre-incubated the breast cancer cells with the CD44v6 ectodomain or the CD44s ectodomain as a control (Fig. 5a, Supplementary Fig. 5A), and subsequently induced with EGF, TGF α and NRG1. Indeed, the CD44v6 ectodomain inhibited EGF- and NRG1- induced activation of ERK whereas activation of ERK by TGF α was not disturbed in HCC70, HCC1954 and MCF7 cells. Furthermore,

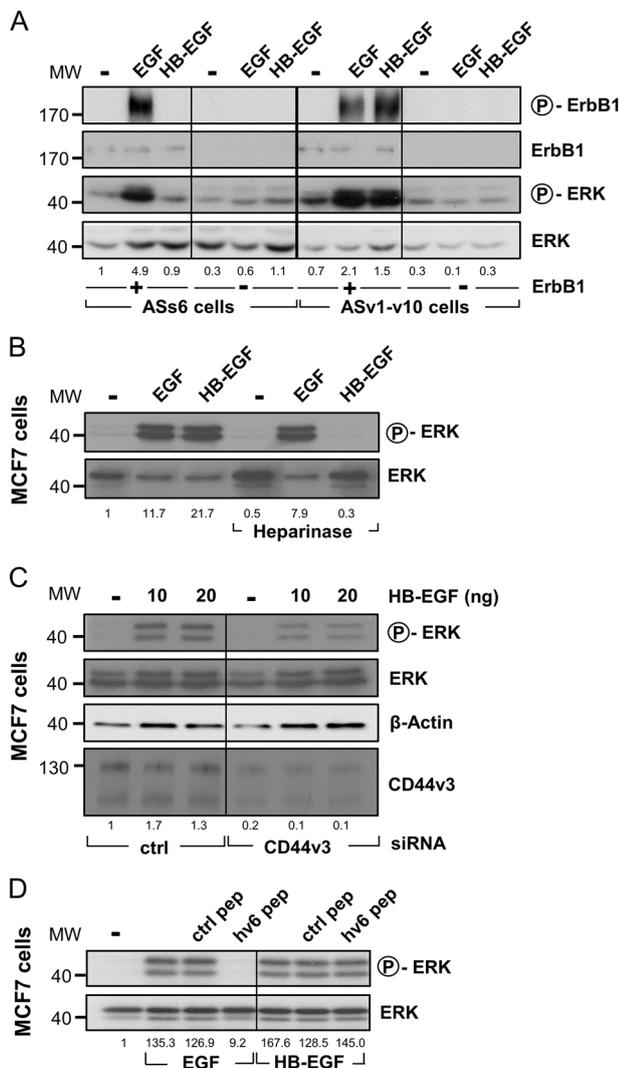


Fig. 4 HB-EGF induced EGFR signaling requires CD44v3 and heparin-sulfate. **a** BspASs6 and BspASv1-v10 cells were transfected with the ErbB1 receptor expression vector or a control vector by means of the retroviral ecopack 2-293 system as described in Material and Methods. Afterwards the transfected cells were starved and induced with 20ng/ml of EGF or HB-EGF. The cell lysates were resolved by SDS-PAGE. Western-blotting was used to detect EGF- and TGF α -induced ErbB1 and ERK phosphorylation. **b** Serum-starved MCF7 cells were pre-incubated with heparinase at a concentration of 6 U/ml for 3 h. The cells were then induced with 20ng/ml of EGF, HB-EGF or left untreated. The cells were lysed and lysates were resolved by SDS-PAGE. A Western blot was performed to detect phosphorylated ERK kinase. **c** MCF7 cells were transfected with CD44v3 specific siRNA or control siRNA as indicated. 48 h after transfection the cells were serum-starved for 24 h and induced with 10 or 20 ng of HB-EGF or left untreated. Afterwards the cells were lysed and lysates were subjected to SDS-PAGE and Western blotting. The knock-down of CD44v3 was detected by a specific antibody against CD44v3. Phosphorylated ERK was used as a read-out for activated EGFR signaling. **d** Serum-starved MCF7 cells were pre-incubated with 100 ng/ml of CD44v6-specific peptide or a control peptide and either induced with 20 ng/ml of EGF, HB-EGF or left untreated. The cells were lysed and lysates were resolved by SDS-PAGE. A Western blot was performed to detect phosphorylated ERK kinase. In all cases, total ERK was (and where indicated β -Actin) used as loading control and quantification of the intensity of the bands was done using ImageJ. Numbers reflecting the quantification are indicated underneath the blots

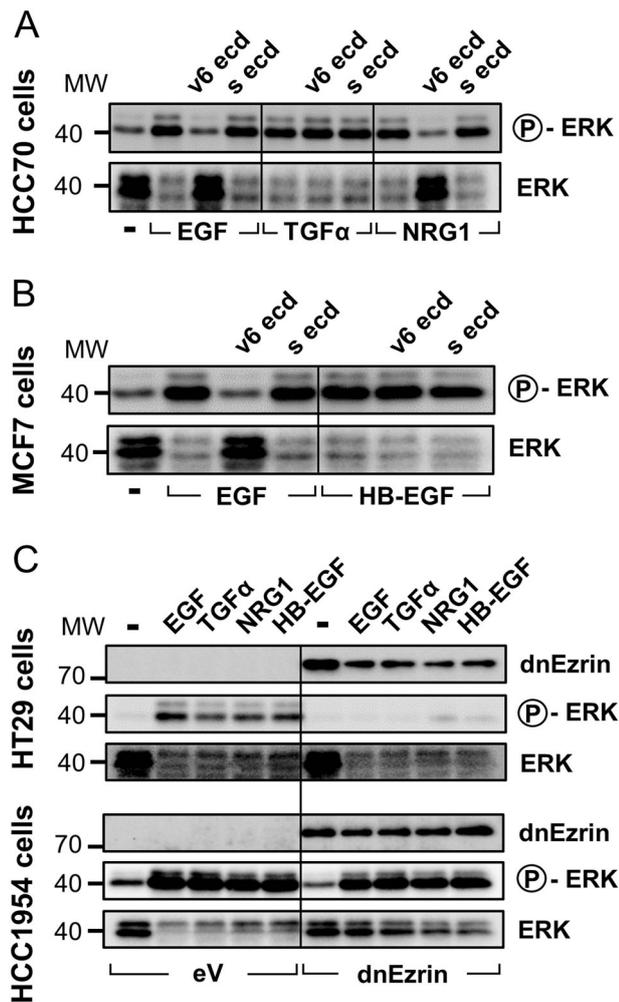


Fig. 5 EGF-induced and NRG1-induced EGFR signaling is blocked by the CD44v6 ectodomain and EGFR ligands are dependent on ezrin in HT29 cells but not in HCC1954 cells. **a** Serum-starved HCC70 cells were pre-incubated with 50 ng/ml of CD44v6 or CD44s ectodomain (v6 ecd; s ecd) and either induced with 20 ng/ml of EGF, TGF α or NRG1 or left untreated. The cells were lysed and lysates were resolved by SDS-PAGE. A Western blot was performed to detect phosphorylated ERK kinase. Total ERK was used as loading control. **b** Serum-starved MCF7 cells were pre-incubated with 50 ng/ml of CD44v6 or CD44s ectodomain (v6 ecd; s ecd) and either induced with 20 ng/ml of EGF, HB-EGF or left untreated. The cells were lysed and lysates were resolved by SDS-PAGE. A Western blot was performed to detect phosphorylated ERK kinase. **c** HT29 and HCC1954 cells were transfected with a dominant-negative ezrin (dnEzrin) construct carrying a VSVG tag. An empty vector (eV) was used as a control. The cells were serum starved and incubated with 20 ng/ml of EGF, TGF α , NRG1, HB-EGF or left untreated. The cells were lysed and lysates were resolved by SDS-PAGE. A Western blot was performed to detect phosphorylated ERK kinase. The VSVG tag of the dnEzrin construct was detected by means of an anti-VSVG antibody. Total ERK was used to confirm equal loading of the lysates

pre-incubation of MCF7 cells with the v6 ectodomain had no effect on HB-EGF induction in contrast to EGF (Fig. 5b, Supplementary Fig. 5B), in agreement with the data shown

in Fig. 4. Of note, the CD44s ectodomain had no effect whatsoever.

EGFR ligands are dependent on ezrin in HT29 but not in HCC1954 cells

CD44 binds intracellularly to the ERM protein ezrin that in turn binds to the actin cytoskeleton [21, 26]. To investigate if ERM proteins are required for EGFR signaling, a VSVG tagged dominant-negative ezrin construct lacking the binding site for the actin cytoskeleton [27], was transfected. This dominant-negative ezrin construct completely blocked all ligand-induced EGF receptor activation as no downstream signaling to ERK could be detected upon ligand activation of EGFRs in HT29 cells (Fig. 5c). Strikingly, even though it is independent of any CD44 isoform, TGF α also requires ezrin for downstream signaling. A control transfection with an empty vector had no influence on signaling.

Surprisingly, no effect on downstream signaling of the dominant negative ezrin construct on any EGF ligand induction could be seen in the human breast cancer cell line HCC1954 (Fig. 5c).

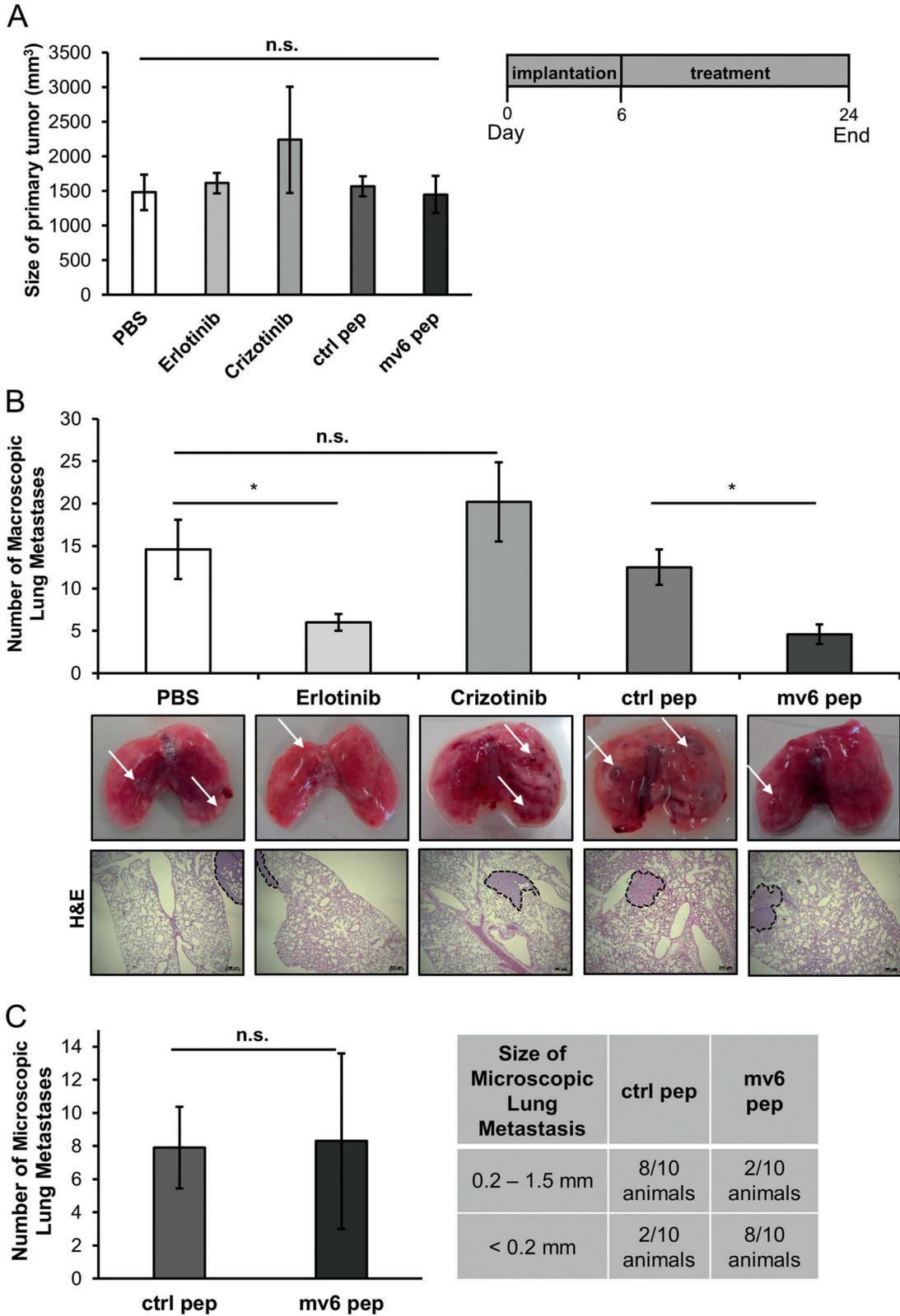
EGFR dependent breast cancer metastasis is dependent on CD44v6

To test the consequence of the collaboration between CD44 isoforms and EGFR in vivo in cancer progression, we used the murine 4T1 tumor model. This is a well-established syngeneic, orthotopic mouse model for stage IV human breast cancer [28]. The advantage of this model in contrast to other human xenograft models, is that 4T1 tumor cells spontaneously metastasize already 3–6 weeks after injection to the lungs. These 4T1 cells belong to the triple-negative subtype of breast cancer, and cancer progression is therefore highly dependent on ErbB1 [28]. 4T1 cells not only express CD44v6 (Supplementary Fig. 6A), but EGF-induced migration could also be significantly inhibited by blocking CD44v6 via a mouse specific CD44v6 peptide in a Boyden Chamber Assay (Supplementary Fig. 6B). A control peptide showed no effect (Supplementary Fig. 6B). 4T1 cells were orthotopically injected into the 4th mammary fat pad of Balb/c mice, and tumor growth and metastasis were analyzed (Fig. 6). To test whether tumor progression was EGF-dependent, 6 days after implantation some of the injected animals were treated orally 5 times per week for 3 weeks with 0.05 mg/g Erlotinib, a specific inhibitor of ErbB1 [29]. Importantly, since the RTK MET might also be involved in tumor progression in breast cancer [30], one animal group was treated with 0.025 mg/g of the MET inhibitor Crizotinib [31]. As a control, 5 animals were treated in the same way with PBS. After three weeks of treatment, size

ANNEXES

measurements of the primary tumor using a calliper revealed that the volume of the primary tumors was not affected by the two inhibitors (Fig. 6a). Erlotinib, however,

led to a significant decrease in the number of lung metastases (Fig. 6b). Indeed, around 6 metastases per lung were counted in this group as compared to the PBS control group,



◀ **Fig. 6** Metastasis of 4T1 breast cancer cells is dependent on CD44v6. **a** $1 \cdot 10^6$ 4T1 cells were injected orthotopically into the 4th mammary fat pad of Balb/c mice. One week after implantation 5 animals per group were treated orally 5 times per week over a period of 3 weeks with either PBS, 0.05 mg/g Erlotinib or 0.025 mg/g Crizotinib. Five animals per group were injected i.p. with 20 μ g of control or mouse CD44v6 (mv6) peptide. The mice were sacrificed and tumor volume was measured using a caliper. Statistics were done using a student's *t*-test *n.s* not significant. **b** At the end of the experiments, the mice were sacrificed and macroscopic lung metastases were counted (graph). The lung tissue (example of metastases marked with an arrow) was analyzed via H&E staining. The metastases are marked with a dotted line. The scale bar corresponds to 200 μ m. Significance was determined via a student's *t*-test *n.s* = not significant; * = *p*-value < 0.05. **c** The lungs were sectioned and analyzed for micrometastases (graph). Statistics were done using a student's *t*-test *n.s* not significant. The size of the metastases is represented in a table (right side)

showing around 15 metastases/animal, and the Crizotinib treated animals showing 20 metastases/per animal (Fig. 6b).

Since metastasis of 4T1 cells appears to be dependent on ErbB1, we investigated the contribution of CD44v6 in this model with the help of the CD44v6 blocking peptide. We therefore implanted Balb/c mice with 4T1 cells into the 4th mammary fat pad. At 6 days after implantation, animals were injected intra-peritoneally (i.p.) with an unspecific control peptide or a specific mouse CD44v6 (mv6) peptide (Fig. 6). The primary tumor volume was not affected by the CD44v6 peptide treatment (Fig. 6a). Also in this case, the 4T1 cells highly metastasized to the lung with an average of 12 metastases per lung in the control peptide treated group (Fig. 6b). The inhibition of CD44v6 by the CD44v6 peptide led to a significant decrease in the number of lung metastases, with around 4 metastases occurring per lung (Fig. 6b), comparable to the Erlotinib results.

In addition to macroscopic metastases detectable at the surface of the lungs, smaller metastases were found in the lung parenchyme (Fig. 6c). Interestingly, the total number of these smaller metastases was not affected by blocking CD44v6 (Fig. 6c). However, in the CD44v6 peptide treated group, 8 out of 10 animals showed metastases smaller than 0.2 mm in contrast to 8 out of 10 animals in the control peptide treated group (Fig. 6c table).

The activation of the EGFR receptors, in particular of ErbB1 and ErbB2, is often deregulated in human breast cancers [32]. Our in vitro and in vivo data suggest that the co-receptor function of CD44v6 for ErbB1 might be involved in breast cancer. To confirm the relevance of these studies for human breast cancer, we tested breast cancer patients with lymph node metastases for the presence of complexes between CD44v6 and ErbB1. Proximity ligation assays between CD44v6 and ErbB1 were performed on samples from a cohort of forty patients with breast cancer (Fig. 7a). A significant correlation was identified between the presence of these ErbB1/CD44v6 complexes and

patients with lymph node metastases. Data analyses of this cohort also showed that ErbB1/CD44v6 complexes were positively correlated with Her2 but negatively correlated with triple negative status (Supplementary Table 1).

Discussion

Although cell surface receptors like RTKs or GPCRs (G-protein coupled receptors) bind their ligand with high affinity, the activation and signaling processes are not exclusively dependent on the ligand/receptor pair. In most cases, signaling is induced at the cell surface within complexes comprising multiple receptors and co-receptors [4]. A salient example is the Wnt pathway, in which Wnt or LRP6 "signalosomes" have been described. LRP6 is one of the Frizzled co-receptors which is crucial for activation of β -catenin signaling upon overexpression [33]. Multiple examples of co-receptors for RTKs have been reported [4]. Such partners can be cell adhesion molecules (CAMs) such as N-CAMs, cadherins, plexins or CD44 and many more that have all been shown to control or amplify RTK signaling [4]. Integrins can also directly regulate growth factor-receptor (GFR) signaling even acting prior to receptor binding or in the absence of GFs [34].

In this study, we showed that various CD44 isoforms are recruited by the EGFR family of RTKs (scheme in Fig. 7b). Moreover, we demonstrated that this recruitment of CD44 isoforms by growth factor (GF)/GFR pairs is ligand-dependent. Indeed, EGF, NRG1, and ER are dependent on CD44v6 whereas HB-EGF recruits CD44v3. In contrast, TGF α does not seem to require CD44 at all in the cell lines we tested. These data suggest that certain CD44 isoforms fulfill specific functions required for a defined ligand. However, the functions provided by CD44 isoforms are not needed by all growth factors and, in some specific cases other cell adhesion molecules might be recruited as suggested by the independence of TGF α towards CD44.

Interestingly, a study by Ellis et al. reported that the two EGFR ligands, EGF and TGF α , although they are homologous in structure and activate the same receptor, induce migration by different signaling intermediates. Indeed, the motogenic activity of EGF depends on CD44, while TGF α collaborates with the integrin α v β 3 [35]. Signaling is mediated by different intermediates: p70S6K for EGF and phospholipase C for TGF α . However, in this paper, the contribution of specific CD44 isoforms was not addressed. Of note, integrins such as β 4 interact with ezrin similarly to CD44 [36]. This might explain why the TGF α -dependent signaling, although independent of CD44, is inhibited in the HT29 cells by the dominant negative ezrin (Fig. 5c).

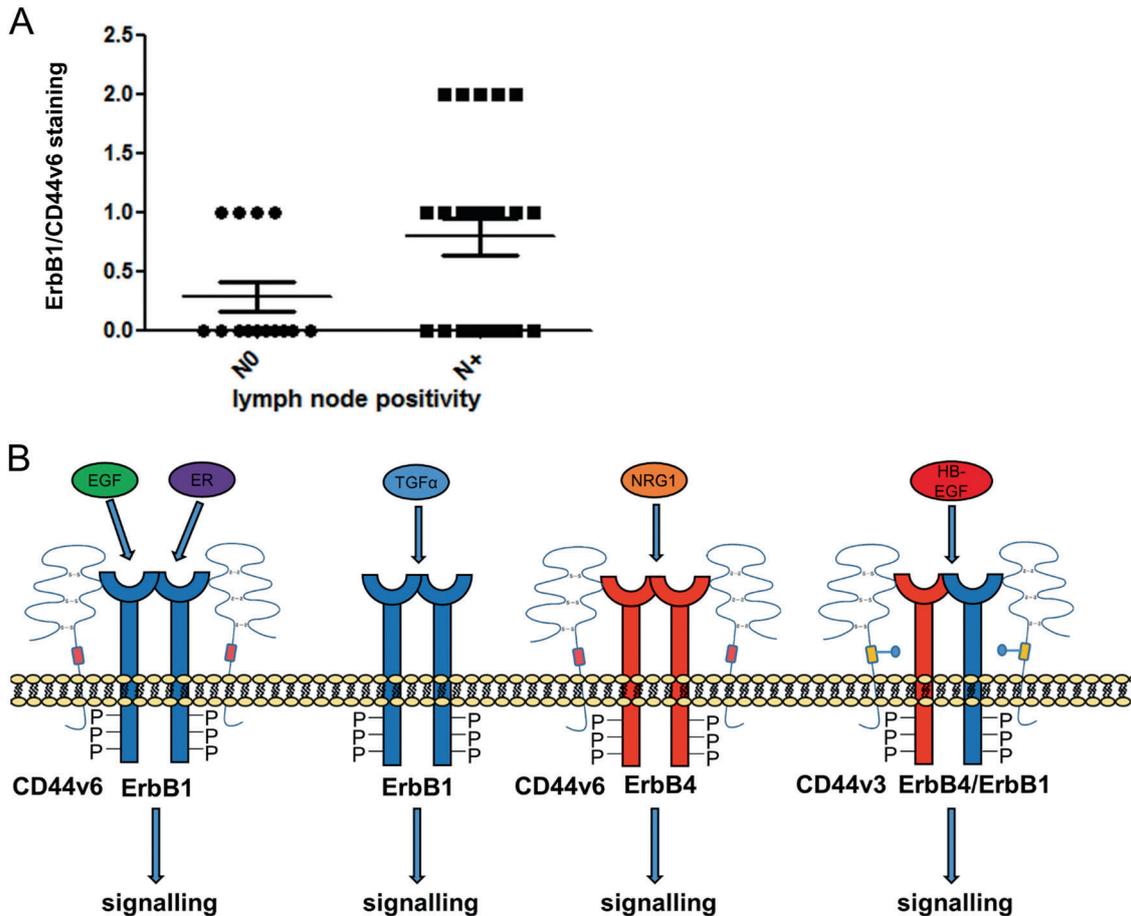


Fig. 7 Correlation of ErbB1/CD44v6 complexes in breast cancer patients with lymph node metastases. **a** Brightfield PLA of ErbB1/CD44v6 was performed on Tissue Microarrays of paraffin embedded breast tumors. PLA signal was scored from low (0) to high (2). PLA intensity was then correlated with lymph node positivity ($n = 38$; $p =$

0.0342). **b** Scheme: EGF, ER, and NRG1 are dependent on CD44v6 to induce EGFR signaling whereas TGF α is independent of all CD44 isoforms. HB-EGF-induced signaling is dependent on CD44v3 and its heparin sulfate chains

Other reports have suggested a modulation of TGF α -induced EGFR activation by another glycosylated protein called MUC1, a member of heavily O-glycosylated proteins found at the apical surface of the normal ductal epithelium. The development of hyperplasia and breast cancer in WAP-TGF α mice was shown to be dependent of the presence of MUC1 [37]. Interestingly, an association between MUC1 and ezrin was detected, although the nature of this association has not been characterized [38].

So what are the specific functions of CD44 isoforms that might be needed for GF-RTK complexes? One possible function might be the clustering of ligands in the vicinity of RTKs. The network formed by CD44 and hyaluronan has been proposed to function as a reservoir for growth factors [1, 39]—similar to syndecans, which have also been shown to collect FGFs for activation of FGFR [38]. Clustering of CD44 and GFs might also occur in specialized membrane compartments, where the signal could be concentrated [40].

Another property of CD44 is its ability to connect to the cytoskeleton in most instances via ERM proteins [6], thereby triggering signaling. However, ERMs might not be required for EGFR signaling in all breast cancers; in the breast cancer cell lines in our study, a dominant negative form of ezrin did not interfere with EGF-induced EGFR signaling. This is surprising since the same construct inhibits EGFR signaling in HT29 cells. Therefore, ERMs might not be the only cytoplasmic partners involved in CD44-dependent RTK signaling. An alternative cytoplasmic partner of CD44 might be ankyrin [41]. Interestingly, the binding of ankyrin to the CD44 cytoplasmic domain is involved in metastasis of mammary tumors.

Also, ezrin has previously been suggested to play a role in breast cancer progression. In a 3D matrigel model using MCF10A and MDA-MB-231 cells, ezrin silencing decreased invasive potential [42]. In breast cancer patients high ezrin expression is also linked to poorer outcome [43]. Nevertheless, compared to breast cancer ezrin expression is

significantly higher in cancers of mesenchymal origin and in prostate cancer [43].

What could this selective association between EGF ligands and CD44 isoforms mean for tumor progression and metastasis? Our *in vivo* data suggest that the inhibition of CD44v6 might have an impact on triple negative breast tumors where metastasis depends on ErbB1. CD44v6 seems to be involved in the growth of metastases, not in their initiation since the size of metastases is affected but not the overall number.

In addition, we observed an increased number of ErbB1-CD44v6 complexes in breast cancer patients with lymph node metastases. This suggests that CD44v6 might be a therapeutic target in breast cancer. However, previous studies that tested the correlation between the expression of CD44 and various types of breast cancers were contradictory [44, 45]. These discrepancies might be due, in part, to the poor quality of the isoform-specific antibodies or to the small sample number, but also to the fact that additional molecules have to be included in the screens. Indeed, our results suggest that screens focusing on co-expression of CD44v6, EGF, and ErbB1, or on co-expression of CD44v3, HB-EGF, and ErbB1, might be useful.

Material and methods

Cell culture

Human HCC70 and HCC1954 (American tissue culture collection, ATCC, Wesel, Germany) and murine breast cancer cells from BALB/cfC3H mice (4T1; ATCC) were grown in RPMI-1640 Medium (ATCC® 30-2001™) with 10% FBS (FBS Gold; PAA Laboratories, Pasching, Austria). MCF7 human breast cancer cells (ATCC, Wesel, Germany), HT29 human colon adenocarcinoma cells (a gift from Alain Zweibaum, Institute National de la Sante et de la Recherche Medicale, Paris, France) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen, Karlsruhe, Germany) with 10% FBS (FBS Gold; PAA Laboratories). Rat pancreatic carcinoma cells BSp73AS (AS) and its transfectants BSp73ASs6 (ASs6) and BSp73ASv1-v10 (ASv1-v10) were already described [21] and grown in RPMI (Invitrogen) plus 10% FBS. All cell lines were mycoplasma free.

Antibodies and other reagents

Antibodies against mouse CD44v6 (9A4, ACT35, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), human CD44v6 (VFF18, BMS125FL, Boehringer Ingelheim, Biberach, Germany), human CD44 (Hermes3, Gift from Sirpa Jalkanen, Turku, Finland), CD44v3 (BBA11, R&D systems,

Wiesbaden, Germany), ERK-1 (K-23, sc-94; Santa Cruz, Heidelberg Germany), phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204, 9101L, Cell Signaling Technology, Beverly, England), phospho-EGFR (3777S, Cell signaling), EGFR (4267S, cell signaling), VSVG (sc-66180, Santa Cruz) and β -Actin (sc-1616, Santa Cruz) were used. Secondary antibodies labeled with horseradish peroxidase (HRP) were from Dako, Hamburg, Germany (rabbit P0448, mouse P0447). Human EGF, ER, TGF- α , NRG1, and HB-EGF were from R&D Systems. The peptides have already been described [22, 8] (Patent WO2014079940A1) and their sequences are: rat CD44v6 5mer-NEWQG, rat CD44v6 14mer-KEKW

FENEWQGKNP, human CD44v6 5mer-NRWHE, human CD44v6 14mer-KEQWFGNRWHEGYR, mouse CD44v6 5mer-NGWQG and mouse CD44v6 14mer-QETWFG NGWQGKNP.

Plasmids and constructs

The CD44s and CD44v6 ectodomains were described previously [25]. The ezrin mutant deleted in the last 29 amino acids at the N-terminus (ezrin-DN) and corresponding empty vector pCB6 were described previously [27]. The sequence of human ErbB1 cloned into pBabe puro [46] was a gift from Nancy Hynes, FMI, Switzerland.

Transfection procedures

siRNA transfection was performed using HiPerFect (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol using 5nM of CD44 pan siRNA (pool of two: (5'-CTGAAATTAGGGCCCAATT-3' 5'-AATGGTG-CATTTGGTGAAC-3' Qiagen) or 5nM CD44v6 siRNA (pool of two: 5'-AGUAGUACAACGGAAGAAATT-3', 5'-GGAUAUCGCCAAACACCCATT-3' Qiagen) or CD44v3 siRNA (pool of two: (5'-AGGCAUUGAUGAUGAUGAAUU-3', 5'-UGAAGAUGAAAGAGACAGAAUU-3' Qiagen) or control siRNA (pool of two: 5'-UAAU-GUAUUGGAACGCAUAAUU-3' 5'-AGGUAGU-GUAAUCGCCUUGUU-3' Qiagen). BSp73AS cells transfection of ErbB1 was performed with the packaging cell line Etopack-2-293 using the CalPhos Mammalian Transfection kit (Clontech, Mountain View, California, USA). After 48 h, the medium containing the virus was collected and added to BSp73AS cells.

Western blotting analysis

Cells were lysed in boiling SDS-sample buffer (125 mM TrisHCl pH 6.8; 4% SDS; 20% Glycerol; 0.01% bromphenol blue) containing 100 mM dithiothreitol (DTT) and subjected to SDS-PAGE and western blot. Where

necessary, blots were stripped (62.5 mM Tris, pH 6.8; 2% SDS; 0.8% DTT; 1h at 55 °C) and incubated with loading control antibodies. Blots were stained using the enhanced chemoluminescence system (ECL; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany). Where indicated, protein bands were quantified using ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Western blot pictures show one representative out of at least three independent experiments.

Activation of EGFR and ERK

Cells were serum-starved for 24 h, and induced with 20 ng/ml of growth factor for 5 min at 37 °C. Where indicated, the cells were treated with either CD44s ectodomain or CD44v6 ectodomain or with the CD44v6 peptide or a control peptide for 5 min at 37 °C prior to induction. Activated EGFR and ERK was determined using Western blot analysis as previously described.

Heparinase treatment

Cells were incubated with heparinase II (6 U/ml) for 3 h and afterwards treated directly with the indicated growth factors. Cells were washed with cold PBS and lysed in 2× Laemmli buffer.

Boyden Chamber Assay

2×10^5 4T1 cells were seeded in the upper part (insert) of a Boyden chamber. Twenty nanogram per milliliter of growth factor was added to the lower part of the Boyden chamber and 100 ng/ml murine CD44v6 peptide or a control peptide was added to the upper part of the chamber. On the following day, cells on the insert (bottom) were stained with 0.5% crystal violet and the optical density of the solution of technical triplicates was measured in a photometer at OD 600. Quantification of 3 independent experiments was performed and a one-tailed Student's *t*-test was done.

Exon-specific run-off PCR

The exon specific RT-PCR was performed as described previously [21, 47]. All primers were identical to those used by König et al. 1996.

Animal experiments

8 weeks old female Balb/c mice (Harlan Roßdorf, Germany) were housed under specific pathogen-free conditions in facilities approved by the Regierungspräsidium

Karlsruhe. All animals were handled according to German regulations for animal experimentation. Experiments were authorized by the Regierungspräsidium (35-9185.817G-192/10 and 35-9185.817G-106/09). 1×10^6 murine 4T1 cells per mouse were diluted in 100 µl PBS and injected into the 4th mammary fat pad. One week after injection, 5 mice were either injected intraperitoneally 3 times per week with 20 µg of the murine CD44v6 peptide diluted in 100 µl PBS or with 20 µg of control peptide diluted in 100 µl PBS or treated orally 5 times per week with 0.05 mg/g Erlotinib or 0.025 mg/g Crizotinib. After 3 weeks, mice were sacrificed and tumors and lungs were extracted and metastases were counted by one not-blinded investigator. As all treated animals were analyzed, no randomization was needed.

Histology

For histomorphologic analysis paraffin-embedded lung sections were stained with H&E. The presence and extension of metastatic deposit was assessed.

In situ proximity ligation assay (PLA)

PLA were performed on paraformaldehyde-fixed cells and paraffin-embedded tumor xenografts with primary antibodies following manufacturer's instructions (Duolink PLA, Sigma-Aldrich). Number of red spots on 30 photos by condition on PLA images (fluorescence dots) were acquired using a fluorescence microscope and analyzed with NIS-Elements BR and Image J software. A one-way ANOVA analysis followed by Bonferroni test was performed between the different conditions *P*-value < 0,001. For brightfield PLA, commercially available tissue microarrays of human tumors from SuperBioChips (CBA4) were stained and scored as no, low, medium and high signal in double blind analysis by TRA and RL. Statistical analyses were performed using PRISM graph Pad software. Difference significance was determined by unpaired one-tailed *t*-test. *P* value < 0.05 was considered as significant.

Statistical analysis

For animal experiments the minimum sample size was calculated at $n = 5$ using G power with the α level of 0.05 assuming a 50% reduction of the number of metastases with CD44v6 peptide treatment. For all experiments the difference significance of mean \pm s.d. was assessed by one-tailed Student's *t*-test for equal or unequal variances, or one-way ANOVA as appropriate accepting an $\alpha = 0.05$, after Shapiro-Wilk-Test for normality of distribution.

Acknowledgements The authors are very thankful to Selma Huber and the animal facility of the Institute of Toxicology and Genetics for their excellent work and help with the animal experiments. This work was supported by a grant from Mildred Scheel Foundation.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest These authors disclose the following: V.O.-R. is a co-founder and shareholder of amcure GmbH, which developed a CD44v6 targeting peptide for clinical study. The remaining authors declare that they have no competing interests.

References

- Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:33–45.
- Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: Structure, function and association with the malignant process. In: Vande Woude GF, Klein G, editors. *Advances in Cancer Research*. 71. San-Diego; 1997. p 243–318.
- Orian-Rousseau V. CD44 acts as a signaling platform controlling tumor progression and metastasis. *Front Immunol* 2015;6:154.
- Orian-Rousseau V, Ponta H. Adhesion proteins meet receptors: a common theme? *Adv Cancer Res* 2008;101:63–92.
- Orian-Rousseau V, Sleeman J. CD44 is a multidomain signaling platform that integrates extracellular matrix cues with growth factor and cytokine signals. *Adv Cancer Res* 2014;123:231–54.
- Orian-Rousseau V, Morrison H, Matzke A, Kastilan T, Pace G, Herrlich P, et al. Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin. *Mol Biol Cell* 2007;18:76–83.
- Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur J Cancer* 2010;46:1271–7.
- Matzke-Ogi A, Jannasch K, Shatirishvili M, Fuchs B, Chiblak S, Morton J, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis in pancreatic cancer models by interference with CD44v6 signaling. *Gastroenterology*. 2016;150:513–25.e10.
- Olaku V, Matzke A, Mitchell C, Hasenauer S, Sakkaravarthi A, Pace G, et al. c-Met recruits ICAM-1 as a coreceptor to compensate for the loss of CD44 in Cd44 null mice. *Mol Biol Cell* 2011;22:2777–86.
- Bennett KL, Jackson DG, Simon JC, Tanczos E, Peach R, Modrell B, et al. CD44 isoforms containing exon v3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol* 1995;128:687–98.
- Sherman L, Wainwright D, Ponta H, Herrlich P. A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth. *Genes Dev* 1998;12:1058–71.
- Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front Immunol* 2015;6:201.
- Tsatas D, Kanagasundaram V, Kaye A, Novak U. EGF receptor modifies cellular responses to hyaluronan in glioblastoma cell lines. *J Clin Neurosci* 2002;9:282–8.
- Bourguignon LY, Zhu H, Chu A, Iida N, Zhang L, Hung MC. Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation. *J Biol Chem* 1997;272:27913–8.
- Kivisaari AK, Kallajoki M, Ala-aho R, McGrath JA, Bauer JW, Konigova R, et al. Matrix metalloproteinase-7 activates heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2010;163:726–35.
- Lynch CC, Vargo-Gogola T, Martin MD, Fingleton B, Crawford HC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase 7 mediates mammary epithelial cell tumorigenesis through the ErbB4 receptor. *Cancer Res* 2007;67:6760–7.
- Yu WH, Woessner JF Jr, McNeish JD, Stamenkovic I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev* 2002;16:307–23.
- Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341–54.
- Wu WK, Tse TT, Sung JJ, Li ZJ, Yu L, Cho CH. Expression of ErbB receptors and their cognate ligands in gastric and colon cancer cell lines. *Anticancer Res* 2009;29:229–34.
- Todaro M, Gaggianesi M, Catalano V, Benfante A, Iovino F, Biffoni M, et al. CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell* 2014;14:342–56.
- Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* 2002;16:3074–86.
- Matzke A, Herrlich P, Ponta H, Orian-Rousseau V. A five-amino-acid peptide blocks Met- and Ron-dependent cell migration. *Cancer Res* 2005;65:6105–10.
- Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, et al. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer* 2010;4:35–41.
- Cook PW, Mattox PA, Keeble WW, Pittelkow MR, Plowman GD, Shoyab M, et al. A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol Cell Biol* 1991;11:2547–57.
- Volz Y, Koschut D, Matzke-Ogi A, Dietz MS, Karathanasis C, Richert L, et al. Direct binding of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor to CD44v6. *Biosci Rep*. 2015;25...
- Tremmel M, Matzke A, Albrecht I, Laib AM, Olaku V, Ballmer-Hofer K, et al. A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis. *Blood*. 2009;114:5236–44.
- Algrain M, Turunen O, Vaheri A, Louvard D, Arpin M. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J Cell Biol* 1993;120:129–39.
- Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*. 2001; Chapter 20: Unit 20 2.
- Raymond E, Faivre S, Armand JP. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs*. 2000;60:15–23.Discussion 41-2.
- Minuti G, Landi L. MET deregulation in breast cancer. *Ann Transl Med* 2015;3:181.
- Rodig SJ, Shapiro GI. Crizotinib, a small-molecule dual inhibitor of the c-Met and ALK receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Investig Drugs* 2010;11:1477–90.
- Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:177–84.
- Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:767–79.
- Streuli CH, Akhtar N. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J* 2009;418:491–506.
- Ellis IR, Schor AM, Schor SL. EGF AND TGF-alpha motogenic activities are mediated by the EGF receptor via distinct matrix-dependent mechanisms. *Exp Cell Res* 2007;313:732–41.

36. Wan X, Kim SY, Guenther LM, Mendoza A, Briggs J, Yeung C, et al. Beta4 integrin promotes osteosarcoma metastasis and interacts with ezrin. *Oncogene*. 2009;28:3401–11.
37. Pochampalli MR, el Bejjani RM, Schroeder JA. MUC1 is a novel regulator of ErbB1 receptor trafficking. *Oncogene*. 2007;26:1693–701.
38. Bennett R Jr, Jarvela T, Engelhardt P, Kostamovaara L, Sparks P, Carpen O, et al. Mucin MUC1 is seen in cell surface protrusions together with ezrin in immunoelectron tomography and is concentrated at tips of filopodial protrusions in MCF-7 breast carcinoma cells. *J Histochem Cytochem* 2001;49:67–77.
39. Matsuo I, Kimura-Yoshida C. Extracellular modulation of Fibroblast Growth Factor signaling through heparan sulfate proteoglycans in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev* 2013;23:399–407.
40. Ilangumaran S, Borisch B, Hoessli DC. Signal transduction via CD44: role of plasma membrane microdomains. *Leuk Lymphoma* 1999;35:455–69.
41. Bourguignon LY. CD44-mediated oncogenic signalling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6:287–97.
42. Konstantinovskiy S, Davidson B, Reich R. Ezrin and BCAR1/p130Cas mediate breast cancer growth as 3-D spheroids. *Clin Exp Metastasis* 2012;29:527–40.
43. Bruce B, Khanna G, Ren L, Landberg G, Jirstrom K, Powell C, et al. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. *Clin Exp Metastasis* 2007;24:69–78.
44. Diaz LK, Zhou X, Wright ET, Cristofanilli M, Smith T, Yang Y, et al. CD44 expression is associated with increased survival in node-negative invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:3309–14.
45. Foekens JA, Dall P, Klijn JG, Skroch-Angel P, Claassen CJ, Look MP, et al. Prognostic value of CD44 variant expression in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1999;84:209–15.
46. Morgenstern JP, Land H. A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res* 1990;18:1068.
47. König H, Moll J, Ponta H, Herrlich P. Trans-acting factors regulate the expression of CD44 splice variants. *EMBO J* 1996;15:4030–9.

ANNEXE N°2

Article original

ProNGF increases breast tumor aggressiveness through functional association of TrkA with EphA2

Lévêque R. , Corbet C.* , Aubert L.* , Guilbert M., Lagadec C., Adriaenssens E., Duval J., Finetti P., Birbaum D., Magné N., Chopin V., Bertucci F., Le Bourhis X. and Toillon RA.*

* : co-premiers auteurs



Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/canlet

Original Articles

ProNGF increases breast tumor aggressiveness through functional association of TrkA with EphA2

Romain Lévêque^{a,b,1}, Cyril Corbet^{a,b,1,3}, Léo Aubert^{a,b,1}, Matthieu Guilbert^{a,b}, Chann Lagadec^a, Eric Adriaenssens^{a,b}, Jérémy Duval^{a,b}, Pascal Finetti^c, Daniel Birnbaum^c, Nicolas Magné^{d,e}, Valérie Chopin^{b,f}, François Bertucci^c, Xuefen Le Bourhis^{a,b,2}, Robert-Alain Toillon^{a,b,*,2}

^a Inserm, U908, F-59000, Lille, France

^b Univ. Lille, U908 - CPAC, Cell Plasticity and Cancer, F-59000, Lille, France

^c Département D'Oncologie Moléculaire, Institut Paoli-Calmette, CRCM, UMR1068 Inserm, UMR7258 CNRS, Aix-Marseille Université, 13273, Marseille, France

^d Département de Radiothérapie, Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth, 42270, Saint Priest en Jarez, France

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

^f Université de Picardie, 80000, Amiens, France



ARTICLE INFO

Keywords:

EphA2
TrkA
proNGF
Breast cancer

ABSTRACT

ProNGF expression has been linked to several types of cancers including breast cancer, and we have previously shown that proNGF stimulates breast cancer invasion in an autocrine manner through membrane receptors sortilin and TrkA. However, little is known regarding TrkA-associated protein partners upon proNGF stimulation. By proteomic analysis and proximity ligation assays, we found that proNGF binding to sortilin induced sequential formation of the functional sortilin/TrkA/EphA2 complex, leading to TrkA-phosphorylation dependent Akt activation and EphA2-dependent Src activation. EphA2 inhibition using siRNA approach abolished proNGF-stimulated clonogenic growth of breast cancer cell lines. Combinatorial targeting of TrkA and EphA2 dramatically reduced colony formation *in vitro*, primary tumor growth and metastatic dissemination towards the brain *in vivo*. Finally, proximity ligation assay in breast tumor samples revealed that increased TrkA/EphA2 proximity ligation assay signals were correlated with a decrease of overall survival in patients.

All together, these data point out the importance of TrkA/EphA2 functional association in proNGF-induced tumor promoting effects, and provide a rationale to target proNGF/TrkA/EphA2 axis by alternative methods other than the simple use of tyrosine kinase inhibitors in breast cancer.

1. Introduction

Elevated levels of pleiotropic growth factors and their cognate receptor tyrosine kinases (RTK) as well as mutated receptors actively participate to cancer progression and resistance to targeted therapies using tyrosine kinase inhibitors [1,2]. Tumor resistance to specific tyrosine kinase inhibitors may be due to complex cross-talk in terms of receptor interactions and their redundant or diversified downstream signaling partners [1,2]. This underlies the need to better characterize growth factor signaling and RTK cooperation in order to optimize such therapies.

In the case of TrkA signaling networks, elicited by nerve growth factor (NGF), several co-receptors such as p75^{NTR}, ErbB2, and Ret-5 [3–5] have been reported to modulate TrkA-induced biological effects. Moreover, sortilin is known to be involved in TrkA signaling networks under proNGF (precursor of NGF) stimulation. Sortilin, a member of the Vps10p-domain proteins, is mainly known to be involved in vesicular trafficking but it also acts as a membrane receptor for neurotensin and proneurotrophins [6,7]. Although recombinant proNGF has been described to directly bind to sortilin, p75^{NTR} and TrkA, it has been found that, in neuron cells, proNGF induces sortilin/p75^{NTR} complex formation, leading to apoptotic cell death [8]. Further study showed that high

* Corresponding author. INSERM U908 "Cell Plasticity & Cancer", Bâtiment SN3, 3ème étage, Cité scientifique, Université Lille 1, 59655, Villeneuve d'Ascq, France.
E-mail address: robert-alain.toillon@univ-lille.fr (R.-A. Toillon).

¹ The authors have equally contributed to this work.

² Co-senior authors.

³ Current address: Pole of Pharmacology and Therapeutics (FATH), Institut de Recherche Expérimentale et Clinique (IREC), UCLouvain, 53 Avenue Mounier B1.53.09, B-1200 Brussels, Belgium.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.02.019>

Received 16 November 2018; Received in revised form 7 February 2019; Accepted 10 February 2019

0304-3835/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

ratio between p75^{NTR} and TrkA stimulates proNGF-induced neuron apoptosis, while low ratio between p75^{NTR} and TrkA stimulates proNGF-induced survival [9]. ProNGF is also associated with non-neuronal malignancies and its expression has been reported in melanoma, prostate, breast and thyroid cancers [10–13]. In melanoma, proNGF can stimulate cancer cell invasion through p75^{NTR} [12] while in prostate cancer, its expression correlates with aggressiveness and nerve infiltration into the tumor site [11]. In breast cancer, we previously reported high levels of proNGF are correlated with lymph node invasion [10]. In addition, proNGF stimulates breast cancer cell invasion through sortilin and TrkA receptors, independently of p75^{NTR}, leading to the subsequent activation of Src and Akt signaling pathways [10].

Despite the tumor-promoting effects of proNGF, associated signaling pathways still remain fragmentary. Here, we identified EphA2, a membrane receptor tyrosine kinase, as a key element of the proNGF signaling in breast cancer cells. Moreover, increased TrkA/EphA2 proximity ligation assay signals were correlated with a decrease of overall survival in breast cancer patients, further pointing out the importance of TrkA/EphA2 functional association in proNGF-mediated tumor progression. Thus, our results provide a rationale to target proNGF/TrkA/EphA2 axis as a promising therapeutic strategy in breast cancer.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

All breast cancer cell lines were acquired from the American Type Culture Collection (ATCC) except for SUM159-PT, which is from Asterand Bioscience. MDA-MB-231 breast cancer cells stably overexpressing HA-tagged native TrkA (MDA-MB-231 HA-TrkA) or a kinase-dead TrkA were established as previously described [10]. Cells were maintained in Eagle's Minimal Essential Medium (Life Technologies) (MDA-MB-231 and MCF-7 cells), or RPMI 1640 medium (Life Technologies) (HCC-1954, T-47D) supplemented with 10% inactivated FBS (Fetal Bovine Serum) (Hyclone), 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 40 UI/ml penicillin, 40 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycin and ZellShield™ (Biovalley) at 37 °C in 5% CO₂-humidified atmosphere. SUM159-PT were grown in Ham's F12 nutrient mix supplemented with 5% FBS, 10 mM HEPES, 0.1% insulin, 1 mg/ml hydrocortisone, 40 UI/ml penicillin, 40 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycin and ZellShield™ (Biovalley) at 37 °C in 5% CO₂-humidified atmosphere. Before treatment, cells were rinsed twice with PBS, left for 24 h in culture medium supplemented with 0.1% FBS, and then treated with recombinant human non-cleavable proNGF (denoted as proNGF and used at 0.5 nM in all the experiments) (Alomone Labs) or recombinant human mature NGF at 16 nM (Alomone Labs). For some experiments, cells were pre-incubated for 1 h with the TrkA pharmacological inhibitor K252a (10 nM, Calbiochem) or neurotensin (1 µM, R & D systems).

2.2. Transfection

Tumor cells were transfected with 2 nM siRNA using INTERFERin™ transfection reagent (Polyplus transfection) following the manufacturer's instructions. The siRNA sequences used against EphA2 were: GCAAGGAAGUGGUACUGCUGGACUU (from Eurogentec) or GCGUAU CUUCAUUGAGCUCAA [14] compared to a control siRNA sequence (siGFP) GAUGAACUUCAGGGUCAGCTT. For TrkA, a pool of three siRNA sequences (Eurogentec) was used: GAACUGACUGAGCUCUAC, UGGAGUCUCUCUCUGGAA and GCUGCAGUGUCAUGGGCAA.

2.3. Immunoprecipitation and Western blot analysis

Immunoprecipitation and Western blotting experiments were

carried out as previously reported [15]. The primary antibodies used for Western blotting were: anti-sortilin (#612101, BD Biosciences), anti-TrkA (ANT-018, Alomone Labs), anti-EphA2 (clone 1E3, Abnova), anti-HA (Covance), anti-phospho-Akt (Ser-473) (#9271), anti-pan-Akt (#4691), anti-phospho-Src (Tyr-416) (#2105), anti-Src (#2109) and anti-phospho-TrkA (Tyr-674/675) (#4621) (Cell Signaling Technology). For immunoprecipitation studies, anti-HA (12CA5, Roche), anti-sortilin (BAF2934, R&D Systems) and anti-EphA2 (clone C-20, Santa Cruz Biotechnologies) were used.

2.4. Nano-LC-MS/MS Q-Star analysis

MDA-MB-231 HA-TrkA cells were treated with proNGF for 5 or 30 min. Total cell lysates were subjected to immunoprecipitation using anti-HA (Covance). Immunoprecipitated proteins were then separated by 10% SDS-PAGE. After colloidal Coomassie blue staining, bands, which intensities were increased under proNGF stimulation, were cut and peptide digests were extracted from the 1-D gel band and nanoLC-nanoESI-MS/MS analyses were performed on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-Star, Applied Biosystems) equipped with a nano-electrospray ion source coupled with a nano high pressure liquid chromatography system (LC Packings Dionex) as previously described [16]. Identified proteins were classified by Panther software (<http://www.pantherdb.org>).

2.5. In situ proximity ligation assay (PLA)

Cells grown on acid-washed eight-well glass slides (10⁴ cells per well) (Thermo Scientific) in appropriate medium with 5 or 10% FBS for 24 h. After treatment, paraformaldehyde-fixed cells were incubated with 4% BSA (1 h, 20 °C) followed by overnight incubation with primary antibodies [mouse anti-HA, 1:50 (Covance); goat anti-sortilin, 1:50 (R&D systems); rabbit anti-EphA2, 1:100 (Cell Signaling Technology), mouse anti-TrkA, 1:50 (Alomone Labs)]. PLA was performed as recommended by manufacturer's instructions. Briefly, slides were incubated with secondary antibodies complexed with complementary nucleotide sequences for 2 h. The formed DNA circle, resulting from complementary nucleotides was then amplified using fluorescent oligonucleotides. Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) and samples were mounted with fluorescence mounting medium (Dako). PLA images (fluorescent red dots) were acquired using a fluorescence microscope (100X oil immersion objective, λ_{excitation}: 562 nm, λ_{emission}: 624 nm, microscope Eclipse Ti; Nikon) and analyzed with NIS-Elements BR software (Nikon) and Image J.

Tissue microarrays were from SuperBioChips (CBA4) and US BioMax (HBre-Duc150Sur01) allowing analysis in 189 individual tumor samples. For PLA in paraffin-embedded patient tumor samples, primary antibodies anti-TrkA (ANT-018, Alomone Labs) and anti-EphA2 (AF3035, R&D systems) were incubated overnight at 4 °C. Subsequent steps were done according to the manufacturer's instructions. Briefly, slides were incubated with secondary antibodies complexed with complementary nucleotide sequences for 2 h. The formed DNA circle, resulting from complementary nucleotides was then amplified using oligonucleotides labeled with horseradish peroxidase. PLA signal was evaluated according to the number of dots per cell and the number of stained cells in a double-blind analysis (by TRA and DJ). PLA signal < 2 dots/cell was considered as low, PLA signal between 2 and 10 dots/cell was considered as medium, PLA signal > 10 dots/cell was considered as high. Kaplan-Meier curves were obtained by using GraphPad Prism software.

2.6. Clonogenic cell growth

Clonogenic assays were performed as previously described [15]. After siRNA transfection, 2000 cells were seeded in 35 mm Petri dishes and treated with proNGF for 10 days. Colonies were then stained with

crystal violet before counting.

2.7. *In vivo* experiments

All the experiments involving mice received the approval of the local ethic committee and were carried out according to French national animal care regulations. MDA-MB-231 HA-TrkA cells (3×10^6) were subcutaneously injected into six-week old female SCID mice. Two weeks after cell injection, mice were randomized into four groups ($n = 7$), and were treated a total of three times at 3-day intervals. Lestaurtinib (CEP-701; Calbiochem) was suspended in vehicle (40% polyethylene glycol 1000, 10% povidone C30 and 2% benzyl alcohol in distilled water) and injected intraperitoneally (10 mg/kg). siEphA2 (Eurogentec; 7.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) was delivered using *in vivo* jetPEI[®] according to the manufacturer's instructions (Polyplus transfection) and injected subcutaneously near the tumor mass. Tumor volume was determined throughout the experiment by measuring the length (l) and width (w) and then calculated as $\pi/6 \times l \times w \times (l + w)/2$.

For analyses of breast cancer cell dissemination in mice, xenograft experiments were conducted using MDA-MB-231 HA-TrkA cells. The tumors were allowed to develop for 14 days and the mice were then submitted to 5 injections (every 3 days) of either scrambled siRNA, or TrkA- and EphA2-targeting siRNAs alone or in combination (7.5 μg siRNA/mouse). Tumor volume was determined throughout the experiment by measuring the length (l) and width (w) and tumors were allowed to grow up to 2 cm^3 to allow metastasis of cancer cells. After animal sacrifice, lungs, liver and brain were collected and detection of cancer cells in those organs was carried out by evaluating human microglobulin mRNA expression by RT-PCR as previously described [17].

2.8. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM of at least three independent experiments. Two-tailed unpaired Student t-tests, one-way or two-way ANOVA tests (Bonferroni's post-hoc test) and Mann-Whitney tests were used where appropriate.

3. Results

3.1. TrkA is associated with sortilin and EphA2 in proNGF-treated MDA-MB-231 breast cancer cells

In order to decipher TrkA signaling partners under proNGF stimulation, we first performed proteomic analysis in MDA-MB-231 breast cancer cells stably expressing HA-tagged TrkA [10]. Proteins co-immunoprecipitated with HA-TrkA were identified by mass spectrometry analysis (Fig. 1). Individual proteins (985) were identified in selected bands from cells treated with proNGF (5 and 30 min) (Fig. 1A). Using Panther classification software, we observed that most of the identified proteins were implicated in maturation and vesicular trafficking (binding and catalytic activities). Seven percent were related to membrane receptor and signaling (Fig. 1B). As expected, sortilin, the known receptor of proNGF was found to be co-immunoprecipitated with HA-TrkA (Fig. 1C). Interestingly, we found that EphA2, a membrane receptor tyrosine kinase, is also co-immunoprecipitated with HA-TrkA. EphA2 is of particular interest, as it is known to be expressed in breast cancer in which it favors aggressive behavior and metastases formation [18]. We also identified Src, cortactin and p130 Cas (BCAR1, *Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1*), which are reported to act as early effectors in EphA2 downstream signaling pathways [19]. Other proteins such as SHEP1 (SH2D3C, *SH2 domain-containing protein 3C*), PTP-PEST (PTPN12, *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12*) and RIL (PDLI4, *PDZ and LIM domain protein 4*) were also found to be pulled-down with TrkA; these proteins are well known to regulate Src and/or p130 Cas-mediated signaling pathways [20–22]. The other identified proteins including Lasp1 (*LIM and SH3 domain protein 1*),

SNAP23 (*Synaptosomal-associated protein 23*), FHL2 (*Four and a half LIM domains protein 2*), HAX1 (*HCLS1-associated protein X-1*), adducin, MARCKS (*Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) gelsolin, and integrins $\alpha_3\beta_1$ are downstream targets of Src and p130 Cas, which are associated with cytoskeleton remodeling and cell migration [23–28].

To confirm proNGF-induced TrkA association with sortilin and EphA2 in breast cancer cells, we further performed immunoprecipitation assays by using antibodies against HA (-TrkA), sortilin and EphA2, followed by Western blot analysis (Fig. 2A). In the absence of proNGF, none of the three receptors was found to be co-immunoprecipitated. Upon proNGF treatment, sortilin and EphA2 were co-immunoprecipitated with TrkA. These results were confirmed by reverse co-immunoprecipitation of sortilin and EphA2 (Fig. 2A). Of note, in the presence of NGF, sortilin binding to TrkA was detected after 30 min of treatment but EphA2 binding was not observed after neither 5 min nor 30 min of treatment (Fig. 2A). Thus, NGF seemed to induce a late TrkA/sortilin association, suggesting that sortilin acts as an endocytic receptor, as previously reported in neuronal cell models [8]. Proximity ligation assays (PLA) were then carried out to confirm any receptor association (distance < 40 nm) at the plasma membrane. In the absence of exogenous proNGF stimulation, a basal PLA signal (red dots) was observed for sortilin/TrkA (Fig. 2B–C) and TrkA/EphA2 (Fig. 2D–E). ProNGF stimulation (5 min) enhanced PLA signals of sortilin/TrkA and EphA2/TrkA (Fig. 2C and E); this increase was transient as membrane PLA signals decreased to basal levels after 30 min of proNGF treatment.

Together, these data indicated that proNGF specifically induces the association of TrkA with sortilin and EphA2, even if we cannot exclude the existence of other intermediary partners.

3.2. Sequential sortilin/TrkA/EphA2 association induces TrkA-dependent Akt phosphorylation and EphA2-dependent Src phosphorylation

In order to put insight into the dynamics of the receptors association, we first treated cells with neurotensin that inhibits, by competition, proNGF binding to sortilin [8]. As shown in Fig. 3A, in the presence of neurotensin, TrkA was not immunoprecipitated with either sortilin or EphA2, indicating that proNGF binding to sortilin was necessary for sortilin/TrkA/EphA2 association. When TrkA expression was silenced by siRNA (Fig. 3B, S1), sortilin did not pull-down EphA2, indicating that sortilin could not associate with EphA2 in the absence of TrkA; this was further confirmed by PLA, as no signal was detected for sortilin/EphA2.

Interestingly, in cells stably expressing a kinase-dead TrkA that prevents receptor phosphorylation (Fig. 3D), proNGF still induced TrkA association with sortilin and EphA2, suggesting that TrkA phosphorylation was not necessary for sortilin/TrkA/EphA2 association. Finally, when EphA2 expression was silenced by siRNA (Fig. 3E), TrkA and sortilin were co-immunoprecipitated in proNGF-treated cells, indicating that EphA2 was not required for TrkA and sortilin association.

Together, these results suggested that proNGF binding to sortilin elicits sortilin association with TrkA, which in turn recruits EphA2 at cell surface.

As we have previously shown that proNGF stimulates breast cancer cell invasion through TrkA activation, we asked if EphA2 could be involved in TrkA-mediated cell invasion. When EphA2 expression was inhibited by siRNA approach, proNGF was no longer able to stimulate cell invasion both in native and HA-TrkA over-expressing MDA-MB-231 cells (Figure S2), implying that EphA2 was necessary for proNGF-stimulated and TrkA-mediated cell invasion. ProNGF-stimulated invasion implicates the activation of downstream signaling pathways including Akt and Src [10]. On the other hand, Src is also a downstream effector of EphA2 [19], we then determined the respective role of TrkA and EphA2 in Akt and Src activation by using a kinase-dead mutant of TrkA (Fig. 3F) or siEphA2 approach (Fig. 3G). Following proNGF treatment, Akt was not phosphorylated in cells expressing a kinase-dead mutant of TrkA while Src phosphorylation was maintained (Fig. 3F),

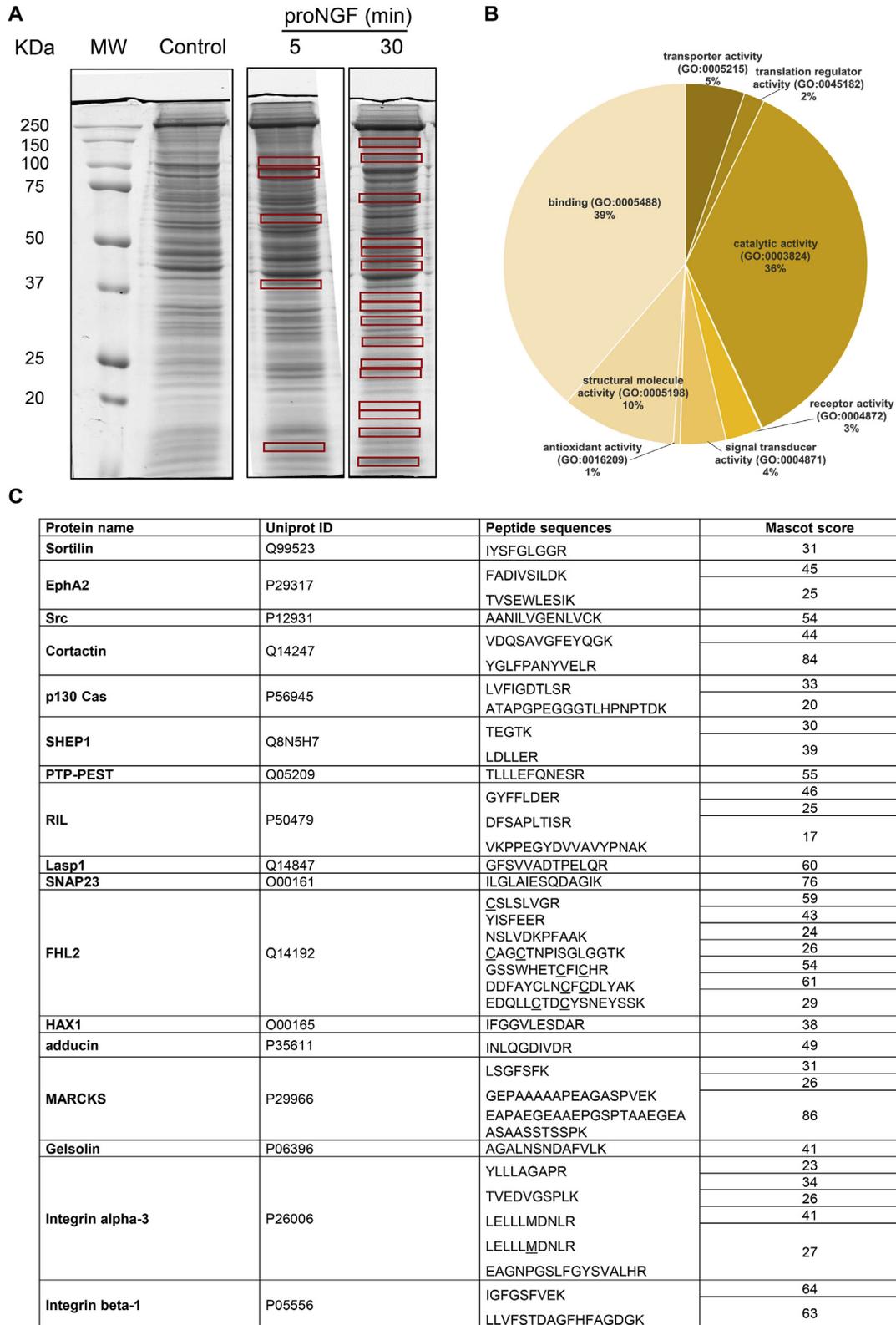


Fig. 1. Proteomic analysis of HA-TrkA partners revealed EphA2 association and downstream signaling pathways proteins. (A) MDA-MB-231 HA-TrkA cells were treated in absence or presence of non-cleavable proNGF (0.5 nM) for 5 and 30 min. Total cell lysates were subjected to HA immunoprecipitation and separated in 10% SDS-PAGE. Proteins were revealed by colloidal blue Coomassie staining. Using transilluminator, intensity of bands was appreciated by CC and R-A T and bands with stronger intensity than that of control were cut (red square). Protein peptide digests were then subjected to mass spectrometry analysis. (B) Identified proteins were analyzed for Biological pathways using Panther software. (C) Mass spectrometry identification of selected putative interacting partners of TrkA under proNGF stimulation (5 or 30 min). For each identified protein, the Uniprot ID, the number and sequence of the different peptides allowing protein identification and the individual peptide Mascot score are summarized. Underlined amino-acids (C and M) are oxidized residues. MW: Molecular Weight. GO: Gene Ontology. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

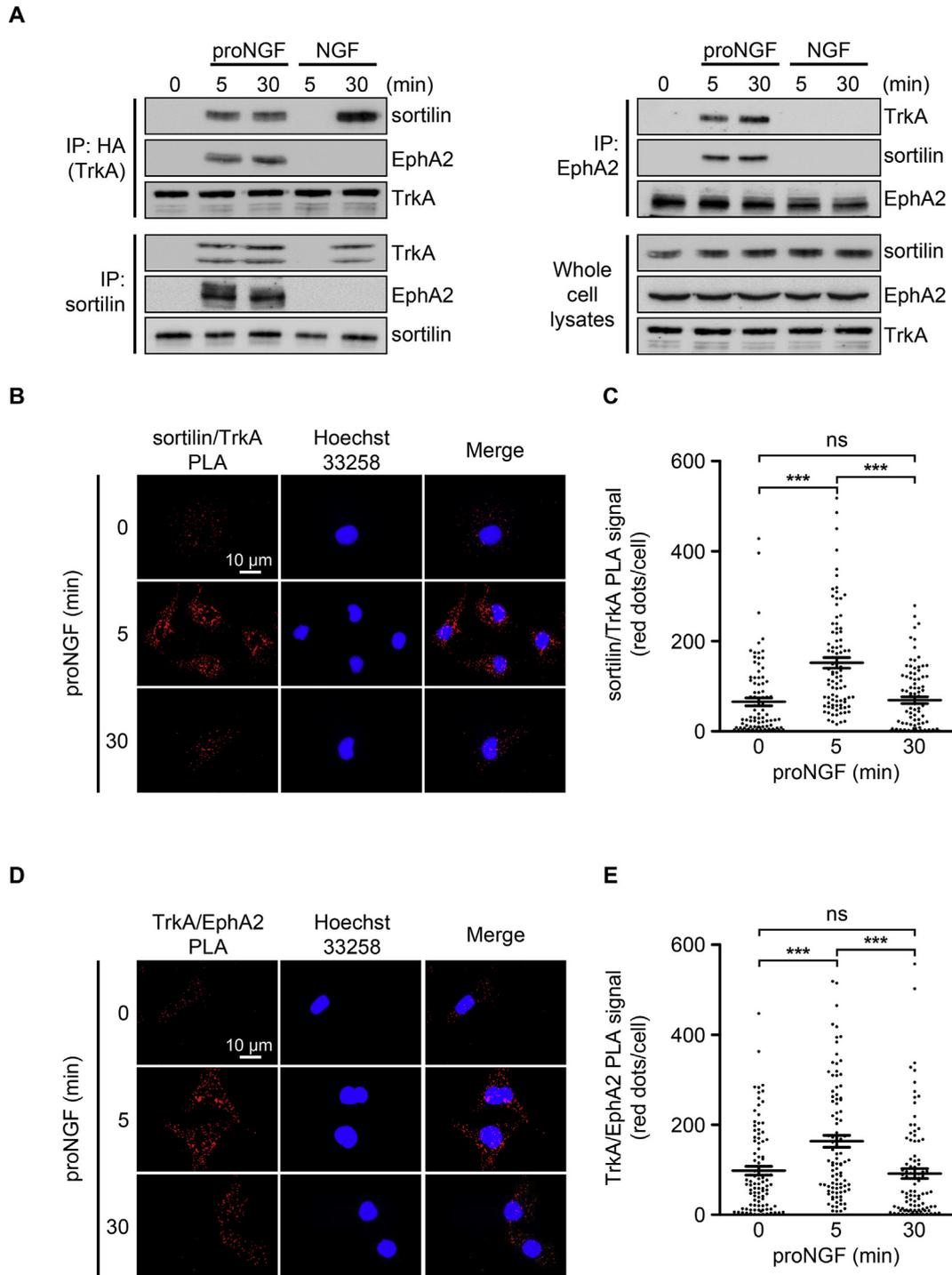


Fig. 2. ProNGF induced association of sortilin, TrkA and EphA2. (A) Representative immunoblotting for sortilin, EphA2 and TrkA following IP anti-HA (TrkA), sortilin or EphA2 in HA-TrkA MDA-MB-231 cells after non-cleavable proNGF treatment. (B–E) Representative pictures (B and D) and quantification (C and E) for sortilin/TrkA (B and C) and TrkA/EphA2 (D and E) PLA signals in HA-TrkA MDA-MB-231 cells after non-cleavable proNGF treatment. PLA signals were quantified on three independent experiments. In (C) and (E), data are expressed as scatter plots. *** $p < 0.001$; ns, not significant.

indicating that Akt phosphorylation depended upon TrkA phosphorylation while Src phosphorylation did not. By contrary, in cells transfected with siEphA2, proNGF still induced Akt phosphorylation but not that of Src, indicating that Akt phosphorylation did not depend on EphA2 while Src activation did (Fig. 3G).

Collectively, our data showed that, in MDA-MB-231 breast cancer cells, proNGF binding to sortilin induced functional sortilin/TrkA/EphA2 association, leading to TrkA-dependent Akt phosphorylation and

EphA2-dependent Src phosphorylation (Fig. 3H).

3.3. ProNGF increases breast cell clonogenic growth through functional association of TrkA with EphA2

In order to determine the relevance of TrkA/EphA2 functional association in breast cancer cells, we further extended our study on a panel of representative breast cancer cell lines including basal-like

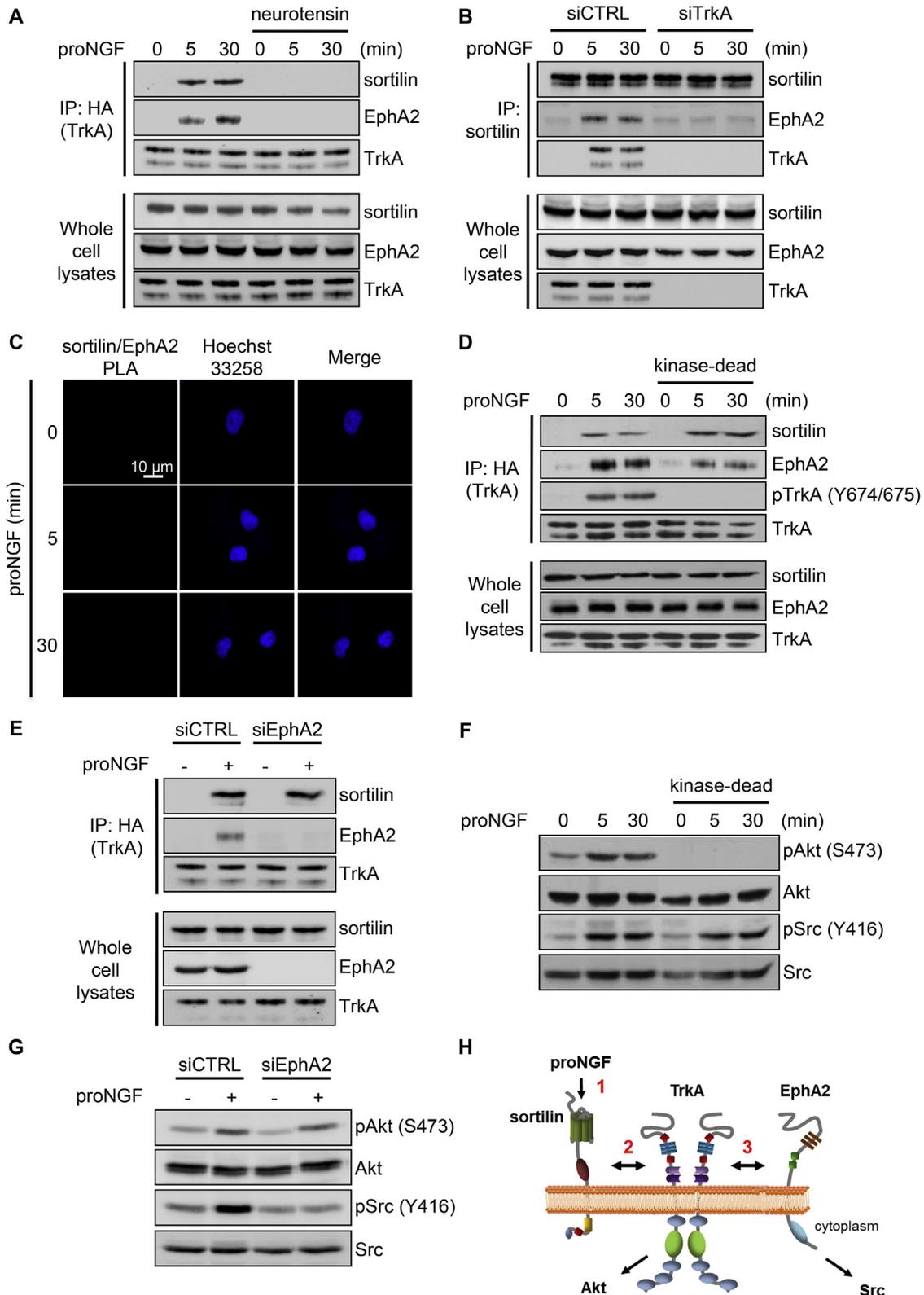


Fig. 3. ProNGF-induced association of TrkA with sortilin and EphA2 was sequential. (A–B) Representative immunoblotting for sortilin, EphA2 and TrkA after IP anti-HA (TrkA) following treatment with 1 μ M neurotensin (A) or after IP anti-sortilin in cells transfected with TrkA-targeting siRNA (B). (C) Representative pictures of sortilin/EphA2 PLA. (D–E) Representative immunoblotting for sortilin, EphA2 and TrkA after IP anti-HA in HA-TrkA MDA-MB-231 cells expressing a kinase-dead TrkA mutant (D) or transfected with EphA2-targeting siRNA (E). In (D), TrkA phosphorylation in the kinase domain (Y674/675 residues) was also evaluated by immunoblotting. (F–G) Representative immunoblotting for the phosphorylated and total forms of Akt and Src in non-cleavable proNGF-stimulated HA-TrkA MDA-MB-231 cells expressing a kinase-dead TrkA mutant (F) or cells transfected with EphA2-targeting siRNA (G). Immunoprecipitations and immunoblots were carried out at least 2 times with similar results. (H) Putative dynamic of proNGF-induced sortilin/TrkA/EphA2 signaling in breast cancer cells. After proNGF binding to sortilin (1), TrkA is phosphorylated allowing Akt activation (2). Additionally, EphA2 is also recruited to the sortilin/TrkA complex in a TrkA kinase-independent manner, leading to Src activation (3).

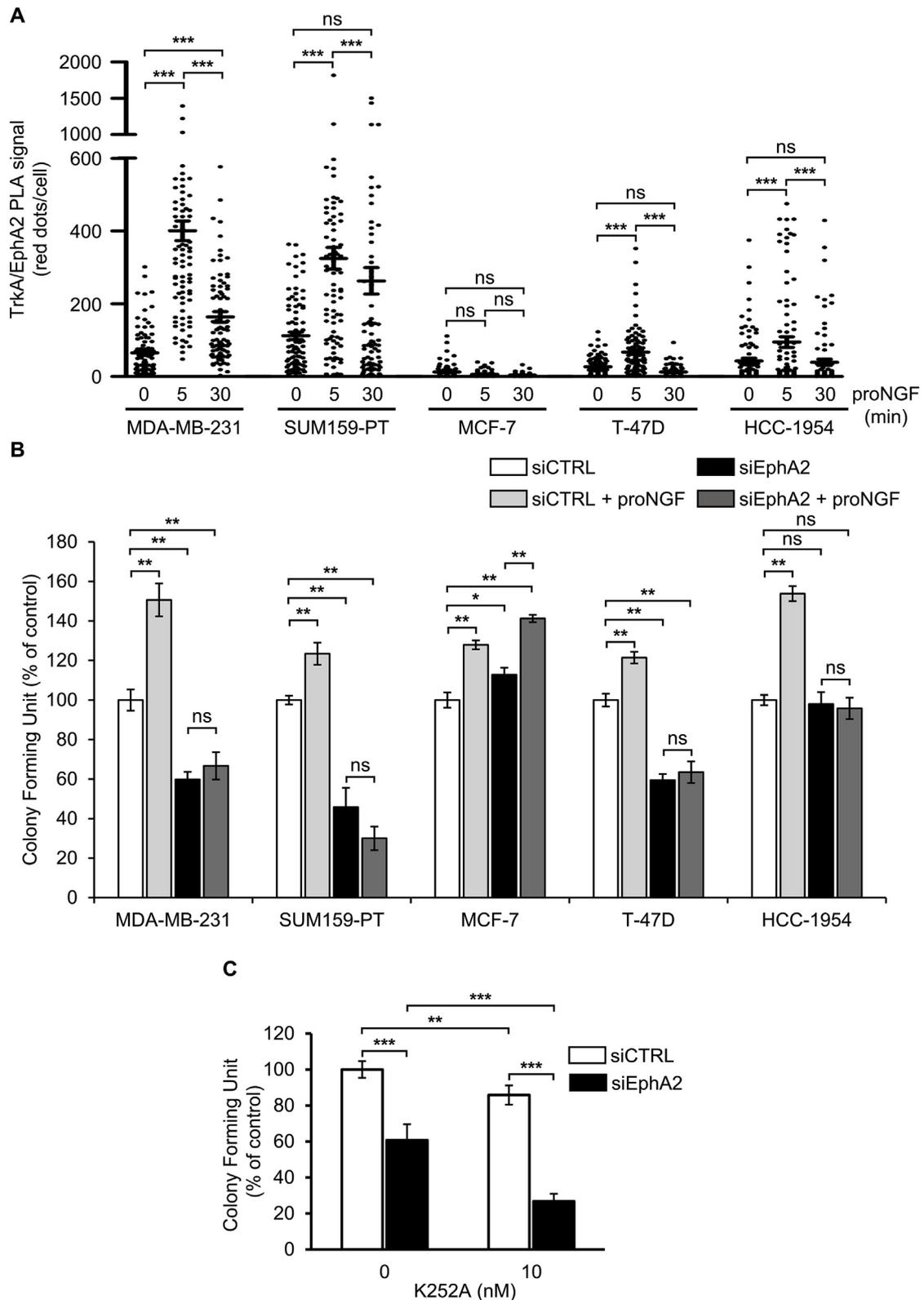


Fig. 4. TrkA/EphA2 complex was involved in proNGF-stimulated clonogenic cell growth. (A) PLA of TrkA/EphA2 complex in wild-type MDA-MB-231, SUM159-PT, MCF-7, T-47D and HCC-1954 breast cancer cells following proNGF treatment (5 and 30 min). (B) Clonogenic cell growth following proNGF treatment (5 and 30 min) and transfection of EphA2-targeting siRNA. (C) Clonogenic cell growth of MDA-MB-231 cells following treatment with 10 nM K252a and/or transfection with EphA2-targeting siRNA. Data are expressed as scatter plots (A) or means \pm SEM (B–C). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, not significant.

(wild type MDA-MB-231, SUM159-PT), luminal-like (MCF-7, T-47D), and HER2-overexpressing basal-like cell line HCC-1954. PLA signals of TrkA/EphA2 were increased after 5 min of stimulation with proNGF in

all cell lines tested, except for MCF-7 (Fig. 4A and S3). Clonogenic assays were then carried out to evaluate the impact of EphA2 invalidation on proNGF-stimulated cell growth. As shown in Fig. 4B, proNGF

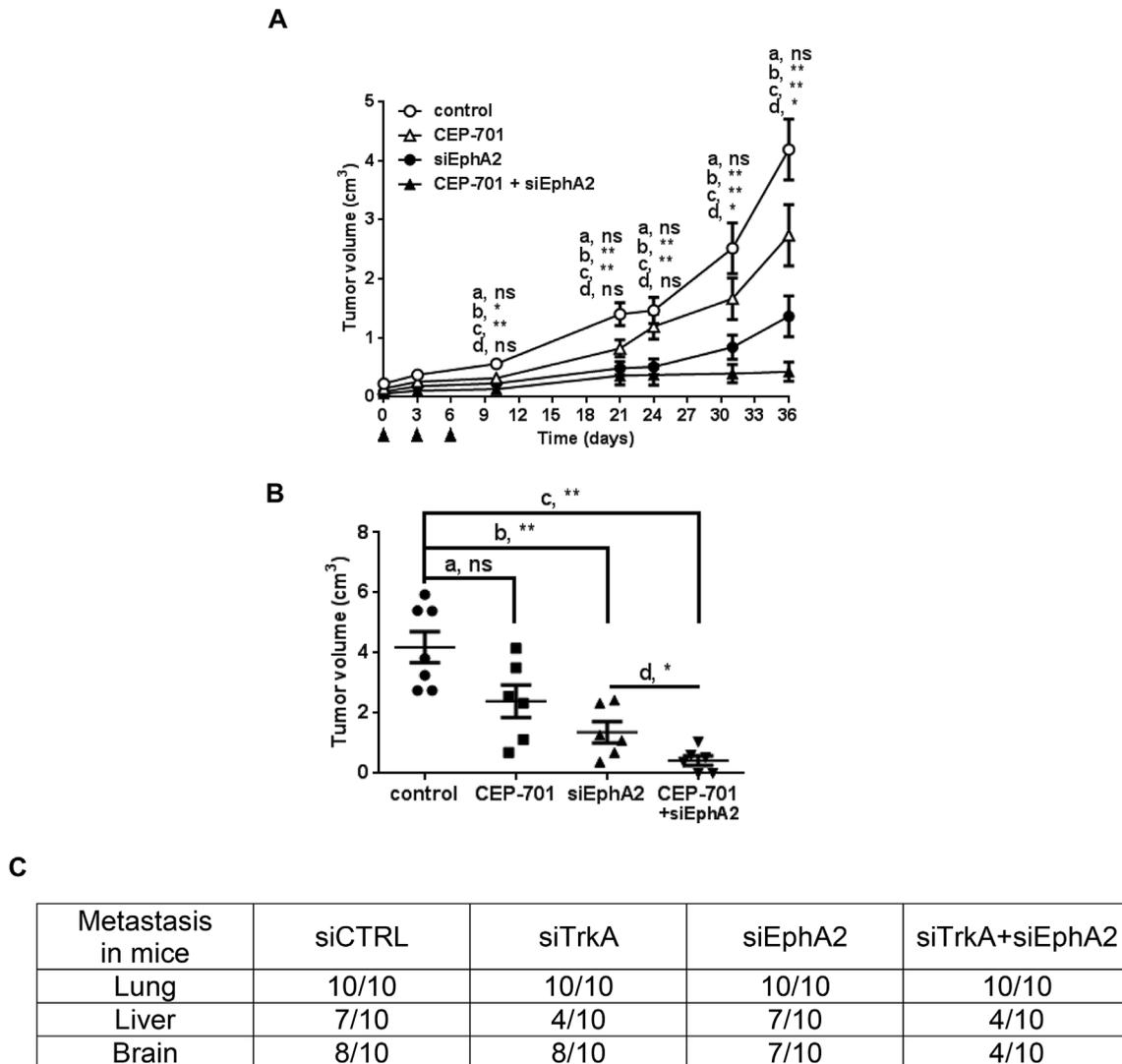


Fig. 5. Combinatorial treatment with TrkA- and EphA2-targeting modalities delays primary tumor growth and metastasis formation. (A–B) Tumor growth of MDA-MB-231 xenografts in SCID mice submitted to 3 injections (every 3 days; black arrows) of either *in vivo* JetPEI + control or EphA2-targeting siRNA (7.5 µg/mouse), or CEP-701 (10 mg/kg) alone or in combination. Tumor volumes were measured at different intervals (A) and represented as scatter plots at the end of the experiment (B). (C) Detection of metastatic human breast cancer cells (as determined by RT-PCR for the expression of the human microglobulin) in different organs (lungs, liver and brain) of MDA-MB-231 xenograft-bearing mice submitted to 5 injections (every 3 days; black arrows) of either *in vivo* JetPEI + control or EphA2-targeting siRNA (7.5 µg/mouse), or CEP-701 (10 mg/kg) alone or in combination. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: not significant. Data are expressed as means \pm SEM (A) or scatter plots (B).

stimulated clonogenic cell growth in all the cell lines tested; siEphA2 totally abolished proNGF-induced cell growth except in MCF-7, this was consistent with the results of PLA assay revealing that proNGF did not increase TrkA/EphA2 complex in these cells and with the fact that MCF-7 cells express low levels of both TrkA and EphA2 compared to the other cell lines (Figure S4). Use of another siEphA2 sequence [14] confirmed also the implication of EphA2 in pro-NGF induced clonogenic growth of MDA-MB-231 cells (Figure S5). These results indicated that proNGF-induced cell growth involved TrkA/EphA2 association in different cell lines whatever their molecular classification (*i.e.* basal, luminal or HER2-like). We then examined the impact of TrkA and/or EphA2 inhibition on colony formation in MDA-MB-231 cells. As shown in Fig. 4C, the TrkA inhibitor K252a inhibited colony formation to about 85% of control, siEphA2 to 60% of control, while combinatory treatment with K252a and siEphA2 inhibited colony formation to less than 30% of control.

3.4. Simultaneous targeting of TrkA and EphA2 reduces tumor growth and brain metastasis *in vivo*

Given the above results indicating the importance of proNGF-induced TrkA/EphA2 association in breast cancer cells, we determined the potential benefit of a combinatorial targeting of TrkA and EphA2 in xenograft mouse model. As shown in Fig. 5A and B, CEP-701 (clinical derivative of K252a) alone did not significantly reduce tumor growth, while siEphA2 alone delayed tumor growth when compared to the control group (scrambled siRNA). Combined treatment of CEP-701 and siEphA2 resulted in a dramatic reduction of tumor burden when compared to CEP-701 or siEphA2 treatment alone. We then evaluated the impact of TrkA and/or EphA2 invalidation on breast cancer cell dissemination in different organs including lungs, liver and brain (Fig. 5C). In these conditions, we first confirmed that combined inhibition of TrkA and EphA2 inhibited tumor growth as the median survival of the mice was increased: Median of survival were 40 days in control group, 53 days in siTrkA group, 49 days in siEphA2 group and 57.5 days in siTrkA

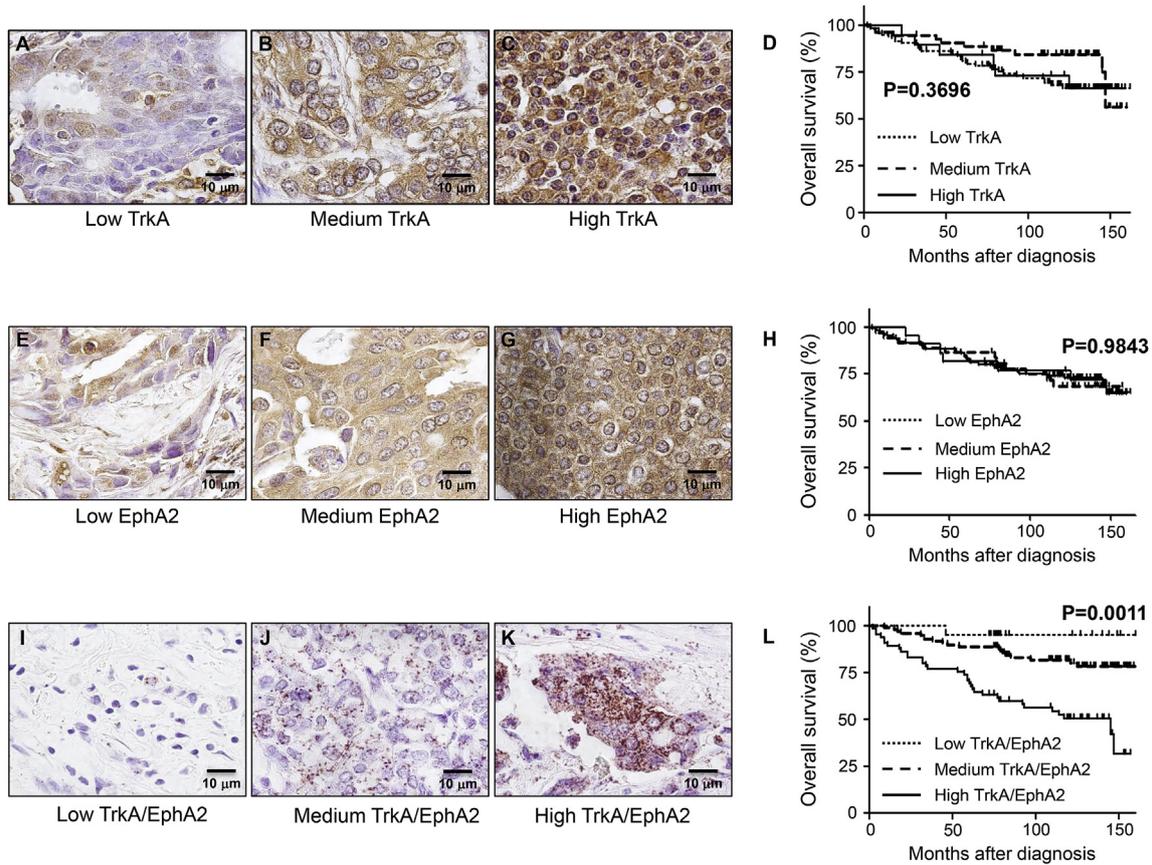


Fig. 6. TrkA/EphA2 complex expression is associated with overall survival (OS) decrease for breast cancer patients. (A–C) Representative pictures for TrkA immunostaining in breast tumors, defined as low (A), medium (B) or high (C). (D) Kaplan-Meier OS curves in breast cancer patients according to TrkA staining. (E–G) Representative pictures for EphA2 immunostaining in breast tumors, defined as low (E), medium (F) or high (G). (H) Kaplan-Meier OS curves in breast cancer patients according to EphA2 staining. (I–K) Representative PLA images depicting low (I), medium (J) and high staining (K) for TrkA/EphA2 complex on patient breast tumor samples. (L) Kaplan-Meier OS curves in breast cancer patients according to TrkA/EphA2 complex abundance.

Table 1

Correlation between expression levels of TrkA and EphA2, TrkA/EphA2 association (PLA signal) and clinical parameters of patient samples.

		TrkA	EphA2	TrkA/EphA2 PLA
Estrogen receptor	Positive (n = 109)	1.725 ± 0.09478 p = 0.1408	1.817 ± 0.1011 p = 0.2155	2.193 ± 0.1169 p = 0.1608
	Negative (n = 71)	1.944 ± 0.1115	2.014 ± 0.1212	1.915 ± 0.1615
Progesterone receptor	Positive (n = 95)	1.663 ± 0.09996 p = 0.0318	1.758 ± 0.1097 p = 0.0536	2.053 ± 0.1201 p = 0.5557
	Negative (n = 84)	1.976 ± 0.1044	2.060 ± 0.1089	2.141 ± 0.1541
HER-2	Positive (n = 69)	1.783 ± 0.1254 p = 0.8799	1.884 ± 0.1248 p = 0.9606	2.217 ± 0.1650 p = 0.2717
	Negative (n = 113)	1.805 ± 0.08876	1.876 ± 0.09988	2.000 ± 0.1166
Triple negative	Positive (n = 34)	2.088 ± 0.1544 p = 0.0578	2.176 ± 0.1661 p = 0.0715	1.765 ± 0.2315 p = 0.1053
	Negative (n = 147)	1.735 ± 0.08153	1.816 ± 0.08743	2.163 ± 0.1049
Lymph node invasion	Positive (n = 116)	1.724 ± 0.09372 p = 0.1166	1.897 ± 0.09976 p = 0.9171	2.138 ± 0.1193 p = 0.2127
	Negative (n = 69)	1.957 ± 0.1081	1.913 ± 0.1181	1.899 ± 0.1193

and siEphA2 mice (Figure S6). We found that tumor cells disseminated readily in these three distant organs. Lung metastasis was not modified under any invalidation condition. Interestingly, TrkA invalidation alone was sufficient to reduce liver metastasis while combined inhibition of TrkA and EphA2 was required to decrease brain metastasis. These results indicated that simultaneous inhibition of TrkA and EphA2 was not only efficient in inhibiting primary tumor growth, but also in reducing brain metastasis formation.

3.5. ProNGF-induced TrkA/EphA2 association is correlated with poor prognosis in breast cancer

To go further on the significance of TrkA/EphA2 functional complex in breast cancer, we performed immunostainings of TrkA, EphA2, and

PLA labeling to colocalize TrkA/EphA2 in breast tumor samples in a tissue microarray (TMA) cohort of 189 patients (Fig. 6, Table 1 and S1). We found that TrkA expression was associated with PR-negative status (Table 1). However, neither TrkA nor EphA2 alone correlated with overall survival of patients (Fig. 6A–H and Table 1). By PLA, we distinguished the differential PLA signals of TrkA/EphA2 in the samples, and found that high level of TrkA/EphA2 PLA signals in tumors was correlated with a significant decrease of overall survival of patients (Fig. 6I–L).

4. Discussion

Compelling evidences showed that proNGF is more than just a metabolic precursor of NGF, as it exhibits biological activities in a wide

range of normal and neoplastic tissues, including breast cancer [6,8–13,17]. Nevertheless, proNGF functions in cells are still in debate due to its pro-survival and pro-apoptotic activities, according to cell types. A recent study reconciled these findings by showing that these opposite biological effects depend on TrkA levels [29]. Indeed, the authors showed that proNGF elicits apoptotic signaling in PC-12 cells expressing low levels of TrkA while it favors survival of cells expressing high levels of TrkA. In agreement with these findings, increased levels of TrkA are associated with tumor growth and metastasis in breast cancer [30] and melanoma [31].

In breast cancer cells, we previously observed that uncleavable proNGF induces sortilin recruitment at plasma membrane and TrkA activation, leading to increased cell invasion, independently of p75^{NTR} [10]. Herein, by studying TrkA-interacting proteins upon proNGF stimulation, we identified EphA2, a membrane receptor tyrosine kinase, as a key element of proNGF signaling in breast cancer cells. ProNGF signaling through sortilin and TrkA allowed for EphA2 recruitment, which in turn activated Src in a TrkA phosphorylation-independent manner.

Implications of EphA2 in proNGF-induced signaling is of particular interest. Indeed, EphA2 binds to its ligand ephrin-A1 to maintain cell adhesion and tissue homeostasis in normal breast epithelial cells [32], ephrin-A1 downregulation favors ligand-independent activation of EphA2 and associated downstream signaling pathways (e.g. MAP-kinase, RhoGTPase and Src) in several types of cancer cells, leading to cell invasion and metastasis [33–35]. Although the mechanisms of ligand-independent activation of EphA2 remain fragmentary, it has been shown that EphA2 phosphorylation by Akt or Rsk can lead to its activation [35,36]. Here, we observed that in the context of proNGF stimulation, EphA2 activated Src via an Akt-phosphorylation independent mechanism. Moreover, our proteomic analysis revealed that several Src-associated signaling proteins like cortactin and p130 Cas were pulled-down with TrkA upon proNGF treatment, suggesting that proNGF could activate a signaling cascade involving Src/p130 Cas/cortactin complex. Although further study should be done to confirm this hypothesis, the Src/p130 Cas/cortactin complex is already reported to induce cell invasion [37].

Song et al. [14] have recently reported that EphA2 is overexpressed in the basal-like breast cancer molecular subtype and this overexpression is correlated with poor recurrence-free survival in triple-negative breast cancers. Loss of EphA2 function in both human and genetically engineered mouse models of triple negative breast cancers reduced tumor growth. Herein, we observed that EphA2 silencing inhibited proNGF-stimulated clonogenic cell growth of not only triple negative, but also luminal ER-positive and HER2-positive breast cancer cell lines. This implies that EphA2 is involved in proNGF-stimulated clonogenic cell growth, independently of molecular subtypes. Consistently, we could not find any significant correlation between TrkA/EphA2 complex or co-localization and different subtypes of breast cancer. Of importance, the level of TrkA/EphA2 co-localization is significantly correlated with poor overall survival of patients suffering from breast cancer regardless the cancer subtype, suggesting the potential involvement of proNGF/TrkA/EphA2 axis in breast cancer progression whatever the cancer subtype. These findings reinforced our previous results showing a significant correlation between the expression of proNGF and lymph node invasion [10].

Cross-talk in growth factor-induced signaling pathway is a leading cause of resistance to targeted therapies [38,39]. EphA2 was identified to mediate resistance to multiple targeted therapies including trastuzumab (HER-2 inhibitor) via Src activation in breast cancer cells [40], as well as erlotinib (EGFR inhibitor) in lung cancer models [41]. We postulate that the existence of a proNGF-induced EphA2-Src pathway, independently of TrkA phosphorylation and Akt activation, may contribute to tumor resistance to therapies targeting TrkA kinase domain (lestaurtinib, larotrectinib, entrectinib ...). Here, we showed that simultaneous targeting of TrkA and EphA2 receptors, dramatically

reduced colony formation *in vitro* and tumor development *in vivo*, suggesting that inhibiting both TrkA- and EphA2-dependent signaling pathways may improve the therapeutic benefit in patients (over)expressing TrkA, EphA2 and proNGF.

In conclusion, our data demonstrated that functional interactions between sortilin, TrkA and EphA2 are essential for the tumor-promoting effect of proNGF in breast cancer. Although further translational work is required, our results suggest that proNGF/TrkA/EphA2 axis could be used as both a prognostic marker and a potential therapeutic target in breast cancer.

Conflicts of interest

All authors declare no conflict of interest.

Financial support

This work was supported by grants from the “Ligue Nationale Contre le Cancer”, “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer”, “Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (GEFLUC)” and the SIRIC Oncolille.

Acknowledgments

We thank Anne-Sophie Lacoste who performed the mass spectrometry analysis (Mass Spectrometry facility, IFR-147, University Lille, France). We also thank the animal facility at the Pasteur Institute of Lille (PLETHA) for animal housing (Dr J.P. de Cavel, M T Chassat).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.02.019>.

References

- [1] T.R. Wilson, J. Fridlyand, Y. Yan, E. Penuel, L. Burton, E. Chan, J. Peng, E. Lin, Y. Wang, J. Sosman, A. Ribas, J. Li, J. Moffat, D.P. Sutherland, H. Koeppen, M. Merchant, R. Neve, J. Settleman, Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors, *Nature* 487 (2012) 505–509, <https://doi.org/10.1038/nature11249>.
- [2] S. Gusenbauer, P. Vlaicu, A. Ullrich, HGF induces novel EGFR functions involved in resistance formation to tyrosine kinase inhibitors, *Oncogene* 32 (2013) 3846–3856, <https://doi.org/10.1038/ncr.2012.396>.
- [3] B.L. Hempstead, D. Martin-Zanca, D.R. Kaplan, L.F. Parada, M.V. Chao, High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor, *Nature* 350 (1991) 678–683, <https://doi.org/10.1038/350678a0>.
- [4] B.A. Tsui-Pierchala, J. Milbrandt, E.M. Johnson, NGF utilizes c-Ret via a novel GFL-independent, inter-RTK signaling mechanism to maintain the trophic status of mature sympathetic neurons, *Neuron* 33 (2002) 261–273.
- [5] C. Festuccia, G.L. Gravina, P. Muzi, D. Millimaggi, V. Dolo, C. Vicentini, C. Ficorella, E. Ricevuto, M. Bologna, Her2 crosstalks with TrkA in a subset of prostate cancer cells: rationale for a guided dual treatment, *Prostate* 69 (2009) 337–345, <https://doi.org/10.1002/pros.20884>.
- [6] O. Clewes, M.S. Fahey, S.J. Tyler, J.J. Watson, H. Seok, C. Catania, K. Cho, D. Dawbarn, S.J. Allen, Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin, *J. Neurochem.* 107 (2008) 1124–1135, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05698.x>.
- [7] D. Feng, T. Kim, E. Ozkan, M. Light, R. Torkin, K.K. Teng, B.L. Hempstead, K.C. Garcia, Molecular and structural insight into proNGF engagement of p75NTR and sortilin, *J. Mol. Biol.* 396 (2010) 967–984, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.12.030>.
- [8] A. Nykjaer, R. Lee, K.K. Teng, P. Jansen, P. Madsen, M.S. Nielsen, C. Jacobsen, M. Kliemann, E. Schwarz, T.E. Willnow, B.L. Hempstead, C.M. Petersen, Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death, *Nature* 427 (2004) 843–848, <https://doi.org/10.1038/nature02319>.
- [9] R. Masoudi, M.S. Ioannou, M.D. Coughlin, P. Pagadala, K.E. Neet, O. Clewes, S.J. Allen, D. Dawbarn, M. Fahnestock, Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 18424–18433, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007104>.
- [10] Y. Demont, C. Corbet, A. Page, Y. Ataman-Onal, G. Choquet-Kastylevsky, I. Fliniaux, X. Le Bourhis, R.-A. Toillon, R.A. Bradshaw, H. Hondermarck, Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein, *J. Biol. Chem.* 287 (2012)

- 1923–1931, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211714>.
- [11] J. Pundavela, Y. Demont, P. Jobling, L.F. Lincz, S. Roselli, R.F. Thorne, D. Bond, R.A. Bradshaw, M.M. Walker, H. Hondermarck, ProNGF correlates with Gleason score and is a potential driver of nerve infiltration in prostate cancer, *Am. J. Pathol.* 184 (2014) 3156–3162, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.08.009>.
- [12] F. Truzzi, A. Marconi, R. Lotti, K. Dallaglio, L.E. French, B.L. Hempstead, C. Pincelli, Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration, *J. Invest. Dermatol.* 128 (2008) 2031–2040, <https://doi.org/10.1038/jid.2008.21>.
- [13] S. Faulkner, S. Roselli, Y. Demont, J. Pundavela, G. Choquet, P. Leissner, C. Oldmeadow, J. Attia, M.M. Walker, H. Hondermarck, ProNGF is a potential diagnostic biomarker for thyroid cancer, *Oncotarget* 7 (2016) 28488–28497, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8652>.
- [14] W. Song, Y. Hwang, V.M. Youngblood, R.S. Cook, J.M. Balko, J. Chen, D.M. Brantley-Sieders, Targeting EphA2 impairs cell cycle progression and growth of basal-like/triple-negative breast cancers, *Oncogene* 36 (2017) 5620–5630, <https://doi.org/10.1038/ncr.2017.170>.
- [15] L. Aubert, M. Guilbert, C. Corbet, E. Génot, E. Adriaenssens, T. Chassat, F. Bertucci, T. Daubon, N. Magné, X.L. Bourhis, R.-A. Toillon, NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib, *Oncotarget* 6 (2015) 9807–9819, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3227>.
- [16] R.-A. Toillon, C. Lagadec, A. Page, V. Chopin, P.-E. Sautière, J.-M. Ricort, J. Lemoine, M. Zhang, H. Hondermarck, X. Le Bourhis, Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin, *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007) 1239–1247, <https://doi.org/10.1074/mcp.M600477-MCP200>.
- [17] E. Tomellini, Y. Touil, C. Lagadec, S. Julien, P. Ostyn, N. Ziental-Gelus, S. Meignan, J. Lengrand, E. Adriaenssens, R. Polakowska, X. Le Bourhis, Nerve growth factor and proNGF simultaneously promote symmetric self-renewal, quiescence, and epithelial to mesenchymal transition to enlarge the breast cancer stem cell compartment, *Stem Cell.* 33 (2015) 342–353, <https://doi.org/10.1002/stem.1849>.
- [18] D.P. Zelinski, N.D. Zantek, J.C. Stewart, A.R. Irizarry, M.S. Kinch, EphA2 over-expression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells, *Cancer Res.* 61 (2001) 2301–2306.
- [19] L. Faoro, P.A. Singleton, G.M. Cervantes, F.E. Lennon, N.W. Choong, R. Kanteti, B.D. Ferguson, A.N. Husain, M.S. Tretiakova, N. Ramnath, E.E. Vokes, R. Salgia, EphA2 mutation in lung squamous cell carcinoma promotes increased cell survival, cell invasion, focal adhesions, and mammalian target of rapamycin activation, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 18575–18585, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.075085>.
- [20] M.A. Chellaiyah, M.D. Schaller, Activation of Src kinase by protein-tyrosine phosphatase-PEST in osteoclasts: comparative analysis of the effects of bisphosphonate and protein-tyrosine phosphatase inhibitor on Src activation in vitro, *J. Cell. Physiol.* 220 (2009) 382–393, <https://doi.org/10.1002/jcp.21777>.
- [21] S. Roselli, Y. Wallez, L. Wang, V. Vervoort, E.B. Pasquale, The SH2 domain protein Shep1 regulates the in vivo signaling function of the scaffolding protein Cas, *Cell. Signal.* 22 (2010) 1745–1752, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.06.015>.
- [22] Y. Zhang, Y. Tu, J. Zhao, K. Chen, C. Wu, Reversion-induced LIM interaction with Src reveals a novel Src inactivation cycle, *J. Cell Biol.* 184 (2009) 785–792, <https://doi.org/10.1083/jcb.200810155>.
- [23] B. Fadeel, E. Grzybowska, HAX-1: a multifunctional protein with emerging roles in human disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1790 (2009) 1139–1148, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.06.004>.
- [24] T.G.P. Grunewald, U. Kammerer, E. Schulze, D. Schindler, A. Honig, M. Zimmer, E. Butt, Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 974–982, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.12.016>.
- [25] M.J. Kean, K.C. Williams, M. Skalski, D. Myers, A. Burtnik, D. Foster, M.G. Coppolino, VAMP3, syntaxin-13 and SNAP23 are involved in secretion of matrix metalloproteinases, degradation of the extracellular matrix and cell invasion, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 4089–4098, <https://doi.org/10.1242/jcs.052761>.
- [26] Y. Matsuoka, X. Li, V. Bennett, Adducin: structure, function and regulation, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 884–895, <https://doi.org/10.1007/PL00000731>.
- [27] K. Mitchell, K.B. Svenson, W.M. Longmate, K. Gkirtzimanaki, R. Sadej, X. Wang, J. Zhao, A.G. Eliopoulos, F. Berditchevski, C.M. Dipersio, Suppression of integrin alpha3beta1 in breast cancer cells reduces cyclooxygenase-2 gene expression and inhibits tumorigenesis, invasion, and cross-talk to endothelial cells, *Cancer Res.* 70 (2010) 6359–6367, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4283>.
- [28] W. Zhang, B. Jiang, Z. Guo, C. Sardet, B. Zou, C.S.C. Lam, J. Li, M. He, H.-Y. Lan, R. Pang, I.F.N. Hung, V.P.Y. Tan, J. Wang, B.C.Y. Wong, Four-and-a-half LIM protein 2 promotes invasive potential and epithelial-mesenchymal transition in colon cancer, *Carcinogenesis* 31 (2010) 1220–1229, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq094>.
- [29] M.S. Ioannou, M. Fahnstock, ProNGF, but not NGF, switches from neurotrophic to apoptotic activity in response to reductions in TrkA receptor levels, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017), <https://doi.org/10.3390/ijms18030599>.
- [30] B. Davidson, R. Reich, P. Lazarovici, V. Ann Flørenes, S. Nielsen, J.M. Nesland, Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma, *Breast Canc. Res. Treat.* 83 (2004) 119–128, <https://doi.org/10.1023/B:BreA.0000010704.17479.8a>.
- [31] O. Shonukan, I. Bagayogo, P. McCrear, M. Chao, B. Hempstead, Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin, *Oncogene* 22 (2003) 3616–3623, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206561>.
- [32] E.B. Pasquale, Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease, *Cell* 133 (2008) 38–52, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.011>.
- [33] W.B. Fang, R.C. Ireton, G. Zhuang, T. Takahashi, A. Reynolds, J. Chen, Overexpression of EPHA2 receptor destabilizes adherens junctions via a RhoA-dependent mechanism, *J. Cell Sci.* 121 (2008) 358–368, <https://doi.org/10.1242/jcs.017145>.
- [34] N. Hiramoto-Yamaki, S. Takeuchi, S. Ueda, K. Harada, S. Fujimoto, M. Negishi, H. Katoh, Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism, *J. Cell Biol.* 190 (2010) 461–477, <https://doi.org/10.1083/jcb.201005141>.
- [35] H. Miao, D.-Q. Li, A. Mukherjee, H. Guo, A. Petty, J. Cutter, J.P. Basilion, J. Sedor, J. Wu, D. Danielpour, A.E. Sloan, M.L. Cohen, B. Wang, EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt, *Cancer Cell* 16 (2009) 9–20, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.04.009>.
- [36] Y. Zhou, N. Yamada, T. Tanaka, T. Hori, S. Yokoyama, Y. Hayakawa, S. Yano, J. Fukuoka, K. Koizumi, I. Saiki, H. Sakurai, Crucial roles of RSK in cell motility by catalysing serine phosphorylation of EphA2, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7679, <https://doi.org/10.1038/ncomms8679>.
- [37] S.M. MacGrath, A.J. Koleske, Cortactin in cell migration and cancer at a glance, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 1621–1626, <https://doi.org/10.1242/jcs.093781>.
- [38] K. Berns, R. Bernards, Understanding resistance to targeted cancer drugs through loss of function genetic screens, *Drug Resist. Updates* 15 (2012) 268–275, <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.10.002>.
- [39] J.M. Stommel, A.C. Kimmelman, H. Ying, R. Nabioullin, A.H. Ponugoti, R. Wiedemeyer, A.H. Stegh, J.E. Bradner, K.L. Ligon, C. Brennan, L. Chin, R.A. DePinho, Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies, *Science* 318 (2007) 287–290, <https://doi.org/10.1126/science.1142946>.
- [40] G. Zhuang, D.M. Brantley-Sieders, D. Vaught, J. Yu, L. Xie, S. Wells, D. Jackson, R. Muraoka-Cook, C. Arteaga, J. Chen, Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy, *Cancer Res.* 70 (2010) 299–308, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1845>.
- [41] K.R. Amato, S. Wang, L. Tan, A.K. Hastings, W. Song, C.M. Lovly, C.B. Meador, F. Ye, P. Lu, J.M. Balko, D.C. Colvin, J.M. Cates, W. Pao, N.S. Gray, J. Chen, EPHA2 blockade overcomes acquired resistance to EGFR kinase inhibitors in lung cancer, *Cancer Res.* 76 (2016) 305–318, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0717>.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abreu FBD, Schwartz GN, Wells WA, Tsongalis GJ. Personalized therapy for breast cancer. *Clinical Genetics* 2014;86:62–7. doi:10.1111/cge.12381.

Adams S, Schmid P, Rugo HS, Winer EP, Loirat D, Awada A, et al. Phase 2 study of pembrolizumab (pembro) monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): KEYNOTE-086 cohort A. *JCO* 2017;35:1008–1008. doi:10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.1008.

Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, Mougel A, Page A, Romon R, et al. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:346–51. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1183.

Ahn BY, Saldanha-Gama RFG, Rahn JJ, Hao X, Zhang J, Dang N-H, et al. Glioma invasion mediated by the p75 neurotrophin receptor (p75(NTR)/CD271) requires regulated interaction with PDLIM1. *Oncogene* 2016;35:1411–22. doi:10.1038/onc.2015.199.

Alberti S. A phosphoinositide-binding sequence is shared by PH domain target molecules—a model for the binding of PH domains to proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 1998;31:1–9. doi:10.1002/(SICI)1097-0134(19980401)31:1<1::AID-PROT1>3.0.CO;2-R.

Allen M, Louise Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol* 2011;223:162–76. doi:10.1002/path.2803.

Allinen M, Beroukhim R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 2004;6:17–32. doi:10.1016/j.ccr.2004.06.010.

Al-Shawi R, Hafner A, Chun S, Raza S, Crutcher K, Thrasivoulou C, et al. ProNGF, sortilin, and age-related neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1119:208–15. doi:10.1196/annals.1404.024.

Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al., editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Springer International Publishing; 2017a.

Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* 2017b;67:93–9. doi:10.3322/caac.21388.

Ancot F, Foveau B, Lefebvre J, Leroy C, Tulasne D. Proteolytic cleavages give receptor tyrosine kinases the gift of ubiquity. *Oncogene* 2009;28:2185–95. doi:10.1038/onc.2009.88.

Arce C, Pérez-Plasencia C, González-Fierro A, Cruz-Hernández E de la, Revilla-Vázquez A, Chávez-Blanco A, et al. A Proof-Of-Principle Study of Epigenetic Therapy Added to Neoadjuvant Doxorubicin Cyclophosphamide for Locally Advanced Breast Cancer. *PLOS ONE* 2006;1:e98. doi:10.1371/journal.pone.0000098.

BIBLIOGRAPHIE

- Ardini E, Bosotti R, Borgia AL, De Ponti C, Somaschini A, Cammarota R, et al. The TPM3-NTRK1 rearrangement is a recurring event in colorectal carcinoma and is associated with tumor sensitivity to TRKA kinase inhibition. *Mol Oncol* 2014;8:1495–507. doi:10.1016/j.molonc.2014.06.001.
- Arendt LM, Rudnick JA, Keller PJ, Kuperwasser C. Stroma in Breast Development and Disease. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21:11–8. doi:10.1016/j.semcd.2009.10.003.
- Arevalo JC, Conde B, Hempstead BI, Chao MV, Martín-Zanca D, Pérez P. A novel mutation within the extracellular domain of TrkA causes constitutive receptor activation. *Oncogene* 2001;20:1229–34. doi:10.1038/sj.onc.1204215.
- Arevalo JC, Conde B, Hempstead BL, Chao MV, Martín-Zanca D, Pérez P. TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* 2000;20:5908–16.
- Arévalo JC, Yano H, Teng KK, Chao MV. A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *EMBO J* 2004;23:2358–68. doi:10.1038/sj.emboj.7600253.
- Ariga M, Nedachi T, Katagiri H, Kanzaki M. Functional role of sortilin in myogenesis and development of insulin-responsive glucose transport system in C2C12 myocytes. *J Biol Chem* 2008;283:10208–20. doi:10.1074/jbc.M710604200.
- Armugam A, Koh DCI, Ching CS, Chandrasekaran K, Kaur P, Jeyaseelan K. Pro-domain in precursor nerve growth factor mediates cell death. *Neurochem Int* 2012;60:852–63. doi:10.1016/j.neuint.2012.03.006.
- Arrighi N, Bodei S, Zani D, Simeone C, Cunico SC, Missale C, et al. Nerve growth factor signaling in prostate health and disease. *Growth Factors* 2010;28:191–201. doi:10.3109/08977190903578678.
- Arun G, Diermeier S, Akerman M, Chang K-C, Wilkinson JE, Hearn S, et al. Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss. *Genes Dev* 2016;30:34–51. doi:10.1101/gad.270959.115.
- Arun G, Diermeier SD, Spector DL. Therapeutic Targeting of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *Trends in Molecular Medicine* 2018;24:257–77. doi:10.1016/j.molmed.2018.01.001.
- Aubert L, Guilbert M, Corbet C, Génot E, Adriaenssens E, Chassat T, et al. NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib. *Oncotarget* 2015;6:9807–19. doi:10.18632/oncotarget.3227.
- Augereau P, Patsouris A, Bourbouloux E, Gourmelon C, Abadie Lacourtoisie S, Berton Rigaud D, et al. Hormonoresistance in advanced breast cancer: a new revolution in endocrine therapy. *Ther Adv Med Oncol* 2017;9:335–46. doi:10.1177/1758834017693195.

BIBLIOGRAPHIE

Aulmann S, Adler N, Rom J, Helmchen B, Schirmacher P, Sinn HP. c-myc amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences. *J Clin Pathol* 2006;59:424–8. doi:10.1136/jcp.2005.029264.

Ayala GE, Dai H, Powell M, Li R, Ding Y, Wheeler TM, et al. Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:7593–603. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1164.

Bajorath J. Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins* 2000;39.

Baldwin AN, Bitler CM, Welcher AA, Shooter EM. Studies on the structure and binding properties of the cysteine-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR). *J Biol Chem* 1992;267:8352–9.

Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, et al. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol* 1998;140:911–23.

Banerji S, Day AJ, Kahmann JD, Jackson DG. Characterization of a functional hyaluronan-binding domain from the human CD44 molecule expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 1998;14:371–81. doi:10.1006/prev.1998.0971.

Bannwarth B, Kostine M. Nerve Growth Factor Antagonists: Is the Future of Monoclonal Antibodies Becoming Clearer? *Drugs* 2017;77:1377–87. doi:10.1007/s40265-017-0781-6.

Barde Y-A. The nerve growth factor family. *Progress in Growth Factor Research* 1990;2:237–48. doi:10.1016/0955-2235(90)90021-B.

Barford K, Keeler A, McMahon L, McDaniel K, Yap CC, Deppmann CD, et al. Transcytosis of TrkA leads to diversification of dendritic signaling endosomes. *Sci Rep* 2018;8:4715. doi:10.1038/s41598-018-23036-8.

Barker PA. High Affinity Not in the Vicinity? *Neuron* 2007;53:1–4. doi:10.1016/j.neuron.2006.12.018.

Barker PA. p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 2004;42:529–33. doi:10.1016/j.neuron.2004.04.001.

Barker PA, Lomen-Hoerth C, Gensch EM, Meakin SO, Glass DJ, Shooter EM. Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J Biol Chem* 1993;268:15150–7.

Barker PA, Shooter EM. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* 1994;13:203–15.

Barrett GL. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 2000;61:205–29.

BIBLIOGRAPHIE

Barsky SH, Karlin NJ. Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005;10:249–60. doi:10.1007/s10911-005-9585-5.

Bartley TD, Hunt RW, Welcher AA, Boyle WJ, Parker VP, Lindberg RA, et al. B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature* 1994;368:558–60. doi:10.1038/368558a0.

Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, Rugo HS, Sahmoud T, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012;366:520–9. doi:10.1056/NEJMoa1109653.

Baselga J, Gómez P, Greil R, Braga S, Climent MA, Wardley AM, et al. Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:2586–92. doi:10.1200/JCO.2012.46.2408.

Basu S, Chen W, Tchou J, Mavi A, Cermik T, Czerniecki B, et al. Comparison of triple-negative and estrogen receptor-positive/progesterone receptor-positive/HER2-negative breast carcinoma using quantitative fluorine-18 fluorodeoxyglucose/positron emission tomography imaging parameters. *Cancer* 2008;112:995–1000. doi:10.1002/cncr.23226.

Beaber EF, Malone KE, Tang M-TC, Barlow WE, Porter PL, Daling JR, et al. Oral contraceptives and breast cancer risk overall and by molecular subtype among young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:755–64. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-0944.

Beattie EC, Howe CL, Wilde A, Brodsky FM, Mobley WC. NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *J Neurosci* 2000;20:7325–33.

Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, et al. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 2002;36:375–86.

Beauchamp A, Lively MO, Mintz A, Gibo D, Wykosky J, Debinski W. EphrinA1 is released in three forms from cancer cells by matrix metalloproteases. *Mol Cell Biol* 2012;32:3253–64. doi:10.1128/MCB.06791-11.

Bennett KL, Jackson DG, Simon JC, Tanczos E, Peach R, Modrell B, et al. CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol* 1995;128:687–98.

Bernabeu RO, Longo FM. The p75 neurotrophin receptor is expressed by adult mouse dentate progenitor cells and regulates neuronal and non-neuronal cell genesis. *BMC Neurosci* 2010;11:136. doi:10.1186/1471-2202-11-136.

Berrada N, Delalogue S, André F. Treatment of triple-negative metastatic breast cancer: toward individualized targeted treatments or chemosensitization? *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 7:vii30-35. doi:10.1093/annonc/mdq279.

BIBLIOGRAPHIE

Berteaux N, Aptel N, Cathala G, Genton C, Coll J, Daccache A, et al. A Novel H19 Antisense RNA Overexpressed in Breast Cancer Contributes to Paternal IGF2 Expression. *Mol Cell Biol* 2008;28:6731–45. doi:10.1128/MCB.02103-07.

Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, Dumay A, Poirot B, Porcher R, et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast* 2013;22 Suppl 2:S27-29. doi:10.1016/j.breast.2013.07.005.

Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J* 1999;18:616–22. doi:10.1093/emboj/18.3.616.

Bièche I, Lidereau R. Loss of heterozygosity at 13q14 correlates with RB1 gene underexpression in human breast cancer. *Mol Carcinog* 2000;29:151–8.

Bierl MA, Isaacson LG. Increased NGF proforms in aged sympathetic neurons and their targets. *Neurobiology of Aging* 2007;28:122–34. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.11.008.

Bifulco M, Pisanti S. “Adiponcosis”: A New Term to Name the Obesity and Cancer Link. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:4664–5. doi:10.1210/jc.2013-2645.

Biglia N, Peano E, Sgandurra P, Moggio G, Pecchio S, Maggiorotto F, et al. Body mass index (BMI) and breast cancer: impact on tumor histopathologic features, cancer subtypes and recurrence rate in pre and postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 2013;29:263–7. doi:10.3109/09513590.2012.736559.

Bilderback TR, Gazula VR, Dobrowsky RT. Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways. *J Neurochem* 2001;76:1540–51.

Bilderback TR, Grigsby RJ, Dobrowsky RT. Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae. *J Biol Chem* 1997;272:10922–7.

Birbrair A, Zhang T, Wang Z-M, Messi ML, Olson JD, Mintz A, et al. Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2014;307:C25-38. doi:10.1152/ajpcell.00084.2014.

Blick T, Widodo E, Hugo H, Waltham M, Lenburg ME, Neve RM, et al. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 2008;25:629–42. doi:10.1007/s10585-008-9170-6.

Blöchl A, Blöchl R. A cell-biological model of p75NTR signaling. *J Neurochem* 2007;102:289–305. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04496.x.

Blöchl A, Blumenstein L, Ahmadian MR. Inactivation and activation of Ras by the neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci* 2004;20:2321–35. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03692.x.

BIBLIOGRAPHIE

Bloom AP, Jimenez-Andrade JM, Taylor RN, Castañeda-Corral G, Kaczmarska MJ, Freeman KT, et al. Breast Cancer-Induced Bone Remodeling, Skeletal Pain, and Sprouting of Sensory Nerve Fibers. *The Journal of Pain* 2011;12:698–711. doi:10.1016/j.jpain.2010.12.016.

Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957;11:359–77.

Bodmer D, Ascaño M, Kuruvilla R. Isoform-specific dephosphorylation of dynamin1 by calcineurin couples neurotrophin receptor endocytosis to axonal growth. *Neuron* 2011;70:1085–99. doi:10.1016/j.neuron.2011.04.025.

Boilly B, Faulkner S, Jobling P, Hondermarck H. Nerve Dependence: From Regeneration to Cancer. *Cancer Cell* 2017;31:342–54. doi:10.1016/j.ccell.2017.02.005.

Börjesson PKE, Postema EJ, Roos JC, Colnot DR, Marres HAM, van Schie MH, et al. Phase I therapy study with (186)Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:3961S-72S.

Børresen-Dale A-L. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* 2003;21:292–300. doi:10.1002/humu.10174.

Bosco EE, Knudsen ES. RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis and treatment. *Cell Cycle* 2007;6:667–71. doi:10.4161/cc.6.6.3988.

Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, Shen W, Shen D, Koboldt DC, et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov* 2013;3:224–37. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0349.

Bose S, Wang SI, Terry MB, Hibshoosh H, Parsons R. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. *Oncogene* 1998;17:123–7. doi:10.1038/sj.onc.1201940.

Bothwell M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Res* 2016;5. doi:10.12688/f1000research.8434.1.

Bourguignon LY, Zhu D, Zhu H. CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. *Front Biosci* 1998;3:d637-649.

Bourguignon LYW, Wong G, Earle C, Chen L. Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J Biol Chem* 2012;287:32800–24. doi:10.1074/jbc.M111.308528.

Boutillier J, Ceni C, Pagdala PC, Forgie A, Neet KE, Barker PA. Proneurotrophins require endocytosis and intracellular proteolysis to induce TrkA activation. *J Biol Chem* 2008;283:12709–16. doi:10.1074/jbc.M710018200.

Boyd NF, Lockwood GA, Martin LJ, Knight JA, Byng JW, Yaffe MJ, et al. Mammographic densities and breast cancer risk. *Breast Dis* 1998;10:113–26.

BIBLIOGRAPHIE

Brábek J, Constancio SS, Siesser PF, Shin N-Y, Pozzi A, Hanks SK. Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of SRC-transformed cells. *Mol Cancer Res* 2005;3:307–15. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0015.

Bradshaw RA, Chalkley RJ, Biarc J, Burlingame AL. Receptor Tyrosine Kinase Signaling Mechanisms: Devolving TrkA Responses with Phosphoproteomics. *Adv Biol Regul* 2013;53:87–96. doi:10.1016/j.jbior.2012.10.006.

Brann AB, Scott R, Neuberger Y, Abulafia D, Boldin S, Fainzilber M, et al. Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 1999;19:8199–206.

Brennan C, Rivas-Plata K, Landis SC. The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons in vivo. *Nat Neurosci* 1999;2:699–705. doi:10.1038/11158.

Brentnall TA, Lai LA, Coleman J, Bronner MP, Pan S, Chen R. Arousal of Cancer-Associated Stroma: Overexpression of Palladin Activates Fibroblasts to Promote Tumor Invasion. *PLOS ONE* 2012;7:e30219. doi:10.1371/journal.pone.0030219.

Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, Thorner J, Gibson HL, Brake AJ, et al. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol* 1990;111:2851–9.

Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th Edition. John Wiley & Sons, Ltd. 2017.

Briskin C, Park S, Vass T, Lydon JP, O'Malley BW, Weinberg RA. A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5076–81.

Brody LC, Biesecker BB. Breast cancer susceptibility genes. BRCA1 and BRCA2. *Medicine (Baltimore)* 1998;77:208–26.

Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 2000;100:391–8.

Brown RL, Reinke LM, Damerow MS, Perez D, Chodosh LA, Yang J, et al. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *Journal of Clinical Investigation* 2011;121:1064–74. doi:10.1172/JCI44540.

Brown TA, Bouchard T, St John T, Wayner E, Carter WG. Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol* 1991;113:207–21.

Brummer T, Schmitz-Peiffer C, Daly RJ. Docking proteins. *FEBS J* 2010;277:4356–69. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07865.x.

BIBLIOGRAPHIE

Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, et al. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* 2002;156:817–28. doi:10.1083/jcb.200112059.

Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005;434:913–7. doi:10.1038/nature03443.

Brysbaert G, Mauri T, de Ruyck J, Lensink MF. Identification of Key Residues in Proteins Through Centrality Analysis and Flexibility Prediction with RINspecter. *Curr Protoc Bioinformatics* 2018:e66. doi:10.1002/cpbi.66.

Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 1989;58:1097–105.

Buchsbaum RJ, Oh SY. Breast Cancer-Associated Fibroblasts: Where We Are and Where We Need to Go. *Cancers (Basel)* 2016;8. doi:10.3390/cancers8020019.

Bueker ED. Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response of the lumbosacral nervous system. *The Anatomical Record* 1948;102:369–89. doi:10.1002/ar.1091020309.

Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 2008;8:671–82. doi:10.1038/nrc2399.

Butowt R, von Bartheld CS. Fates of neurotrophins after retrograde axonal transport: phosphorylation of p75NTR is a sorting signal for delayed degradation. *J Neurosci* 2009;29:10715–29. doi:10.1523/JNEUROSCI.2512-09.2009.

Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 1974;53:661–74.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2999–3004. doi:10.1073/pnas.0307323101.

Campagnolo L, Costanza G, Francesconi A, Arcuri G, Moscatelli I, Orlandi A. Sortilin expression is essential for pro-nerve growth factor-induced apoptosis of rat vascular smooth muscle cells. *PLoS ONE* 2014;9:e84969. doi:10.1371/journal.pone.0084969.

Candido J, Hagemann T. Cancer-related inflammation. *J Clin Immunol* 2013;33 Suppl 1:S79-84. doi:10.1007/s10875-012-9847-0.

Canuel M, Lefrancois S, Zeng J, Morales CR. AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:724–30. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.015.

Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:683–92. doi:10.1038/nrclinonc.2010.154.

BIBLIOGRAPHIE

Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, Mayer EL, Esteva FJ, Ma CX, et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:2615–23. doi:10.1200/JCO.2010.34.5579.

Carlo A-S, Gustafsen C, Mastrobuoni G, Nielsen MS, Burgert T, Hartl D, et al. The pro-neurotrophin receptor sortilin is a major neuronal apolipoprotein E receptor for catabolism of amyloid- β peptide in the brain. *J Neurosci* 2013;33:358–70. doi:10.1523/JNEUROSCI.2425-12.2013.

Casaccia-Bonnet P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 1996;383:716–9. doi:10.1038/383716a0.

Cattaneo F, Guerra G, Parisi M, De Marinis M, Tafuri D, Cinelli M, et al. Cell-Surface Receptors Transactivation Mediated by G Protein-Coupled Receptors. *Int J Mol Sci* 2014;15:19700–28. doi:10.3390/ijms151119700.

Cavaliere E, Chakravarti D, Guttenplan J, Hart E, Ingle J, Jankowiak R, et al. Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention. *Biochim Biophys Acta* 2006;1766:63–78. doi:10.1016/j.bbcan.2006.03.001.

Ceni C, Kommaddi RP, Thomas R, Vereker E, Liu X, McPherson PS, et al. The p75NTR intracellular domain generated by neurotrophin-induced receptor cleavage potentiates Trk signaling. *J Cell Sci* 2010;123:2299–307. doi:10.1242/jcs.062612.

Ceriani RL. Fetal mammary gland differentiation in vitro in response to hormones. I. Morphological findings. *Dev Biol* 1970a;21:506–29.

Ceriani RL. Fetal mammary gland differentiation in vitro in response to hormones. II. Biochemical findings. *Dev Biol* 1970b;21:530–46.

Ceyhan GO, Schäfer K-H, Kerscher AG, Rauch U, Demir IE, Kadihasanoglu M, et al. Nerve growth factor and artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg* 2010;251:923–31. doi:10.1097/SLA.0b013e3181d974d4.

Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:7950–5. doi:10.1073/pnas.1102454108.

Chan A, Delaloge S, Holmes FA, Moy B, Iwata H, Harvey VJ, et al. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer (ExteNET): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016;17:367–77. doi:10.1016/S1470-2045(15)00551-3.

Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000;288:2351–4.

BIBLIOGRAPHIE

Chan M, Liaw CS, Ji SM, Tan HH, Wong CY, Thike AA, et al. Identification of Circulating MicroRNA Signatures for Breast Cancer Detection. *Clin Cancer Res* 2013;19:4477–87. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3401.

Chao MV. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience* 2003;4:299–309. doi:10.1038/nrn1078.

Chao MV, Bothwell M. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 2002;33:9–12.

Chao MV, Bothwell MA, Ross AH, Koprowski H, Lanahan AA, Buck CR, et al. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 1986;232:518–21.

Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:736–50. doi:10.1093/jnci/djp082.

Cheetham SW, Gruhl F, Mattick JS, Dinger ME. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. *Br J Cancer* 2013;108:2419–25. doi:10.1038/bjc.2013.233.

Chellaiah MA, Schaller MD. Activation of Src kinase by protein-tyrosine phosphatase-PEST in osteoclasts: comparative analysis of the effects of bisphosphonate and protein-tyrosine phosphatase inhibitor on Src activation in vitro. *J Cell Physiol* 2009;220:382–93. doi:10.1002/jcp.21777.

Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, Shi Y, et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med* 2015;13:45. doi:10.1186/s12916-015-0278-7.

Chen J, Almo SC, Wu Y. General principles of binding between cell surface receptors and multi-specific ligands: A computational study. *PLOS Computational Biology* 2017;13:e1005805. doi:10.1371/journal.pcbi.1005805.

Chen JJ, Silver D, Cantor S, Livingston DM, Scully R. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res* 1999;59:1752s-1756s.

Chen LW, Yung KKL, Chan YS, Shum DKY, Bolam JP. The proNGF-p75NTR-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008;7:512–23.

Chen Z, Guo L, Hadas J, Gutowski S, Sprang SR, Sternweis PC. Activation of p115-RhoGEF requires direct association of Gα13 and the Dbl homology domain. *J Biol Chem* 2012;287:25490–500. doi:10.1074/jbc.M111.333716.

Chen Z-Y, Ieraci A, Tanowitz M, Lee FS. A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors. *Mol Biol Cell* 2005;16:5761–72. doi:10.1091/mbc.e05-07-0651.

Chia KM, Liu J, Francis GD, Naderi A. A feedback loop between androgen receptor and ERK signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. *Neoplasia* 2011;13:154–66.

BIBLIOGRAPHIE

Cho K-W, Kim J-Y, Song S-J, Farrell E, Eblaghie MC, Kim H-J, et al. Molecular interactions between Tbx3 and Bmp4 and a model for dorsoventral positioning of mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:16788–93. doi:10.1073/pnas.0604645103.

Chopin V, Lagadec C, Toillon R-A, Le Bourhis X. Neurotrophin signaling in cancer stem cells. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:1859–70. doi:10.1007/s00018-016-2156-7.

Choy C, Ansari KI, Neman J, Hsu S, Duenas MJ, Li H, et al. Cooperation of neurotrophin receptor TrkB and Her2 in breast cancer cells facilitates brain metastases. *Breast Cancer Res* 2017;19:51. doi:10.1186/s13058-017-0844-3.

Chrzan P, Skokowski J, Karmolinski A, Pawelczyk T. Amplification of c-myc gene and overexpression of c-Myc protein in breast cancer and adjacent non-neoplastic tissue. *Clin Biochem* 2001;34:557–62.

Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet* 2013;45:1127–33. doi:10.1038/ng.2762.

Ciruelos E, Pascual T, Arroyo Vozmediano ML, Blanco M, Manso L, Parrilla L, et al. The therapeutic role of fulvestrant in the management of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Breast* 2014;23:201–8. doi:10.1016/j.breast.2014.01.016.

Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;366:2087–106. doi:10.1016/S0140-6736(05)67887-7.

Clary DO, Reichardt LF. An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994a;91:11133–7.

Clary DO, Reichardt LF. An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994b;91:11133–7.

Clewes O, Fahey MS, Tyler SJ, Watson JJ, Seok H, Catania C, et al. Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin. *J Neurochem* 2008;107:1124–35. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05698.x.

Clucas J, Valderrama F. ERM proteins in cancer progression. *J Cell Sci* 2014;127:267–75. doi:10.1242/jcs.133108.

Cohen S. PURIFICATION OF A NERVE-GROWTH PROMOTING PROTEIN FROM THE MOUSE SALIVARY GLAND AND ITS NEURO-CYTOTOXIC ANTISERUM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1960;46:302–11.

Coleman RE, Gregory W, Marshall H, Wilson C, Holen I. The metastatic microenvironment of breast cancer: clinical implications. *Breast* 2013;22 Suppl 2:S50-56. doi:10.1016/j.breast.2013.07.010.

BIBLIOGRAPHIE

Coleman S, Silberstein GB, Daniel CW. Ductal morphogenesis in the mouse mammary gland: evidence supporting a role for epidermal growth factor. *Dev Biol* 1988;127:304–15.

Colitti M. Expression of NGF, BDNF and their high-affinity receptors in ovine mammary glands during development and lactation. *Histochem Cell Biol* 2015;144:559–70. doi:10.1007/s00418-015-1360-0.

Collins C, Carducci MA, Eisenberger MA, Isaacs JT, Partin AW, Pili R, et al. Preclinical and clinical studies with the multi-kinase inhibitor CEP-701 as treatment for prostate cancer demonstrate the inadequacy of PSA response as a primary endpoint. *Cancer Biol Ther* 2007;6:1360–7.

Colnot DR, Roos JC, de Bree R, Wilhelm AJ, Kummer JA, Hanft G, et al. Safety, biodistribution, pharmacokinetics, and immunogenicity of 99mTc-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:576–82. doi:10.1007/s00262-003-0396-5.

Colombo E, Romaggi S, Blasevich F, Mora M, Falcone C, Lochmüller H, et al. The neurotrophin receptor p75NTR is induced on mature myofibres in inflammatory myopathies and promotes myotube survival to inflammatory stress. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012;38:367–78. doi:10.1111/j.1365-2990.2011.01212.x.

Com E, Lagadec C, Page A, El Yazidi-Belkoura I, Slomianny C, Spencer A, et al. Nerve growth factor receptor TrkA signaling in breast cancer cells involves Ku70 to prevent apoptosis. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1842–54. doi:10.1074/mcp.M700119-MCP200.

Connolly RM, Li H, Jankowitz RC, Zhang Z, Rudek MA, Jeter SC, et al. Combination Epigenetic Therapy in Advanced Breast Cancer with 5-Azacididine and Entinostat: A Phase II National Cancer Institute/Stand Up to Cancer Study. *Clin Cancer Res* 2017;23:2691–701. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1729.

Conte PF, Gennari A, Landucci E, Orlandini C. Role of epirubicin in advanced breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2000;1 Suppl 1:S46-51.

Corbit KC, Foster DA, Rosner MR. Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* 1999;19:4209–18.

Cortez CC, Jones PA. Chromatin, cancer and drug therapies. *Mutat Res* 2008;647:44–51. doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.07.006.

COSMIC, Catalogue of somatic Mutations in Cancer. COSMIC - Catalogue of Somatic Mutations in Cancer 2018. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> (accessed July 26, 2018).

Coulson EJ, Reid K, Baca M, Shipham KA, Hulett SM, Kilpatrick TJ, et al. Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem* 2000;275:30537–45. doi:10.1074/jbc.M005214200.

BIBLIOGRAPHIE

Coulson EJ, Reid K, Shipham KM, Morley S, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog Brain Res* 2004;146:41–62. doi:10.1016/S0079-6123(03)46003-2.

Covaceuszach S, Konarev PV, Cassetta A, Paoletti F, Svergun DI, Lamba D, et al. The conundrum of the high-affinity NGF binding site formation unveiled? *Biophys J* 2015;108:687–97. doi:10.1016/j.bpj.2014.11.3485.

Croft DR, Olson MF. The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2006;26:4612–27. doi:10.1128/MCB.02061-05.

Crowley WR. Neuroendocrine regulation of lactation and milk production. *Compr Physiol* 2015;5:255–91. doi:10.1002/cphy.c140029.

Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch* 2018;472:697–703. doi:10.1007/s00428-018-2301-9.

da Cunha A, Michelin MA, Murta EF. Pattern response of dendritic cells in the tumor microenvironment and breast cancer. *World J Clin Oncol* 2014;5:495–502. doi:10.5306/wjco.v5.i3.495.

Cunningham ME, Stephens RM, Kaplan DR, Greene LA. Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 1997;272:10957–67.

Cunningham-Edmondson AC, Hanks SK. p130Cas substrate domain signaling promotes migration, invasion, and survival of estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2009;1:39–52.

Curtis C, Shah SP, Chin S-F, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012;486:346–52. doi:10.1038/nature10983.

Curtis J, Finkbeiner S. Sending signals from the synapse to the nucleus: possible roles for CaMK, Ras/ERK, and SAPK pathways in the regulation of synaptic plasticity and neuronal growth. *J Neurosci Res* 1999;58:88–95.

Cuzick J. Aromatase inhibitors in prevention--data from the ATAC (arimidex, tamoxifen alone or in combination) trial and the design of IBIS-II (the second International Breast Cancer Intervention Study). *Recent Results Cancer Res* 2003;163:96–103; discussion 264-266.

Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* 2015;5:2929–43.

Dail M, Kalo MS, Seddon JA, Côté J-F, Vuori K, Pasquale EB. SHEP1 function in cell migration is impaired by a single amino acid mutation that disrupts association with the scaffolding protein cas but not with Ras GTPases. *J Biol Chem* 2004;279:41892–902. doi:10.1074/jbc.M402929200.

BIBLIOGRAPHIE

Dall P, Heider KH, Sinn HP, Skroch-Angel P, Adolf G, Kaufmann M, et al. Comparison of immunohistochemistry and RT-PCR for detection of CD44v-expression, a new prognostic factor in human breast cancer. *Int J Cancer* 1995;60:471–7.

Damaskos C, Valsami S, Kontos M, Spartalis E, Kalampokas T, Kalampokas E, et al. Histone Deacetylase Inhibitors: An Attractive Therapeutic Strategy Against Breast Cancer. *Anticancer Res* 2017;37:35–46.

Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* 2006;16:253–64. doi:10.1016/j.semcancer.2006.07.014.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231–41.

Davidson B, Lazarovici P, Ezersky A, Nesland JM, Berner A, Risberg B, et al. Expression levels of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 in effusions and solid tumors of serous ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2001;7:3457–64.

Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Ann Flørenes V, Nielsen S, Nesland JM. Altered expression and activation of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 provide the first evidence of tumor progression to effusion in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004;83:119–28. doi:10.1023/B:BREA.0000010704.17479.8a.

Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* 1998;17:4426–41. doi:10.1093/emboj/17.15.4426.

DeFreitas MF, McQuillen PS, Shatz CJ. A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons. *J Neurosci* 2001;21:5121–9.

Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock BJ. C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer* 2000;83:1688–95. doi:10.1054/bjoc.2000.1522.

Demir IE, Tieftrunk E, Schorn S, Friess H, Ceyhan GO. Nerve growth factor & TrkA as novel therapeutic targets in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2016;1866:37–50. doi:10.1016/j.bbcan.2016.05.003.

Demont Y, Corbet C, Page A, Ataman-Önal Y, Choquet-Kastylevsky G, Fliniaux I, et al. Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein. *J Biol Chem* 2012;287:1923–31. doi:10.1074/jbc.M110.211714.

Denk F, Bennett DL, McMahon SB. Nerve Growth Factor and Pain Mechanisms. *Annual Review of Neuroscience* 2017;40:307–25. doi:10.1146/annurev-neuro-072116-031121.

Dépistage du cancer du sein | Institut National Du Cancer. [www.e-CancerFr](http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Se-faire-depister/Depistage-du-cancer-du-sein/Cancer-du-sein-la-detection-precoce) 2018. <http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Se-faire-depister/Depistage-du-cancer-du-sein/Cancer-du-sein-la-detection-precoce> (accessed August 21, 2018).

BIBLIOGRAPHIE

Descamps S, Lebourhis X, Delehedde M, Boilly B, Hondermarck H. Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:16659–62.

Descamps S, Pawlowski V, Révillion F, Hornez L, Hebbar M, Boilly B, et al. Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res* 2001a;61:4337–40.

Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V, et al. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 2001b;276:17864–70. doi:10.1074/jbc.M010499200.

D'Esposito V, Liguoro D, Ambrosio MR, Collina F, Cantile M, Spinelli R, et al. Adipose microenvironment promotes triple negative breast cancer cell invasiveness and dissemination by producing CCL5. *Oncotarget* 2016;7:24495–509. doi:10.18632/oncotarget.8336.

Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2014;9:287–314. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104715.

Diao D-M, Song Y-C, Hou N, Xu H-F, Wang J-G, Dang C-X. [Responses of pancreatic cancer cells to stimulations by nerve growth factor and the role of Trk-A expression]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2012;32:296–300.

Diaz LK, Zhou X, Wright ET, Cristofanilli M, Smith T, Yang Y, et al. CD44 expression is associated with increased survival in node-negative invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:3309–14. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2184.

Diaz T, Navarro A, Ferrer G, Gel B, Gaya A, Artells R, et al. Lestaurtinib inhibition of the Jak/STAT signaling pathway in hodgkin lymphoma inhibits proliferation and induces apoptosis. *PLoS ONE* 2011;6:e18856. doi:10.1371/journal.pone.0018856.

Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 2008;112:4793–807. doi:10.1182/blood-2008-08-077941.

Dickler MN, Saura C, Richards DA, Krop IE, Cervantes A, Bedard PL, et al. Phase II Study of Taselisib (GDC-0032) in Combination with Fulvestrant in Patients with HER2-Negative, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2018. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0613.

Dicou E, Vincent J-P, Mazella J. Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *J Neurosci Res* 2004;78:92–9. doi:10.1002/jnr.20231.

Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, Conte P, Guarneri V. Rare Breast Cancer Subtypes: Histological, Molecular, and Clinical Peculiarities. *Oncologist* 2014;19:805–13. doi:10.1634/theoncologist.2014-0108.

BIBLIOGRAPHIE

Dikic I, Batzer AG, Blaikie P, Obermeier A, Ullrich A, Schlessinger J, et al. Shc binding to nerve growth factor receptor is mediated by the phosphotyrosine interaction domain. *J Biol Chem* 1995;270:15125–9.

Diolaiti D, Bernardoni R, Trazzi S, Papa A, Porro A, Bono F, et al. Functional cooperation between TrkA and p75(NTR) accelerates neuronal differentiation by increased transcription of GAP-43 and p21(CIP/WAF) genes via ERK1/2 and AP-1 activities. *Exp Cell Res* 2007;313:2980–92. doi:10.1016/j.yexcr.2007.06.002.

Direkze NC, Jeffery R, Hodivala-Dilke K, Hunt T, Playford RJ, Elia G, et al. Bone marrow-derived stromal cells express lineage-related messenger RNA species. *Cancer Res* 2006;66:1265–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3202.

Dirican E, Akkiprik M, Özer A. Mutation distributions and clinical correlations of PIK3CA gene mutations in breast cancer. *Tumour Biol* 2016;37:7033–45. doi:10.1007/s13277-016-4924-2.

Dittrich A, Gautrey H, Browell D, Tyson-Capper A. The HER2 Signaling Network in Breast Cancer--Like a Spider in its Web. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2014;19:253–70. doi:10.1007/s10911-014-9329-5.

Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature* 2012;489:101–8. doi:10.1038/nature11233.

Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1997;57:3347–50.

Dobrowsky RT, Jenkins GM, Hannun YA. Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J Biol Chem* 1995;270:22135–42.

Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao MV, Hannun YA. Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 1994;265:1596–9.

Dollé J-P, Rezvan A, Allen FD, Lazarovici P, Lelkes PI. Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315:1220–7. doi:10.1124/jpet.105.093252.

Dollé L, Adriaenssens E, El Yazidi-Belkoura I, Le Bourhis X, Nurcombe V, Hondermarck H. Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:463–70.

Dollé L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V, Hondermarck H. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22:5592–601. doi:10.1038/sj.onc.1206805.

Domeniconi M, Zampieri N, Spencer T, Hilaire M, Mellado W, Chao MV, et al. MAG induces regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 2005;46:849–55. doi:10.1016/j.neuron.2005.05.029.

BIBLIOGRAPHIE

Dores GM, Anderson WF, Beane Freeman LE, Fraumeni JF, Curtis RE. Risk of breast cancer according to clinicopathologic features among long-term survivors of Hodgkin's lymphoma treated with radiotherapy. *Br J Cancer* 2010;103:1081–4. doi:10.1038/sj.bjc.6605877.

Doucet S, Soussignan R, Sagot P, Schaal B. The Secretion of Areolar (Montgomery's) Glands from Lactating Women Elicits Selective, Unconditional Responses in Neonates. *PLoS One* 2009;4. doi:10.1371/journal.pone.0007579.

Dowling P, Ming X, Raval S, Husar W, Casaccia-Bonnel P, Chao M, et al. Up-regulated p75NTR neurotrophin receptor on glial cells in MS plaques. *Neurology* 1999;53:1676–82.

Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J Clin Oncol* 2013;31:2783–90. doi:10.1200/JCO.2012.46.1558.

Dubus P, Parrens M, El-Mokhtari Y, Ferrer J, Groppi A, Merlio JP. Identification of novel trkA variants with deletions in leucine-rich motifs of the extracellular domain. *J Neuroimmunol* 2000;107:42–9.

Dumalaon-Canaria JA, Hutchinson AD, Prichard I, Wilson C. What causes breast cancer? A systematic review of causal attributions among breast cancer survivors and how these compare to expert-endorsed risk factors. *Cancer Causes Control* 2014;25:771–85. doi:10.1007/s10552-014-0377-3.

Duso BA, Trapani D, Viale G, Criscitiello C, D'Amico P, Belli C, et al. Clinical efficacy of ribociclib as a first-line therapy for HR-positive, advanced breast cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2018;19:299–305. doi:10.1080/14656566.2018.1429407.

Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. Ligation of EphA2 by Ephrin A1-Fc inhibits pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:1096–102. doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.054.

Dworkin AM, Huang TH-M, Toland AE. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Semin Cancer Biol* 2009;19:165–71. doi:10.1016/j.semcancer.2009.02.007.

Edwards RH, Selby MJ, Mobley WC, Weinrich SL, Hruby DE, Rutter WJ. Processing and secretion of nerve growth factor: expression in mammalian cells with a vaccinia virus vector. *Mol Cell Biol* 1988;8:2456–64.

El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Dollé L, Descamps S, Hondermarck H. Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278:16952–6. doi:10.1074/jbc.M300631200.

El Zein N, D'Hondt S, Sariban E. Crosstalks between the receptors tyrosine kinase EGFR and TrkA and the GPCR, FPR, in human monocytes are essential for receptors-mediated cell activation. *Cell Signal* 2010;22:1437–47. doi:10.1016/j.cellsig.2010.05.012.

BIBLIOGRAPHIE

Ellsworth RE, Decewicz DJ, Shriver CD, Ellsworth DL. Breast Cancer in the Personal Genomics Era. *Curr Genomics* 2010;11:146–61. doi:10.2174/138920210791110951.

Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res* 2009;69:3802–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3907.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403–10.

Emdal KB, Pedersen A-K, Bekker-Jensen DB, Tsafoou KP, Horn H, Lindner S, et al. Temporal proteomics of NGF-TrkA signaling identifies an inhibitory role for the E3 ligase Cbl-b in neuroblastoma cell differentiation. *Sci Signal* 2015;8:ra40. doi:10.1126/scisignal.2005769.

English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, et al. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 1999;253:255–70. doi:10.1006/excr.1999.4687.

Entschladen F, Drell TL, Lang K, Joseph J, Zaenker KS. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *Lancet Oncol* 2004;5:254–8. doi:10.1016/S1470-2045(04)01431-7.

Ertel A, L Dean J, Rui H, Liu C, K Witkiewicz A, E Knudsen K, et al. RB-pathway disruption in breast cancer. *Cell Cycle (Georgetown, Tex)* 2010;9:4153–63. doi:10.4161/cc.9.20.13454.

Esposito A, Criscitiello C, Salè EO, Curigliano G. Optimal adjuvant chemotherapy in breast cancer: selection of agents. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 2014;7:605–11. doi:10.1586/17512433.2014.945429.

Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, et al. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* 2001;276:32687–95. doi:10.1074/jbc.M011674200.

Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:564–9.

Evans SF, Irmady K, Ostrow K, Kim T, Nykjaer A, Saftig P, et al. Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation. *J Biol Chem* 2011;286:29556–67. doi:10.1074/jbc.M111.219675.

Evron E, Umbricht CB, Korz D, Raman V, Loeb DM, Niranjana B, et al. Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2001;61:2782–7.

Ewald AJ, Brenot A, Duong M, Chan BS, Werb Z. Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis. *Dev Cell* 2008;14:570–81. doi:10.1016/j.devcel.2008.03.003.

BIBLIOGRAPHIE

Facchetti M, Uberti D, Memo M, Missale C. Nerve Growth Factor Restores p53 Function in Pituitary Tumor Cell Lines via trkA-Mediated Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Mol Endocrinol* 2004;18:162–72. doi:10.1210/me.2003-0190.

Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, Garrett E, Mehrotra J, Polyak K, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer* 2003;107:970–5. doi:10.1002/ijc.11508.

Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci* 2001;18:210–20. doi:10.1006/mcne.2001.1016.

Fahnestock M, Yu G, Michalski B, Mathew S, Colquhoun A, Ross GM, et al. The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *Journal of Neurochemistry* 2004;89:581–92. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02360.x.

Fainaru O, Almog N, Yung CW, Nakai K, Montoya-Zavala M, Abdollahi A, et al. Tumor growth and angiogenesis are dependent on the presence of immature dendritic cells. *FASEB J* 2010;24:1411–8. doi:10.1096/fj.09-147025.

Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DSA, Nobel AB, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355:560–9. doi:10.1056/NEJMoa052933.

Fang WB, Ireton RC, Zhuang G, Takahashi T, Reynolds A, Chen J. Overexpression of EPHA2 receptor destabilizes adherens junctions via a RhoA-dependent mechanism. *J Cell Sci* 2008;121:358–68. doi:10.1242/jcs.017145.

Farina AR, Tacconelli A, Cappabianca L, Cea G, Panella S, Chioda A, et al. The alternative TrkAIII splice variant targets the centrosome and promotes genetic instability. *Mol Cell Biol* 2009;29:4812–30. doi:10.1128/MCB.00352-09.

Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati Pratyaksha, Wirapati Pratyakasha, et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 2009;15:68–74. doi:10.1038/nm.1908.

Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005;24:4660–71. doi:10.1038/sj.onc.1208561.

Fathi AT, Chabner BA. FLT3 inhibition as therapy in acute myeloid leukemia: a record of trials and tribulations. *Oncologist* 2011;16:1162–74. doi:10.1634/theoncologist.2011-0084.

Faulkner S, Jobling P, Rowe CW, Rodrigues Oliveira SM, Roselli S, Thorne RF, et al. Neurotrophin Receptors TrkA, p75NTR, and Sortilin Are Increased and Targetable in Thyroid Cancer. *Am J Pathol* 2018;188:229–41. doi:10.1016/j.ajpath.2017.09.008.

BIBLIOGRAPHIE

Feilotter HE, Coulon V, McVeigh JL, Boag AH, Dorion-Bonnet F, Duboué B, et al. Analysis of the 10q23 chromosomal region and the PTEN gene in human sporadic breast carcinoma. *Br J Cancer* 1999;79:718–23. doi:10.1038/sj.bjc.6690115.

Feng D, Kim T, Ozkan E, Light M, Torkin R, Teng KK, et al. Molecular and structural insight into proNGF engagement of p75NTR and sortilin. *J Mol Biol* 2010;396:967–84. doi:10.1016/j.jmb.2009.12.030.

Feng Y, Manka D, Wagner K-U, Khan SA. Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:14718–23. doi:10.1073/pnas.0706933104.

Festuccia C, Muzi P, Gravina GL, Millimaggi D, Specca S, Dolo V, et al. Tyrosine kinase inhibitor CEP-701 blocks the NTRK1/NGF receptor and limits the invasive capability of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 2007;30:193–200.

Fiegl H, Millinger S, Goebel G, Müller-Holzner E, Marth C, Laird PW, et al. Breast cancer DNA methylation profiles in cancer cells and tumor stroma: association with HER-2/neu status in primary breast cancer. *Cancer Res* 2006;66:29–33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2508.

Figuerola-Magalhães MC, Jelovac D, Connolly R, Wolff AC. Treatment of HER2-positive Breast Cancer. *Breast* 2014;23:128–36. doi:10.1016/j.breast.2013.11.011.

Filippini SE, Vega A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013;18:1358–72.

Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 2008;14:518–27. doi:10.1038/nm1764.

Finan GM, Okada H, Kim T-W. BACE1 retrograde trafficking is uniquely regulated by the cytoplasmic domain of sortilin. *J Biol Chem* 2011;286:12602–16. doi:10.1074/jbc.M110.170217.

Finger C, Escher C, Schneider D. The single transmembrane domains of human receptor tyrosine kinases encode self-interactions. *Sci Signal* 2009;2:ra56. doi:10.1126/scisignal.2000547.

Finn RS, Bengala C, Ibrahim N, Roché H, Sparano J, Strauss LC, et al. Dasatinib as a single agent in triple-negative breast cancer: results of an open-label phase 2 study. *Clin Cancer Res* 2011;17:6905–13. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0288.

Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im S-A, Gelmon K, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2016;375:1925–36. doi:10.1056/NEJMoa1607303.

Firoozinia M, Zareian Jahromi M, Moghadamtousi SZ, Nikzad S, Abdul Kadir H. PIK3CA gene amplification and PI3K p110 α protein expression in breast carcinoma. *Int J Med Sci* 2014;11:620–5. doi:10.7150/ijms.8251.

BIBLIOGRAPHIE

Fitzhugh Michael. Celldex TNBC trial failure dashes company's plans. BioWorld 2018. <http://www.bioworld.com/content/celldex-tnbc-trial-failure-dashes-company%E2%80%99s-plans> (accessed August 27, 2018).

Foehr ED, Lin X, O'Mahony A, Geleziunas R, Bradshaw RA, Greene WC. NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J Neurosci* 2000;20:7556–63.

Folgueira MAAK, Maistro S, Katayama MLH, Roela RA, Mundim FGL, Nanogaki S, et al. Markers of breast cancer stromal fibroblasts in the primary tumour site associated with lymph node metastasis: a systematic review including our case series. *Biosci Rep* 2013;33. doi:10.1042/BSR20130060.

Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009;361:123–34. doi:10.1056/NEJMoa0900212.

Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* 2017;7:1016–36.

Frade JM. NRAGE and the cycling side of the neurotrophin receptor p75. *Trends Neurosci* 2000;23:591–2.

Frade JM, Barde YA. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* 1999;126:683–90.

Franzmann EJ, Weed DT, Civantos FJ, Goodwin WJ, Bourguignon LY. A novel CD44 v3 isoform is involved in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;124:426–32.

Frattini V, Trifonov V, Chan JM, Castano A, Lia M, Abate F, et al. The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. *Nat Genet* 2013;45:1141–9. doi:10.1038/ng.2734.

Frings O, Augsten M, Tobin NP, Carlson J, Paulsson J, Pena C, et al. Prognostic significance in breast cancer of a gene signature capturing stromal PDGF signaling. *Am J Pathol* 2013;182:2037–47. doi:10.1016/j.ajpath.2013.02.018.

Fukumura D, Incio J, Ram c. Shankaraiah, Jain R k. Obesity and Cancer: An Angiogenic and Inflammatory Link. *Microcirculation* 2016;23:191–206. doi:10.1111/micc.12270.

Gandou C, Ohtani A, Senzaki K, Shiga T. Neurotensin promotes the dendrite elongation and the dendritic spine maturation of the cerebral cortex in vitro. *Neurosci Res* 2010;66:246–55. doi:10.1016/j.neures.2009.11.007.

Gao F, Griffin N, Faulkner S, Rowe CW, Williams L, Roselli S, et al. The neurotrophic tyrosine kinase receptor TrkA and its ligand NGF are increased in squamous cell carcinomas of the lung. *Scientific Reports* 2018;8:8135. doi:10.1038/s41598-018-26408-2.

Garcia-Recio S, Fuster G, Fernandez-Nogueira P, Pastor-Arroyo EM, Park SY, Mayordomo C, et al. Substance P autocrine signaling contributes to persistent HER2 activation that drives

BIBLIOGRAPHIE

malignant progression and drug resistance in breast cancer. *Cancer Res* 2013;73:6424–34. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4573.

Gargano N, Levi A, Alema S. Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA receptors. *J Neurosci Res* 1997;50:1–12. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19971001)50:1<1::AID-JNR1>3.0.CO;2-N.

Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell* 2013;153:17–37. doi:10.1016/j.cell.2013.03.002.

Garton AJ, Flint AJ, Tonks NK. Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Mol Cell Biol* 1996;16:6408–18.

Gasbarri A, Martegani MP, Del Prete F, Lucante T, Natali PG, Bartolazzi A. Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules. *J Clin Oncol* 1999;17:3494–502. doi:10.1200/JCO.1999.17.11.3494.

Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2002;4:70. doi:10.1186/bcr426.

Geenen JJJ, Linn SC, Beijnen JH, Schellens JHM. PARP Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Pharmacokinet* 2018;57:427–37. doi:10.1007/s40262-017-0587-4.

Geetha T, Wooten MW. TrkA receptor endolysosomal degradation is both ubiquitin and proteasome dependent. *Traffic* 2008;9:1146–56. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00751.x.

Gehler S, Gallo G, Veien E, Letourneau PC. p75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity. *J Neurosci* 2004;24:4363–72. doi:10.1523/JNEUROSCI.0404-04.2004.

Georgieva MV, de Pablo Y, Sanchis D, Comella JX, Llovera M. Ubiquitination of TrkA by Nedd4-2 regulates receptor lysosomal targeting and mediates receptor signaling. *J Neurochem* 2011;117:479–93. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07218.x.

Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 1994;220:391–401.

Giuliano M, Trivedi MV, Schiff R. Bidirectional Crosstalk between the Estrogen Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Signaling Pathways in Breast Cancer: Molecular Basis and Clinical Implications. *Breast Care (Basel)* 2013;8:256–62. doi:10.1159/000354253.

Glebova NO, Ginty DD. Heterogeneous requirement of NGF for sympathetic target innervation in vivo. *J Neurosci* 2004;24:743–51. doi:10.1523/JNEUROSCI.4523-03.2004.

Global Cancer Observatory. Global Cancer Observatory 2018. <http://gco.iarc.fr/> (accessed December 3, 2018).

Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 1981;23:175–82. doi:10.1016/0092-8674(81)90282-8.

BIBLIOGRAPHIE

- Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 2009;69:2000–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2360.
- Godinho MFE, Sieuwerts AM, Look MP, Meijer D, Foekens JA, Dorssers LCJ, et al. Relevance of BCAR4 in tamoxifen resistance and tumour aggressiveness of human breast cancer. *British Journal of Cancer* 2010;103:1284–91. doi:10.1038/sj.bjc.6605884.
- Goettsch C, Hutcheson JD, Aikawa M, Iwata H, Pham T, Nykjaer A, et al. Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles. *J Clin Invest* 2016;126:1323–36. doi:10.1172/JCI80851.
- Goettsch C, Kjolby M, Aikawa E. Sortilin and Its Multiple Roles in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2018.
- Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1600–8.
- Goldstein LA, Zhou DF, Picker LJ, Minty CN, Bargatze RF, Ding JF, et al. A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 1989;56:1063–72.
- Gonçalves AK, Dantas Florencio GL, Maisonnette de Atayde Silva MJ, Cobucci RN, Giraldo PC, Cote NM. Effects of physical activity on breast cancer prevention: a systematic review. *J Phys Act Health* 2014;11:445–54. doi:10.1123/jpah.2011-0316.
- Goncalves R, Warner WA, Luo J, Ellis MJ. New concepts in breast cancer genomics and genetics. *Breast Cancer Res* 2014;16:460.
- Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Palla SL, Carey M, Agarwal R, Meric-Berstam F, et al. Androgen receptor levels and association with PIK3CA mutations and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:2472–8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1763.
- Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *MP, Mol Pathol* 1999;52:189–96.
- Goodwin PJ, Stambolic V. Impact of the obesity epidemic on cancer. *Annu Rev Med* 2015;66:281–96. doi:10.1146/annurev-med-051613-012328.
- Goss PE, Richardson H, Chlebowski R, Johnston D, Sarto GE, Maunsell E, et al. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group MAP.3 Trial: evaluation of exemestane to prevent breast cancer in postmenopausal women. *Clin Breast Cancer* 2007;7:895–900. doi:10.3816/CBC.2007.n.057.
- Grasgruber P, Hrazdira E, Sebera M, Kalina T. Cancer Incidence in Europe: An Ecological Analysis of Nutritional and Other Environmental Factors. *Front Oncol* 2018;8:151. doi:10.3389/fonc.2018.00151.

BIBLIOGRAPHIE

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997;16:1647–55. doi:10.1093/emboj/16.7.1647.

Greco A, Miranda C, Pierotti MA. Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 2010;321:44–9. doi:10.1016/j.mce.2009.10.009.

Green KA, Streuli CH. Apoptosis regulation in the mammary gland. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1867–83. doi:10.1007/s00018-004-3366-y.

Greenfield B, Wang WC, Marquardt H, Piepkorn M, Wolff EA, Aruffo A, et al. Characterization of the heparan sulfate and chondroitin sulfate assembly sites in CD44. *J Biol Chem* 1999;274:2511–7.

Grewal SS, York RD, Stork PJ. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:544–53. doi:10.1016/S0959-4388(99)00010-0.

Griffin N, Faulkner S, Jobling P, Hondermarck H. Targeting neurotrophin signaling in cancer: The renaissance. *Pharmacol Res* 2018;135:12–7. doi:10.1016/j.phrs.2018.07.019.

Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, Valletta JS, et al. Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci* 1996;16:7950–64.

Grob PM, Ross AH, Koprowski H, Bothwell M. Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 1985;260:8044–9.

Grosshans BL, Ortiz D, Novick P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:11821–7. doi:10.1073/pnas.0601617103.

Guarino M. Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* 2010;223:14–26. doi:10.1002/jcp.22011.

Guerin M, Rezai K, Isambert N, Campone M, Autret A, Pakradouni J, et al. PIKHER2: A phase IB study evaluating buparlisib in combination with lapatinib in trastuzumab-resistant HER2-positive advanced breast cancer. *Eur J Cancer* 2017;86:28–36. doi:10.1016/j.ejca.2017.08.025.

Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zöller M, Haussmann I, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991;65:13–24.

Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010;464:1071–6. doi:10.1038/nature08975.

Gupta SC, Tripathi YN. Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: From biomarkers to therapeutic targets. *International Journal of Cancer* 2017;140:1955–67. doi:10.1002/ijc.30546.

BIBLIOGRAPHIE

Haddad Y, Adam V, Heger Z. Trk Receptors and Neurotrophin Cross-Interactions: New Perspectives Toward Manipulating Therapeutic Side-Effects. *Front Mol Neurosci* 2017;10. doi:10.3389/fnmol.2017.00130.

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990;250:1684–9.

Hamanoue M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT, Davies AM. p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 1999;14:28–40. doi:10.1006/mcne.1999.0770.

Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012;21:309–22. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144:646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.

Harel L, Costa B, Tcherpakov M, Zapatka M, Oberthuer A, Hansford LM, et al. CCM2 mediates death signaling by the TrkA receptor tyrosine kinase. *Neuron* 2009;63:585–91. doi:10.1016/j.neuron.2009.08.020.

Harrington AW, Kim JY, Yoon SO. Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci* 2002;22:156–66.

Harris EER. Precision Medicine for Breast Cancer: The Paths to Truly Individualized Diagnosis and Treatment. *International Journal of Breast Cancer* 2018. doi:10.1155/2018/4809183.

Hasenauer S, Malinger D, Koschut D, Pace G, Matzke A, von Au A, et al. Internalization of Met requires the co-receptor CD44v6 and its link to ERM proteins. *PLoS ONE* 2013;8:e62357. doi:10.1371/journal.pone.0062357.

Hassankhani A, Steinhilper ME, Soonpaa MH, Katz EB, Taylor DA, Andrade-Rozental A, et al. Overexpression of NGF within the heart of transgenic mice causes hyperinnervation, cardiac enlargement, and hyperplasia of ectopic cells. *Dev Biol* 1995;169:309–21. doi:10.1006/dbio.1995.1146.

Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 2013;26:29–48. doi:10.1002/ca.22165.

He Z, Koprivica V. The Nogo signaling pathway for regeneration block. *Annu Rev Neurosci* 2004;27:341–68. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144340.

Heerssen HM, Pazyra MF, Segal RA. Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons. *Nat Neurosci* 2004;7:596–604. doi:10.1038/nn1242.

Heider K-H, Kuthan H, Stehle G, Munzert G. CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:567–79. doi:10.1007/s00262-003-0494-4.

BIBLIOGRAPHIE

Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, et al. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 2009;459:108–12. doi:10.1038/nature07829.

Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, et al. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature Genetics* 2007;39:311–8. doi:10.1038/ng1966.

Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 1999;126:3047–55.

Helvie MA. Digital Mammography Imaging: Breast Tomosynthesis and Advanced Applications. *Radiol Clin North Am* 2010;48:917–29. doi:10.1016/j.rcl.2010.06.009.

Hempstead BL. Deciphering proneurotrophin actions. *Handb Exp Pharmacol* 2014;220:17–32. doi:10.1007/978-3-642-45106-5_2.

Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 1991;350:678–83. doi:10.1038/350678a0.

Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 2010;251:499–505. doi:10.1097/SLA.0b013e3181cc939f.

Hermey G. The Vps10p-domain receptor family. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:2677–89. doi:10.1007/s00018-009-0043-1.

Herrup K, Shooter EM. Properties of the β Nerve Growth Factor Receptor of Avian Dorsal Root Ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70:3884–8.

Herschkowitz JI, He X, Fan C, Perou CM. The functional loss of the retinoblastoma tumour suppressor is a common event in basal-like and luminal B breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2008;10:R75. doi:10.1186/bcr2142.

Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest* 2011;121:3797–803. doi:10.1172/JCI57152.

Higuchi H, Yamashita T, Yoshikawa H, Tohyama M. PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts. *EMBO J* 2003;22:1790–800. doi:10.1093/emboj/cdg177.

Hiramoto-Yamaki N, Takeuchi S, Ueda S, Harada K, Fujimoto S, Negishi M, et al. Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism. *J Cell Biol* 2010;190:461–77. doi:10.1083/jcb.201005141.

Hirata H, Hibasami H, Yoshida T, Ogawa M, Matsumoto M, Morita A, et al. Nerve growth factor signaling of p75 induces differentiation and ceramide-mediated apoptosis in Schwann cells cultured from degenerating nerves. *Glia* 2001;36:245–58.

BIBLIOGRAPHIE

Hofmann M, Rudy W, Zöller M, Tölg C, Ponta H, Herrlich P, et al. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1991;51:5292–7.

Holden PH, Asopa V, Robertson AG, Clarke AR, Tyler S, Bennett GS, et al. Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor. *Nat Biotechnol* 1997;15:668–72. doi:10.1038/nbt0797-668.

Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emllet DR, Dieterich R, Wong AJ. Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12419–24.

den Hollander P, Savage MI, Brown PH. Targeted Therapy for Breast Cancer Prevention. *Front Oncol* 2013;3. doi:10.3389/fonc.2013.00250.

Holm K, Hegardt C, Staaf J, Vallon-Christersson J, Jönsson G, Olsson H, et al. Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. *Breast Cancer Res* 2010;12:R36. doi:10.1186/bcr2590.

Holz MS, Janning A, Renné C, Gattenlöhner S, Spieker T, Bräuninger A. Induction of endoplasmic reticulum stress by sorafenib and activation of NF- κ B by lestaurtinib as a novel resistance mechanism in Hodgkin lymphoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2013;12:173–83. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0532.

Holzman LB, Marks RM, Dixit VM. A novel immediate-early response gene of endothelium is induced by cytokines and encodes a secreted protein. *Mol Cell Biol* 1990;10:5830–8.

Hondermarck H. Neurotrophins and their receptors in breast cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2012;23:357–65. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.06.004.

Honeth G, Bendahl P-O, Ringnér M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lövgren K, et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res* 2008;10:R53. doi:10.1186/bcr2108.

Honrado E, Benítez J, Palacios J. Histopathology of BRCA1- and BRCA2-associated breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2006;59:27–39. doi:10.1016/j.critrevonc.2006.01.006.

Horne HN, Sherman ME, Garcia-Closas M, Pharoah PD, Blows FM, Yang XR, et al. Breast cancer susceptibility risk associations and heterogeneity by E-cadherin tumor tissue expression. *Breast Cancer Res Treat* 2014;143:181–7. doi:10.1007/s10549-013-2771-z.

Horne SD, Pollick SA, Heng HHQ. Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer. *Int J Cancer* 2015;136:2012–21. doi:10.1002/ijc.29031.

Howe CL, Mobley WC. Signaling endosome hypothesis: A cellular mechanism for long distance communication. *J Neurobiol* 2004;58:207–16. doi:10.1002/neu.10323.

BIBLIOGRAPHIE

Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC. NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 2001;32:801–14.

Hu F, Padukkavidana T, Vægter CB, Brady OA, Zheng Y, Mackenzie IR, et al. Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron* 2010;68:654–67. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.034.

Hu M, Yao J, Cai L, Bachman KE, van den Brûle F, Velculescu V, et al. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet* 2005;37:899–905. doi:10.1038/ng1596.

Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron J, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006;7:96. doi:10.1186/1471-2164-7-96.

Huang D, Su S, Cui X, Shen X, Zeng Y, Wu W, et al. Nerve fibers in breast cancer tissues indicate aggressive tumor progression. *Medicine (Baltimore)* 2014;93:e172. doi:10.1097/MD.0000000000000172.

Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003;72:609–42. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629.

Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, et al. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol* 2008;10:202–10. doi:10.1038/ncb1681.

Huarte E, Cubillos-Ruiz JR, Nesbeth YC, Scarlett UK, Martinez DG, Buckanovich RJ, et al. DEPLETION OF DENDRITIC CELLS DELAYS OVARIAN CANCER PROGRESSION BY BOOSTING ANTI-TUMOR IMMUNITY. *Cancer Res* 2008;68:7684–91. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1167.

Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat Med* 2015;21:1253–61. doi:10.1038/nm.3981.

Huber LJ, Chao MV. A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation. *J Neurosci Res* 1995;40:557–63. doi:10.1002/jnr.490400415.

Hurley WL. Mammary gland function during involution. *J Dairy Sci* 1989;72:1637–46. doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79276-6.

Hurvitz SA, Andre F, Jiang Z, Shao Z, Mano MS, Neciosup SP, et al. Combination of everolimus with trastuzumab plus paclitaxel as first-line treatment for patients with HER2-positive advanced breast cancer (BOLERO-1): a phase 3, randomised, double-blind, multicentre trial. *Lancet Oncol* 2015;16:816–29. doi:10.1016/S1470-2045(15)00051-0.

Iacarusso MF, Galli S, Martí M, Villalta JI, Estrin DA, Jares-Erijman EA, et al. Structural model for p75(NTR)-TrkA intracellular domain interaction: a combined FRET and bioinformatics study. *J Mol Biol* 2011;414:681–98. doi:10.1016/j.jmb.2011.09.022.

BIBLIOGRAPHIE

laquinta PJ, Lees JA. Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:649–57. doi:10.1016/j.ceb.2007.10.006.

Ibáñez CF. Jekyll–Hyde neurotrophins: the story of proNGF. *Trends in Neurosciences* 2002;25:284–6. doi:10.1016/S0166-2236(02)02169-0.

Iida N, Bourguignon LY. New CD44 splice variants associated with human breast cancers. *J Cell Physiol* 1995;162:127–33. doi:10.1002/jcp.1041620115.

Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G, Struhl K. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:1397–402. doi:10.1073/pnas.1018898108.

INCa. Les cancers en France - édition 2017. 2018.

Inman JL, Robertson C, Mott JD, Bissell MJ. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* 2015;142:1028–42. doi:10.1242/dev.087643.

Ioannou MS, Fahnestock M. ProNGF, but Not NGF, Switches from Neurotrophic to Apoptotic Activity in Response to Reductions in TrkA Receptor Levels. *Int J Mol Sci* 2017;18. doi:10.3390/ijms18030599.

Iorio MV, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 2005;65:7065–70. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1783.

Iqbal J, Thike AA, Cheok PY, Tse GM-K, Tan PH. Insulin growth factor receptor-1 expression and loss of PTEN protein predict early recurrence in triple-negative breast cancer. *Histopathology* 2012;61:652–9. doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04255.x.

Irie S, Hachiya T, Rabizadeh S, Maruyama W, Mukai J, Li Y, et al. Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 1999;460:191–8.

Itoh S, Mizuno K, Aikawa M, Aikawa E. Dimerization of sortilin regulates its trafficking to extracellular vesicles. *J Biol Chem* 2018;293:4532–44. doi:10.1074/jbc.RA117.000732.

Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12293–7. doi:10.1073/pnas.192461099.

Izawa I, Amano M, Chihara K, Yamamoto T, Kaibuchi K. Possible involvement of the inactivation of the Rho-Rho-kinase pathway in oncogenic Ras-induced transformation. *Oncogene* 1998;17:2863–71. doi:10.1038/sj.onc.1202213.

Jadhao CS, Bhatwadekar AD, Jiang Y, Boulton ME, Steinle JJ, Grant MB. Nerve growth factor promotes endothelial progenitor cell-mediated angiogenic responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:2030–7. doi:10.1167/iops.11-8430.

BIBLIOGRAPHIE

Jalkanen ST, Bargatze RF, Herron LR, Butcher EC. A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur J Immunol* 1986;16:1195–202. doi:10.1002/eji.1830161003.

Jansen P, Giehl K, Nyengaard JR, Teng K, Lioubinski O, Sjoegaard SS, et al. Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci* 2007;10:1449–57. doi:10.1038/nn2000.

Jeanneteau F, Chao MV. Promoting neurotrophic effects by GPCR ligands. *Novartis Found Symp* 2006;276:181–9; discussion 189–192, 233–7, 275–81.

Jéhannin-Ligier K, Dantony E, Bossard N, Molinié F, Defossez G, Daubisse-Marliac L, et al. Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2017. Saint-Maurice: Santé publique France; 2017.

Jeong KJ, Park SY, Cho KH, Sohn JS, Lee J, Kim YK, et al. The Rho/ROCK pathway for lysophosphatidic acid-induced proteolytic enzyme expression and ovarian cancer cell invasion. *Oncogene* 2012;31:4279–89. doi:10.1038/onc.2011.595.

Jerome-Majewska LA, Jenkins GP, Ernstoff E, Zindy F, Sherr CJ, Papaioannou VE. Tbx3, the ulnar-mammary syndrome gene, and Tbx2 interact in mammary gland development through a p19Arf/p53-independent pathway. *Dev Dyn* 2005;234:922–33. doi:10.1002/dvdy.20575.

Jin X, Mu P. Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer (Auckl)* 2015;9:23–34. doi:10.4137/BCBCR.S25460.

Jobling P, Pundavela J, Oliveira SMR, Roselli S, Walker MM, Hondermarck H. Nerve–Cancer Cell Cross-talk: A Novel Promoter of Tumor Progression. *Cancer Res* 2015;75:1777–81. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3180.

Joffroy CM, Buck MB, Stope MB, Popp SL, Pfizenmaier K, Knabbe C. Antiestrogens induce transforming growth factor beta-mediated immunosuppression in breast cancer. *Cancer Res* 2010;70:1314–22. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3292.

Jones M, Tussey L, Athanasou N, Jackson DG. Heparan sulfate proteoglycan isoforms of the CD44 hyaluronan receptor induced in human inflammatory macrophages can function as paracrine regulators of fibroblast growth factor action. *J Biol Chem* 2000;275:7964–74.

Joseph-Hernandez S, Jmaeff S, Pirvulescu I, Aboukassim T, Saragovi HU. Neurotrophin receptor agonists and antagonists as therapeutic agents: An evolving paradigm. *Neurobiology of Disease* 2017;97:139–55. doi:10.1016/j.nbd.2016.08.004.

Jovanovic J, Rønneberg JA, Tost J, Kristensen V. The epigenetics of breast cancer. *Molecular Oncology* 2010;4:242–54. doi:10.1016/j.molonc.2010.04.002.

Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases* 2014;5:e29846. doi:10.4161/sgtp.29846.

Jullien J, Guili V, Reichardt LF, Rudkin BB. Molecular kinetics of nerve growth factor receptor trafficking and activation. *J Biol Chem* 2002;277:38700–8. doi:10.1074/jbc.M202348200.

BIBLIOGRAPHIE

Jung K-M, Tan S, Landman N, Petrova K, Murray S, Lewis R, et al. Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J Biol Chem* 2003;278:42161–9. doi:10.1074/jbc.M306028200.

Kalb R, Mallery DL, Larkin C, Huang JTJ, Hiom K. BRCA1 is a histone-H2A-specific ubiquitin ligase. *Cell Rep* 2014;8:999–1005. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.025.

Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:5049–59. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0632.

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:392–401. doi:10.1038/nrc1877.

Kanning KC, Hudson M, Amieux PS, Wiley JC, Bothwell M, Schecterson LC. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* 2003;23:5425–36.

Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE. Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 2001;276:18169–77. doi:10.1074/jbc.M008870200.

Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 1991;252:554–8. doi:10.1126/science.1850549.

Karsli-Ceppioglu S, Dagdemir A, Judes G, Ngollo M, Penault-Llorca F, Pajon A, et al. Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge. *Epigenomics* 2014;6:651–64. doi:10.2217/epi.14.59.

Katoh K, Kano Y, Amano M, Kaibuchi K, Fujiwara K. Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2001;280:C1669–1679. doi:10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1669.

Katoh Masuko, Igarashi M, Fukuda H, Nakagama H, Katoh Masaru. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes. *Cancer Lett* 2013;328:198–206. doi:10.1016/j.canlet.2012.09.017.

Kechagioglou P, Papi RM, Provatopoulou X, Kalogera E, Papadimitriou E, Grigoropoulos P, et al. Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression. *Anticancer Res* 2014;34:1387–400.

Kenchappa RS, Zampieri N, Chao MV, Barker PA, Teng HK, Hempstead BL, et al. Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* 2006;50:219–32. doi:10.1016/j.neuron.2006.03.011.

BIBLIOGRAPHIE

Khamisipour G, Jadidi-Niaragh F, Jahromi AS, Zandi K, Hojjat-Farsangi M. Mechanisms of tumor cell resistance to the current targeted-therapy agents. *Tumour Biol* 2016;37:10021–39. doi:10.1007/s13277-016-5059-1.

Khosravi-Far R, Der CJ. The Ras signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13:67–89.

Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV. A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* 2001;21:5854–63.

Kim EMH, Mueller K, Gartner E, Boerner J. Dasatinib is synergistic with cetuximab and cisplatin in triple-negative breast cancer cells. *J Surg Res* 2013;185:231–9. doi:10.1016/j.jss.2013.06.041.

Kim MJ, Kim E, Ryu SH, Suh PG. The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation. *Exp Mol Med* 2000;32:101–9. doi:10.1038/emm.2000.18.

Kim T, Hempstead BL. NRH2 is a trafficking switch to regulate sortilin localization and permit proneurotrophin-induced cell death. *EMBO J* 2009;28:1612–23. doi:10.1038/emboj.2009.118.

Kimura MT, Irie S, Shoji-Hoshino S, Mukai J, Nadano D, Oshimura M, et al. 14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 2001;276:17291–300. doi:10.1074/jbc.M005453200.

Kivisaari AK, Kallajoki M, Ala-aho R, McGrath JA, Bauer JW, Königová R, et al. Matrix metalloproteinase-7 activates heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2010;163:726–35. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09924.x.

Kjolby M, Nielsen MS, Petersen CM. Sortilin, encoded by the cardiovascular risk gene SORT1, and its suggested functions in cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2015;17:496. doi:10.1007/s11883-015-0496-7.

Klarenbeek S, van Miltenburg MH, Jonkers J. Genetically engineered mouse models of PI3K signaling in breast cancer. *Mol Oncol* 2013;7:146–64. doi:10.1016/j.molonc.2013.02.003.

Kliemann M, Golbik R, Rudolph R, Schwarz E, Lilie H. The pro-peptide of proNGF: structure formation and intramolecular association with NGF. *Protein Sci* 2007;16:411–9. doi:10.1110/ps.062376207.

Kliemann M, Rattenholl A, Golbik R, Balbach J, Lilie H, Rudolph R, et al. The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS Lett* 2004;566:207–12. doi:10.1016/j.febslet.2004.04.034.

Knudsen ES, Witkiewicz AK. The Strange Case of CDK4/6 Inhibitors: Mechanisms, Resistance, and Combination Strategies. *Trends Cancer* 2017;3:39–55. doi:10.1016/j.trecan.2016.11.006.

Koppe M, Schaijk F van, Roos J, Leeuwen P van, Heider K-H, Kuthan H, et al. Safety, pharmacokinetics, immunogenicity, and biodistribution of (186)Re-labeled humanized

BIBLIOGRAPHIE

monoclonal antibody BIWA 4 (Bivatuzumab) in patients with early-stage breast cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2004;19:720–9. doi:10.1089/cbr.2004.19.720.

Korhonen JM, Saïd FA, Wong AJ, Kaplan DR. Gab1 mediates neurite outgrowth, DNA synthesis, and survival in PC12 cells. *J Biol Chem* 1999;274:37307–14.

Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 1974;184:868–71.

Korsching S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 1993;13:2739–48. doi:10.1523/JNEUROSCI.13-07-02739.1993.

Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 2007;128:693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005.

Kozasa T, Hajicek N, Chow CR, Suzuki N. Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G12 and G13. *J Biochem* 2011;150:357–69. doi:10.1093/jb/mvr105.

Kraemer BR, Yoon SO, Carter BD. The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor. *Handb Exp Pharmacol* 2014;220:121–64. doi:10.1007/978-3-642-45106-5_6.

Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips K-A, Mooij TM, Roos-Blom M-J, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* 2017;317:2402–16. doi:10.1001/jama.2017.7112.

Kuruvilla R, Ye H, Ginty DD. Spatially and functionally distinct roles of the PI3-K effector pathway during NGF signaling in sympathetic neurons. *Neuron* 2000;27:499–512.

Kuruvilla R, Zweifel LS, Glebova NO, Lonze BE, Valdez G, Ye H, et al. A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell* 2004;118:243–55. doi:10.1016/j.cell.2004.06.021.

Lachance C, Belliveau DJ, Barker PA. Blocking nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor on sympathetic neurons transiently reduces trkA activation but does not affect neuronal survival. *Neuroscience* 1997;81:861–71.

Lachenmeier DW, Przybylski MC, Rehm J. Comparative risk assessment of carcinogens in alcoholic beverages using the margin of exposure approach. *Int J Cancer* 2012;131:E995-1003. doi:10.1002/ijc.27553.

Lacroix M, Toillon R-A, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:293–325. doi:10.1677/erc.1.01172.

Lad SP, Peterson DA, Bradshaw RA, Neet KE. Individual and combined effects of TrkA and p75NTR nerve growth factor receptors. A role for the high affinity receptor site. *J Biol Chem* 2003;278:24808–17. doi:10.1074/jbc.M212270200.

BIBLIOGRAPHIE

Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, Foveau B, Vanhecke E, Romon R, et al. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* 2009;28:1960–70. doi:10.1038/onc.2009.61.

Lagadec C, Romon R, Tastet C, Meignan S, Com E, Page A, et al. Ku86 is important for TrkA overexpression-induced breast cancer cell invasion. *Proteomics Clin Appl* 2010;4:580–90. doi:10.1002/prca.200900148.

Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, editors. WHO Classification of Tumours of the Breast 2012:242.

Laloo F, Evans DG. Familial breast cancer. *Clin Genet* 2012;82:105–14. doi:10.1111/j.1399-0004.2012.01859.x.

Lam SW, Jimenez CR, Boven E. Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. *Cancer Treat Rev* 2014;40:129–38. doi:10.1016/j.ctrv.2013.06.006.

Lambiase A, Micera A, Sgrulletta R, Bonini Sergio, Bonini Stefano. Nerve growth factor and the immune system: old and new concepts in the cross-talk between immune and resident cells during pathophysiological conditions. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2004;4:425.

Lane NE, Schnitzer TJ, Birbara CA, Mokhtarani M, Shelton DL, Smith MD, et al. Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 2010;363:1521–31. doi:10.1056/NEJMoa0901510.

Lange AM, Lo H-W. Inhibiting TRK Proteins in Clinical Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 2018;10. doi:10.3390/cancers10040105.

Lann D, LeRoith D. The role of endocrine insulin-like growth factor-I and insulin in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008;13:371–9. doi:10.1007/s10911-008-9100-x.

Large TH, Weskamp G, Helder JC, Radeke MJ, Misko TP, Shooter EM, et al. Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system. *Neuron* 1989;2:1123–34.

Le AP, Friedman WJ. Matrix metalloproteinase-7 regulates cleavage of pro-nerve growth factor and is neuroprotective following kainic acid-induced seizures. *J Neurosci* 2012;32:703–12. doi:10.1523/JNEUROSCI.4128-11.2012.

Lebok P, Kopperschmidt V, Kluth M, Hube-Magg C, Özden C, B. T, et al. Partial PTEN deletion is linked to poor prognosis in breast cancer. *BMC Cancer* 2015;15. doi:10.1186/s12885-015-1770-3.

Lee FS, Chao MV. Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3555–60. doi:10.1073/pnas.061020198.

Lee J-K, Choi Y-L, Kwon M, Park PJ. Mechanisms and Consequences of Cancer Genome Instability: Lessons from Genome Sequencing Studies. *Annu Rev Pathol* 2016;11:283–312. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044446.

BIBLIOGRAPHIE

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001;294:1945–8. doi:10.1126/science.1065057.

Lefrancois S, Zeng J, Hassan AJ, Canuel M, Morales CR. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J* 2003;22:6430–7. doi:10.1093/emboj/cdg629.

Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLOS ONE* 2016;11:e0157368. doi:10.1371/journal.pone.0157368.

Lei Y, Tang L, Xie Y, Xianyu Y, Zhang L, Wang P, et al. Gold nanoclusters-assisted delivery of NGF siRNA for effective treatment of pancreatic cancer. *Nature Communications* 2017;8:15130. doi:10.1038/ncomms15130.

Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117–34. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.

Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* 2003;69:341–74.

Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987;237:1154–62.

Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology* 1951;116:321–61. doi:10.1002/jez.1401160206.

Levine DA, Bogomolny F, Yee CJ, Lash A, Barakat RR, Borgen PI, et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res* 2005;11:2875–8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2142.

Li CI, Beaber EF, Tang M-TC, Porter PL, Daling JR, Malone KE. Reproductive factors and risk of estrogen receptor positive, triple-negative, and HER2-neu overexpressing breast cancer among women 20-44 years of age. *Breast Cancer Res Treat* 2013;137:579–87. doi:10.1007/s10549-012-2365-1.

Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 2005;93:1046–52. doi:10.1038/sj.bjc.6602787.

Li L, Schmitt M, Matzke-Ogi A, Wadhvani P, Orian-Rousseau V, Levkin PA. CD44v6-Peptide Functionalized Nanoparticles Selectively Bind to Metastatic Cancer Cells. *Adv Sci (Weinh)* 2017;4:1600202. doi:10.1002/advs.201600202.

Li S, Shen Y, Wang M, Yang Jiao, Lv M, Li P, et al. Loss of PTEN expression in breast cancer: association with clinicopathological characteristics and prognosis. *Oncotarget* 2017;8:32043–54. doi:10.18632/oncotarget.16761.

Li Yongsheng, Zhang Y, Li S, Lu J, Chen J, Wang Y, et al. Genome-wide DNA methylome analysis reveals epigenetically dysregulated non-coding RNAs in human breast cancer. *Sci Rep* 2015;5:8790. doi:10.1038/srep08790.

BIBLIOGRAPHIE

Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibáñez CF. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* 1997;16:4999–5005. doi:10.1093/emboj/16.16.4999.

Lim K-C, Tyler CM, Lim ST, Giuliano R, Federoff HJ. Proteolytic processing of proNGF is necessary for mature NGF regulated secretion from neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;361:599–604. doi:10.1016/j.bbrc.2007.07.039.

Lim S, Janzer A, Becker A, Zimmer A, Schüle R, Buettner R, et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis* 2010;31:512–20. doi:10.1093/carcin/bgp324.

Lin BZ, Pilch PF, Kandror KV. Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem* 1997;272:24145–7.

Lin L, Chen Y-S, Yao Y-D, Chen J-Q, Chen J-N, Huang S-Y, et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer. *Oncotarget* 2015;6:34758–73. doi:10.18632/oncotarget.5325.

Lindberg RA, Hunter T. cDNA cloning and characterization of eck, an epithelial cell receptor protein-tyrosine kinase in the eph/elk family of protein kinases. *Mol Cell Biol* 1990;10:6316–24.

Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;64:327–36.

Liu D, Sy MS. Phorbol myristate acetate stimulates the dimerization of CD44 involving a cysteine in the transmembrane domain. *J Immunol* 1997;159:2702–11.

Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:627–44. doi:10.1038/nrd2926.

Liu S, Goldstein RH, Scepansky EM, Rosenblatt M. Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone. *Cancer Res* 2009;69:8742–51. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1541.

Lo P-K, Sukumar S. Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics* 2008;9:1879–902. doi:10.2217/14622416.9.12.1879.

Loeffler M, Krüger JA, Niethammer AG, Reisfeld RA. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest* 2006;116:1955–62. doi:10.1172/JCI26532.

Loginov VI, Pronina IV, Burdennyi AM, Pereyaslova EA, Braga EA, Kazubskaya TP, et al. Role of Methylation in the Regulation of Apoptosis Genes APAF1, DAPK1, and BCL2 in Breast Cancer. *Bull Exp Biol Med* 2017;162:797–800. doi:10.1007/s10517-017-3716-z.

Lokeshwar VB, Bourguignon LY. Post-translational protein modification and expression of ankyrin-binding site(s) in GP85 (Pgp-1/CD44) and its biosynthetic precursors during T-lymphoma membrane biosynthesis. *J Biol Chem* 1991;266:17983–9.

BIBLIOGRAPHIE

Lokeshwar VB, Fregien N, Bourguignon LY. Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J Cell Biol* 1994;126:1099–109.

Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD. Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron* 2002;34:371–85.

López-Knowles E, Segal CV, Gao Q, Garcia-Murillas I, Turner NC, Smith I, et al. Relationship of PIK3CA mutation and pathway activity with antiproliferative response to aromatase inhibition. *Breast Cancer Res* 2014;16:R68. doi:10.1186/bcr3683.

Louderbough JMV, Schroeder JA. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Mol Cancer Res* 2011;9:1573–86. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0156.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834–8. doi:10.1038/nature03702.

Lu P, Ewald AJ, Martin GR, Werb Z. Genetic mosaic analysis reveals FGF receptor 2 function in terminal end buds during mammary gland branching morphogenesis. *Dev Biol* 2008;321:77–87. doi:10.1016/j.ydbio.2008.06.005.

Lu Q, Liu J, Zhu X, Xu W. Expression of nerve growth factor and hypoxia inducible factor-1 α and its correlation with angiogenesis in non-small cell lung cancer. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2014;34:359–62. doi:10.1007/s11596-014-1283-3.

Luberg K, Park R, Aleksejeva E, Timmusk T. Novel transcripts reveal a complex structure of the human TRKA gene and imply the presence of multiple protein isoforms. *BMC Neurosci* 2015;16. doi:10.1186/s12868-015-0215-x.

Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2012;13:436–47. doi:10.1038/nrm3382.

Lund LR, Rømer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, et al. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 1996;122:181–93.

Lustberg MB, Ramaswamy B. Epigenetic Therapy in Breast Cancer. *Curr Breast Cancer Rep* 2011;3:34–43. doi:10.1007/s12609-010-0034-0.

Lüthy IA, Bruzzone A, Piñero CP, Castillo LF, Chiesa IJ, Vázquez SM, et al. Adrenoceptors: non conventional target for breast cancer? *Curr Med Chem* 2009;16:1850–62.

Lynch CC, Vargo-Gogola T, Martin MD, Fingleton B, Crawford HC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase 7 mediates mammary epithelial cell tumorigenesis through the ErbB4 receptor. *Cancer Res* 2007;67:6760–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0026.

Ma X-J, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC. Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2009;11:R7. doi:10.1186/bcr2222.

BIBLIOGRAPHIE

Ma X-J, Salunga R, Dahiya S, Wang W, Carney E, Durbecq V, et al. A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:2601–8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5026.

MacDonald JI, Meakin SO. Deletions in the extracellular domain of rat trkA lead to an altered differentiative phenotype in neurotrophin responsive cells. *Mol Cell Neurosci* 1996;7:371–90. doi:10.1006/mcne.1996.0027.

Macis D, Guerrieri-Gonzaga A, Gandini S. Circulating adiponectin and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2014;43:1226–36. doi:10.1093/ije/dyu088.

Macrae M, Neve RM, Rodriguez-Viciano P, Haqq C, Yeh J, Chen C, et al. A conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2. *Cancer Cell* 2005;8:111–8. doi:10.1016/j.ccr.2005.07.005.

Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hempstead BL. High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem* 1994;269:6884–91.

Mailleux AA, Overholtzer M, Schmelzle T, Bouillet P, Strasser A, Brugge JS. BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Dev Cell* 2007;12:221–34. doi:10.1016/j.devcel.2006.12.003.

Majdan M, Miller FD. Neuronal life and death decisions functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors. *Int J Dev Neurosci* 1999;17:153–61.

Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr H-A, Delaloye J-F, et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 2012;481:85–9. doi:10.1038/nature10694.

Mali RS, Ramdas B, Ma P, Shi J, Munugalavadla V, Sims E, et al. Rho kinase regulates the survival and transformation of cells bearing oncogenic forms of KIT, FLT3, and BCR-ABL. *Cancer Cell* 2011;20:357–69. doi:10.1016/j.ccr.2011.07.016.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233–8.

Mallepell S, Krust A, Chambon P, Brisken C. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2196–201. doi:10.1073/pnas.0510974103.

Mari M, Bujny MV, Zeuschner D, Geerts WJC, Griffith J, Petersen CM, et al. SNX1 defines an early endosomal recycling exit for sortilin and mannose 6-phosphate receptors. *Traffic* 2008;9:380–93. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00686.x.

BIBLIOGRAPHIE

Maric G, Annis MG, Dong Z, Rose A a. N, Ng S, Perkins D, et al. GPNMB cooperates with neuropilin-1 to promote mammary tumor growth and engages integrin $\alpha_5\beta_1$ for efficient breast cancer metastasis. *Oncogene* 2015;34:5494–504. doi:10.1038/onc.2015.8.

Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem* 2013;59:168–79. doi:10.1373/clinchem.2012.184655.

Markou A, Yousef GM, Stathopoulos E, Georgoulis V, Lianidou E. Prognostic Significance of Metastasis-Related MicroRNAs in Early Breast Cancer Patients with a Long Follow-up. *Clinical Chemistry* 2014;60:197–205. doi:10.1373/clinchem.2013.210542.

Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995;80:179–85.

Marshall JL, Kindler H, Deeken J, Bhargava P, Vogelzang NJ, Rizvi N, et al. Phase I trial of orally administered CEP-701, a novel neurotrophin receptor-linked tyrosine kinase inhibitor. *Invest New Drugs* 2005;23:31–7. doi:10.1023/B:DRUG.0000047103.64335.b0.

Martegani MP, Del Prete F, Gasbarri A, Natali PG, Bartolazzi A. Structural variability of CD44v molecules and reliability of immunodetection of CD44 isoforms using mAbs specific for CD44 variant exon products. *Am J Pathol* 1999;154:291–300. doi:10.1016/S0002-9440(10)65275-3.

Martin S, Vincent J-P, Mazella J. Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J Neurosci* 2003;23:1198–205.

Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Daumer KM, Milliman JN, Chiavarina B, et al. Tumor cells induce the cancer associated fibroblast phenotype via caveolin-1 degradation: Implications for breast cancer and DCIS therapy with autophagy inhibitors. *Cell Cycle* 2010;9:2423–33. doi:10.4161/cc.9.12.12048.

Martins D, Schmitt F. Microenvironment in breast tumorigenesis: Friend or foe? *Histol Histopathol* 2018;18021. doi:10.14670/HH-18-021.

Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 1986;319:743–8. doi:10.1038/319743a0.

Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T, Barbacid M. Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol* 1989;9:24–33.

Martoglio B. Intramembrane proteolysis and post-targeting functions of signal peptides. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1243–7. doi:10.1042/.

Massa SM, Xie Y, Yang T, Harrington AW, Kim ML, Yoon SO, et al. Small, nonpeptide p75NTR ligands induce survival signaling and inhibit proNGF-induced death. *J Neurosci* 2006;26:5288–300. doi:10.1523/JNEUROSCI.3547-05.2006.

Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential Response to Neoadjuvant Chemotherapy Among 7 Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes. *Clin Cancer Res* 2013;19:5533–40. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0799.

BIBLIOGRAPHIE

Matoulková E, Vojtěšek B. [Detection of protein-protein interactions by FRET and BRET methods]. *Klin Onkol* 2014;27 Suppl 1:S82-86.

Matzke A, Herrlich P, Ponta H, Orian-Rousseau V. A five-amino-acid peptide blocks Met- and Ron-dependent cell migration. *Cancer Res* 2005;65:6105–10. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0207.

Maughan KL, Lutterbie MA, Ham P. Treatment of Breast Cancer. *AFP* 2010;81:1339–46.

Mayer IA, Abramson VG, Lehmann BD, Pietenpol JA. New strategies for triple-negative breast cancer--deciphering the heterogeneity. *Clin Cancer Res* 2014;20:782–90. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0583.

Mazella J, Zsürger N, Navarro V, Chabry J, Kaghad M, Caput D, et al. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 1998;273:26273–6.

Mazzoni IE, Saïd FA, Aloyz R, Miller FD, Kaplan D. Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J Neurosci* 1999;19:9716–27.

McCormick PJ, Dumaresq-Doiron K, Pluviose A-S, Pichette V, Tosato G, Lefrancois S. Palmitoylation controls recycling in lysosomal sorting and trafficking. *Traffic* 2008;9:1984–97. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00814.x.

McCuaig R, Wu F, Dunn J, Rao S, Dahlstrom JE. The biological and clinical significance of stromal-epithelial interactions in breast cancer. *Pathology* 2017;49:133–40. doi:10.1016/j.pathol.2016.10.009.

McDonald NQ, Lapatto R, Rust JM, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL. New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* 1991;354:411–4. doi:10.1038/354411a0.

Meeker RB, Williams KS. The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res* 2015;10:721–5. doi:10.4103/1673-5374.156967.

Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133:647–58. doi:10.1053/j.gastro.2007.05.022.

Mercier I, Casimiro MC, Wang C, Rosenberg AL, Quong J, Minkeu A, et al. Human breast cancer-associated fibroblasts (CAFs) show caveolin-1 downregulation and RB tumor suppressor functional inactivation: Implications for the response to hormonal therapy. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1212–25.

Messier TL, Gordon JAR, Boyd JR, Tye CE, Browne G, Stein JL, et al. Histone H3 lysine 4 acetylation and methylation dynamics define breast cancer subtypes. *Oncotarget* 2016;7:5094–109. doi:10.18632/oncotarget.6922.

Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 2004;7:221–8. doi:10.1038/nn1188.

BIBLIOGRAPHIE

Miao H, Burnett E, Kinch M, Simon E, Wang B. Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat Cell Biol* 2000;2:62–9. doi:10.1038/35000008.

Miao H, Li D-Q, Mukherjee A, Guo H, Petty A, Cutter J, et al. EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer Cell* 2009;16:9–20. doi:10.1016/j.ccr.2009.04.009.

Micera A, Lambiase A, Stampachiacchiere B, Bonini Stefano, Bonini Sergio, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA(NGFR) and p75(NTR), two receptors one fate. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:245–56. doi:10.1016/j.cytogfr.2007.04.004.

Micera A, Puxeddu I, Aloe L, Levi-Schaffer F. New insights on the involvement of Nerve Growth Factor in allergic inflammation and fibrosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2003;14:369–74. doi:10.1016/S1359-6101(03)00047-9.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994;266:66–71.

Miladinovic T, Ungard RG, Linher-Melville K, Popovic S, Singh G. Functional effects of TrkA inhibition on system xC⁻-mediated glutamate release and cancer-induced bone pain. *Mol Pain* 2018;14:1744806918776467. doi:10.1177/1744806918776467.

Miled N, Yan Y, Hon W-C, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, et al. Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* 2007;317:239–42. doi:10.1126/science.1135394.

Millikan RC, Newman B, Tse C-K, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:123–39. doi:10.1007/s10549-007-9632-6.

Milojkovic Kerklaan B, Kerklaan BM, Diéras V, Le Tourneau C, Mergui-Roelvink M, Huitema ADR, et al. Phase I study of lonafarnib (SCH66336) in combination with trastuzumab plus paclitaxel in Her2/neu overexpressing breast cancer: EORTC study 16023. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;71:53–62. doi:10.1007/s00280-012-1972-1.

Mittendorf EA, Clifton GT, Holmes JP, Schneble E, van Echo D, Ponniah S, et al. Final report of the phase I/II clinical trial of the E75 (nelipepimut-S) vaccine with booster inoculations to prevent disease recurrence in high-risk breast cancer patients. *Ann Oncol* 2014;25:1735–42. doi:10.1093/annonc/mdu211.

Mizera-Nyczak E, Dyszkiewicz W, Heider KH, Zeromski J. Isoform expression of CD44 adhesion molecules, Bcl-2, p53 and Ki-67 proteins in lung cancer. *Tumour Biol* 2001;22:45–53. doi:10.1159/000030154.

Molinié F, Vanier A, Woronoff AS, Guizard AV, Delafosse P, Velten M, et al. Trends in breast cancer incidence and mortality in France 1990-2008. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147:167–75. doi:10.1007/s10549-014-3073-9.

BIBLIOGRAPHIE

Monlauzeur L, Breuza L, Le Bivic A. Putative O-glycosylation sites and a membrane anchor are necessary for apical delivery of the human neurotrophin receptor in Caco-2 cells. *J Biol Chem* 1998;273:30263–70.

Monshipouri M, Jiang H, Lazarovici P. NGF stimulation of erk phosphorylation is impaired by a point mutation in the transmembrane domain of trkA receptor. *J Mol Neurosci* 2000;14:69–76. doi:10.1385/JMN:14:1-2:069.

Montano X. Repression of SHP-1 expression by p53 leads to trkA tyrosine phosphorylation and suppression of breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 2009;28:3787–800. doi:10.1038/onc.2009.143.

Moore HCF, Unger JM, Phillips K-A, Boyle F, Hitre E, Porter D, et al. Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2015;372:923–32. doi:10.1056/NEJMoa1413204.

Morath I, Jung C, Lévêque R, Linfeng C, Toillon R-A, Warth A, et al. Differential recruitment of CD44 isoforms by ErbB ligands reveals an involvement of CD44 in breast cancer. *Oncogene* 2018. doi:10.1038/s41388-017-0030-1.

Morel A-P, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* 2008;3:e2888. doi:10.1371/journal.pone.0002888.

Morganella S, Alexandrov LB, Glodzik D, Zou X, Davies H, Staaf J, et al. The topography of mutational processes in breast cancer genomes. *Nat Commun* 2016;7:11383. doi:10.1038/ncomms11383.

Moriki T, Maruyama H, Maruyama IN. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol* 2001;311:1011–26. doi:10.1006/jmbi.2001.4923.

Morinville A, Martin S, Lavallée M, Vincent J-P, Beaudet A, Mazella J. Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2153–68. doi:10.1016/j.biocel.2004.04.013.

Moriyama K, Iida K, Yahara I. Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1996;1:73–86.

Morris EJ, Dyson NJ. Retinoblastoma protein partners. *Adv Cancer Res* 2001;82:1–54.

Moughal NA, Waters C, Sambhi B, Pyne S, Pyne NJ. Nerve growth factor signaling involves interaction between the Trk A receptor and lysophosphatidate receptor 1 systems: nuclear translocation of the lysophosphatidate receptor 1 and Trk A receptors in pheochromocytoma 12 cells. *Cell Signal* 2004;16:127–36.

Mujtaba S, Zeng L, Zhou M-M. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* 2007;26:5521–7. doi:10.1038/sj.onc.1210618.

BIBLIOGRAPHIE

Mulder JW, Kruyt PM, Sewnath M, Oosting J, Seldenrijk CA, Weidema WF, et al. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 1994;344:1470–2.

Müller BM, Jana L, Kasajima A, Lehmann A, Prinzler J, Budczies J, et al. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer--overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer* 2013;13:215. doi:10.1186/1471-2407-13-215.

Mulligan CJ. Insights from epigenetic studies on human health and evolution. *Curr Opin Genet Dev* 2018;53:36–42. doi:10.1016/j.gde.2018.06.008.

Munck Petersen C, Nielsen MS, Jacobsen C, Tauris J, Jacobsen L, Gliemann J, et al. Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J* 1999;18:595–604. doi:10.1093/emboj/18.3.595.

Murphy DA, Courtneidge SA. The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:413–26. doi:10.1038/nrm3141.

Murray SS, Perez P, Lee R, Hempstead BL, Chao MV. A novel p75 neurotrophin receptor-related protein, NRH2, regulates nerve growth factor binding to the TrkA receptor. *J Neurosci* 2004;24:2742–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.3960-03.2004.

Nabholtz J-M, Gligorov J. The role of taxanes in the treatment of breast cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2005;6:1073–94. doi:10.1517/14656566.6.7.1073.

Naccarato AG, Viacava P, Vignati S, Fanelli G, Bonadio AG, Montruccoli G, et al. Biomorphological events in the development of the human female mammary gland from fetal age to puberty. *Virchows Arch* 2000;436:431–8.

Naderi A, Hughes-Davies L. A functionally significant cross-talk between androgen receptor and ErbB2 pathways in estrogen receptor negative breast cancer. *Neoplasia* 2008;10:542–8.

Naderi A, Liu J, Bennett IC. BEX2 regulates mitochondrial apoptosis and G1 cell cycle in breast cancer. *Int J Cancer* 2010;126:1596–610. doi:10.1002/ijc.24866.

Naderi A, Teschendorff AE, Beigel J, Cariati M, Ellis IO, Brenton JD, et al. BEX2 is overexpressed in a subset of primary breast cancers and mediates nerve growth factor/nuclear factor-kappaB inhibition of apoptosis in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2007;67:6725–36. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4394.

Nakagawa H, Fujita M. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. *Cancer Sci* 2018;109:513–22. doi:10.1111/cas.13505.

Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002;39:527–79. doi:10.1080/10408360290795574.

Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997;71:241–319.

BIBLIOGRAPHIE

National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2014.

Neame SJ, Uff CR, Sheikh H, Wheatley SC, Isacke CM. CD44 exhibits a cell type dependent interaction with triton X-100 insoluble, lipid rich, plasma membrane domains. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 9):3127–35.

Nebi G, Meuer SC, Samstag Y. Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *J Biol Chem* 1996;271:26276–80.

Negrini S, D'Alessandro R, Meldolesi J. NGF signaling in PC12 cells: the cooperation of p75(NTR) with TrkA is needed for the activation of both mTORC2 and the PI3K signalling cascade. *Biol Open* 2013;2:855–66. doi:10.1242/bio.20135116.

Nelson ER, Chang C, McDonnell DP. Cholesterol and breast cancer pathophysiology. *Trends Endocrinol Metab* 2014;25:649–55. doi:10.1016/j.tem.2014.10.001.

Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:S116-124.

Neuhouser ML, Aragaki AK, Prentice RL, Manson JE, Chlebowski R, Carty CL, et al. Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk: A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol* 2015;1:611–21. doi:10.1001/jamaoncol.2015.1546.

Nico B, Mangieri D, Benaglio V, Crivellato E, Ribatti D. Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvascular Research* 2008;75:135–41. doi:10.1016/j.mvr.2007.07.004.

Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D, et al. The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J* 2001;20:2180–90. doi:10.1093/emboj/20.9.2180.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5367–74. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0220.

Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* 2016;534:47–54. doi:10.1038/nature17676.

Nimnual AS, Yatsula BA, Bar-Sagi D. Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* 1998;279:560–3.

Noone A, Howlader N, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al., editors. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015 2018.

Novak P, Jensen T, Oshiro MM, Watts GS, Kim CJ, Futscher BW. Agglomerative epigenetic aberrations are a common event in human breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:8616–25. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1419.

BIBLIOGRAPHIE

- Nowarski R, Gagliani N, Huber S, Flavell RA. Innate immune cells in inflammation and cancer. *Cancer Immunol Res* 2013;1:77–84. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0081.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 2004;427:843–8. doi:10.1038/nature02319.
- Nykjaer A, Willnow TE. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in Neurosciences* 2012;35:261–70. doi:10.1016/j.tins.2012.01.003.
- Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM. p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 2005;15:49–57. doi:10.1016/j.conb.2005.01.004.
- Obermeier A, Halfter H, Wiesmüller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A. Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *EMBO J* 1993a;12:933–41.
- Obermeier A, Lammers R, Wiesmüller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A. Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J Biol Chem* 1993b;268:22963–6.
- O'Donovan PJ, Livingston DM. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis* 2010;31:961–7. doi:10.1093/carcin/bgq069.
- Ohashi K, Nagata K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S, Mizuno K. Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem* 2000;275:3577–82.
- Ohmichi M, Decker SJ, Saltiel AR. Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by nerve growth factor involves indirect coupling of the trk proto-oncogene with src homology 2 domains. *Neuron* 1992;9:769–77.
- Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:1157–67. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1029.
- Olsson E, Honeth G, Bendahl P-O, Saal LH, Gruvberger-Saal S, Ringnér M, et al. CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. *BMC Cancer* 2011;11:418. doi:10.1186/1471-2407-11-418.
- Orecchia R, Fossati P, Zurrida S, Krengli M. New frontiers in proton therapy: applications in breast cancer. *Curr Opin Oncol* 2015;27:427–32. doi:10.1097/CCO.000000000000228.
- Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *European Journal of Cancer* 2010;46:1271–7. doi:10.1016/j.ejca.2010.02.024.
- Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* 2002;16:3074–86. doi:10.1101/gad.242602.

BIBLIOGRAPHIE

Orian-Rousseau V, Morrison H, Matzke A, Kastilan T, Pace G, Herrlich P, et al. Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin. *Mol Biol Cell* 2007;18:76–83. doi:10.1091/mbc.e06-08-0674.

Orian-Rousseau V, Ponta H. Adhesion proteins meet receptors: a common theme? *Adv Cancer Res* 2008;101:63–92. doi:10.1016/S0065-230X(08)00404-1.

Orimo A, Weinberg RA. Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumor. *Cancer Biology & Therapy* 2007;6:618–9. doi:10.4161/cbt.6.4.4255.

Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, et al. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* 1997;11:167–78.

O'Shaughnessy JA. Oral Alkylating Agents for Breast Cancer Therapy. *Drugs* 1999;58:1–9. doi:10.2165/00003495-199958003-00001.

Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 2004;5:63–9.

de Pablo Y, Pérez-García MJ, Georgieva MV, Sanchis D, Lindqvist N, Soler RM, et al. Tyr-701 is a new regulatory site for neurotrophin receptor TrkA trafficking and function. *J Neurochem* 2008;104:124–39. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05027.x.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817–26. doi:10.1056/NEJMoa041588.

Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3726–34. doi:10.1200/JCO.2005.04.7985.

Paine IS, Lewis MT. The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2017;22:93–108. doi:10.1007/s10911-017-9372-0.

Palmieri C, Stein RC, Liu X, Hudson E, Nicholas H, Sasano H, et al. IRIS study: a phase II study of the steroid sulfatase inhibitor Irosustat when added to an aromatase inhibitor in ER-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2017;165:343–53. doi:10.1007/s10549-017-4328-z.

Panchal H, Wansbury O, Parry S, Ashworth A, Howard B. Neuregulin3 alters cell fate in the epidermis and mammary gland. *BMC Dev Biol* 2007;7:105. doi:10.1186/1471-213X-7-105.

Pang B, Cheng S, Sun S-P, An C, Liu Z-Y, Feng X, et al. Prognostic role of PIK3CA mutations and their association with hormone receptor expression in breast cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* 2014;4:6255. doi:10.1038/srep06255.

BIBLIOGRAPHIE

Pang WW, Hartmann PE. Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2007;12:211–21. doi:10.1007/s10911-007-9054-4.

Paoletti F, Konarev PV, Covaceuszach S, Schwarz E, Cattaneo A, Lamba D, et al. Structural and functional properties of mouse proNGF. *Biochem Soc Trans* 2006;34:605–6. doi:10.1042/BST0340605.

Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jerónimo C, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res* 2005;11:5869–77. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0059.

Park HS, Jang MH, Kim EJ, Kim HJ, Lee HJ, Kim YJ, et al. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod Pathol* 2014;27:1212–22. doi:10.1038/modpathol.2013.251.

Parrella P, Poeta ML, Gallo AP, Prencipe M, Scintu M, Apicella A, et al. Nonrandom Distribution of Aberrant Promoter Methylation of Cancer-Related Genes in Sporadic Breast Tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:5349–54. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0555.

Pasculli B, Barbano R, Parrella P. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Semin Cancer Biol* 2018. doi:10.1016/j.semcan.2018.01.007.

Pasini L, Re A, Tebaldi T, Ricci G, Boi S, Adami V, et al. TrkA is amplified in malignant melanoma patients and induces an anti-proliferative response in cell lines. *BMC Cancer* 2015;15:777. doi:10.1186/s12885-015-1791-y.

Patil VS, Zhou R, Rana TM. Gene regulation by non-coding RNAs. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2014;49:16–32. doi:10.3109/10409238.2013.844092.

Paulson AK, Linklater ES, Berghuis BD, App CA, Oostendorp LD, Paulson JE, et al. MET and ERBB2 are coexpressed in ERBB2+ breast cancer and contribute to innate resistance. *Mol Cancer Res* 2013;11:1112–21. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0042.

Pawlak G, Helfman DM. Post-transcriptional down-regulation of ROCK1/Rho-kinase through an MEK-dependent pathway leads to cytoskeleton disruption in Ras-transformed fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2002;13:336–47. doi:10.1091/mbc.01-02-0302.

Pawson T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 2004;116:191–203.

Pazyra-Murphy MF, Hans A, Courchesne SL, Karch C, Cosker KE, Heerssen HM, et al. A retrograde neuronal survival response: target-derived neurotrophins regulate MEF2D and bcl-w. *J Neurosci* 2009;29:6700–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.0233-09.2009.

BIBLIOGRAPHIE

Pedraza CE, Podlesniy P, Vidal N, Arévalo JC, Lee R, Hempstead B, et al. Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *Am J Pathol* 2005;166:533–43. doi:10.1016/S0002-9440(10)62275-4.

Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnestock M. Increased proNGF levels in subjects with mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:641–9.

Perez EA. Treatment strategies for advanced hormone receptor-positive and human epidermal growth factor 2-negative breast cancer: the role of treatment order. *Drug Resist Updat* 2016;24:13–22. doi:10.1016/j.drug.2015.11.001.

Pérez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Waltersson MA, Nordenskjöld B, Rutqvist LE, et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:3577–84. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1609.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747–52. doi:10.1038/35021093.

Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH, et al. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem* 1997;272:3599–605.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007;28:622–9. doi:10.1002/humu.20495.

Petrelli A, Giordano S. From single- to multi-target drugs in cancer therapy: when aspecificity becomes an advantage. *Curr Med Chem* 2008;15:422–32.

Petty BG, Cornblath DR, Adornato BT, Chaudhry V, Flexner C, Wachsman M, et al. The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann Neurol* 1994;36:244–6. doi:10.1002/ana.410360221.

Philippidou P, Valdez G, Akmentin W, Bowers WJ, Federoff HJ, Halegoua S. Trk retrograde signaling requires persistent, Pincher-directed endosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:852–7. doi:10.1073/pnas.1015981108.

Piao H-L, Ma L. Non-coding RNAs as regulators of mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2012;17:33–42. doi:10.1007/s10911-012-9245-5.

Pimenta AC, Dourado DFAR, Martins JM, Melo A, Dias Soeiro Cordeiro MN, Almeida RD, et al. Dynamic Structure of NGF and proNGF Complexed with p75NTR: Pro-Peptide Effect. *J Chem Inf Model* 2014;54:2051–67. doi:10.1021/ci500101n.

Place AE, Jin Huh S, Polyak K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res* 2011;13:227. doi:10.1186/bcr2912.

BIBLIOGRAPHIE

- Plo I, Bono F, Bezombes C, Alam A, Bruno A, Laurent G. Nerve growth factor-induced protein kinase C stimulation contributes to TrkA-dependent inhibition of p75 neurotrophin receptor sphingolipid signaling. *J Neurosci Res* 2004;77:465–74. doi:10.1002/jnr.20189.
- Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 2007;117:3155–63. doi:10.1172/JCI33295.
- Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:33–45. doi:10.1038/nrm1004.
- Ponta H, Wainwright D, Herrlich P. The CD44 protein family. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:299–305.
- Ponuwei GA. A glimpse of the ERM proteins. *J Biomed Sci* 2016;23. doi:10.1186/s12929-016-0246-3.
- van der Post RS, Vogelaar IP, Carneiro F, Guilford P, Huntsman D, Hoogerbrugge N, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet* 2015;52:361–74. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103094.
- Powell JC, Twomey C, Jain R, McCarthy JV. Association between Presenilin-1 and TRAF6 modulates regulated intramembrane proteolysis of the p75NTR neurotrophin receptor. *J Neurochem* 2009;108:216–30. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05763.x.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:R68. doi:10.1186/bcr2635.
- Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology* 2011;5:5–23. doi:10.1016/j.molonc.2010.11.003.
- Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast* 2015;24:S26–35. doi:10.1016/j.breast.2015.07.008.
- Pundavela J, Roselli S, Faulkner S, Attia J, Scott RJ, Thorne RF, et al. Nerve fibers infiltrate the tumor microenvironment and are associated with nerve growth factor production and lymph node invasion in breast cancer. *Molecular Oncology* 2015;9:1626. doi:10.1016/j.molonc.2015.05.001.
- Purohit A, Woo LWL, Potter BVL. Steroid sulfatase: a pivotal player in estrogen synthesis and metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2011;340:154–60. doi:10.1016/j.mce.2011.06.012.
- Purohit V. Can alcohol promote aromatization of androgens to estrogens? A review. *Alcohol* 2000;22:123–7.
- Qiao A, Gu F, Guo X, Zhang X, Fu L. Breast cancer-associated fibroblasts: their roles in tumor initiation, progression and clinical applications. *Front Med* 2016;10:33–40. doi:10.1007/s11684-016-0431-5.

BIBLIOGRAPHIE

Qiu W, Hu M, Sridhar A, Opeskin K, Fox S, Shipitsin M, et al. No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Nat Genet* 2008;40:650–5. doi:10.1038/ng.117.

Quistgaard EM, Grøftehaug MK, Madsen P, Pallesen LT, Christensen B, Sørensen ES, et al. Revisiting the structure of the Vps10 domain of human sortilin and its interaction with neurotensin. *Protein Sci* 2014;23:1291–300. doi:10.1002/pro.2512.

Quistgaard EM, Madsen P, Grøftehaug MK, Nissen P, Petersen CM, Thirup SS. Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16:96–8. doi:10.1038/nsmb.1543.

Rabello D do A, de Moura CA, de Andrade RV, Motoyama AB, Silva FP. Altered expression of MLL methyltransferase family genes in breast cancer. *Int J Oncol* 2013;43:653–60. doi:10.3892/ijo.2013.1981.

Radisky ES, Radisky DC. Stromal induction of breast cancer: inflammation and invasion. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8:279–87. doi:10.1007/s11154-007-9037-1.

Rafieva LM, Gasanov EV. Neurotrophin Propeptides: Biological Functions and Molecular Mechanisms. *Curr Protein Pept Sci* 2016;17:298–305.

Rafieva LM, Shubin AV, Gasanov EV. [Precursors and propeptides of neurotrophic factors as the modulators of biological activity of its mature forms]. *Bioorg Khim* 2012;38:515–23.

Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 2010;12:207. doi:10.1186/bcr2607.

Rattenholl A, Ruoppolo M, Flagiello A, Monti M, Vinci F, Marino G, et al. Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *J Mol Biol* 2001;305:523–33. doi:10.1006/jmbi.2000.4295.

Reategui EP, de Mayolo AA, Das PM, Astor FC, Singal R, Hamilton KL, et al. Characterization of CD44v3-containing isoforms in head and neck cancer. *Cancer Biol Ther* 2006;5:1163–8.

Reinert T, Barrios CH. Optimal management of hormone receptor positive metastatic breast cancer in 2016. *Ther Adv Med Oncol* 2015;7:304–20. doi:10.1177/1758834015608993.

Ren XL, Qiao YD, Li JY, Li XM, Zhang D, Zhang XJ, et al. Cortactin recruits FMNL2 to promote actin polymerization and endosome motility in invadopodia formation. *Cancer Lett* 2018;419:245–56. doi:10.1016/j.canlet.2018.01.023.

Ribeiro AL, Okamoto OK. Combined Effects of Pericytes in the Tumor Microenvironment. *Stem Cells Int* 2015;2015. doi:10.1155/2015/868475.

Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 1999;286:2358–61.

BIBLIOGRAPHIE

de Rinaldis E, Gazinska P, Mera A, Modrusan Z, Fedorowicz GM, Burford B, et al. Integrated genomic analysis of triple-negative breast cancers reveals novel microRNAs associated with clinical and molecular phenotypes and sheds light on the pathways they control. *BMC Genomics* 2013;14:643. doi:10.1186/1471-2164-14-643.

Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer: Challenges for Personalized Medicine. *The American Journal of Pathology* 2013;183:1113–24. doi:10.1016/j.ajpath.2013.08.002.

Robanus-Maandag EC, Bosch CAJ, Kristel PM, Hart AAM, Faneyte IF, Nederlof PM, et al. Association of C-MYC amplification with progression from the in situ to the invasive stage in C-MYC-amplified breast carcinomas. *J Pathol* 2003;201:75–82. doi:10.1002/path.1385.

Robinson GW, Karpf AB, Kratochwil K. Regulation of mammary gland development by tissue interaction. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999;4:9–19.

Robinson KN, Manto K, Buchsbaum RJ, MacDonald JIS, Meakin SO. Neurotrophin-dependent tyrosine phosphorylation of Ras guanine-releasing factor 1 and associated neurite outgrowth is dependent on the HIKE domain of TrkA. *J Biol Chem* 2005;280:225–35. doi:10.1074/jbc.M410454200.

Robson M, Im S-A, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med* 2017;377:523–33. doi:10.1056/NEJMoa1706450.

Rodriguez C, Monges G, Rouanet P, Dutrillaux B, Lefrançois D, Theillet C. CD44 expression patterns in breast and colon tumors: a PCR-based study of splice variants. *Int J Cancer* 1995;64:347–54.

Rodríguez-Rodríguez L, Sancho-Torres I, Leakey P, Gibbon DG, Comerci JT, Ludlow JW, et al. CD44 splice variant expression in clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 1998;71:223–9.

Rodriguez-Tébar A, Dechant G, Barde YA. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 1990;4:487–92.

Rodríguez-Tébar A, Dechant G, Götz R, Barde YA. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* 1992;11:917–22.

Rogers M-L, Bailey S, Matusica D, Nicholson I, Muyderman H, Pagadala PC, et al. ProNGF mediates death of Natural Killer cells through activation of the p75NTR-sortilin complex. *J Neuroimmunol* 2010;226:93–103. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.05.040.

Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol* 2016;59:651–72. doi:10.1097/GRF.0000000000000239.

BIBLIOGRAPHIE

Romon R, Adriaenssens E, Lagadec C, Germain E, Hondermarck H, Le Bourhis X. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. *Mol Cancer* 2010;9:157. doi:10.1186/1476-4598-9-157.

Rong R, Ahn J-Y, Chen P, Suh P-G, Ye K. Phospholipase activity of phospholipase C-gamma1 is required for nerve growth factor-regulated MAP kinase signaling cascade in PC12 cells. *J Biol Chem* 2003;278:52497–503. doi:10.1074/jbc.M306744200.

Rosário M, Franke R, Bednarski C, Birchmeier W. The neurite outgrowth multiadaptor RhoGAP, NOMA-GAP, regulates neurite extension through SHP2 and Cdc42. *J Cell Biol* 2007;178:503–16. doi:10.1083/jcb.200609146.

Rösch H, Schweigreiter R, Bonhoeffer T, Barde Y-A, Korte M. The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:7362–7. doi:10.1073/pnas.0502460102.

Rose AAN, Annis MG, Dong Z, Pepin F, Hallett M, Park M, et al. ADAM10 Releases a Soluble Form of the GPNMB/Osteoactivin Extracellular Domain with Angiogenic Properties. *PLOS ONE* 2010a;5:e12093. doi:10.1371/journal.pone.0012093.

Rose AAN, Biondini M, Curiel R, Siegel PM. Targeting GPNMB with glembatumumab vedotin: Current developments and future opportunities for the treatment of cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 2017;179:127–41. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.05.010.

Rose AAN, Grosset A-A, Dong Z, Russo C, MacDonald PA, Bertos NR, et al. Glycoprotein Nonmetastatic B Is an Independent Prognostic Indicator of Recurrence and a Novel Therapeutic Target in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2010b;16:2147–56. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1611.

Roselli S, Wallez Y, Wang L, Vervoort V, Pasquale EB. The SH2 domain protein Shep1 regulates the in vivo signaling function of the scaffolding protein Cas. *Cell Signal* 2010;22:1745–52. doi:10.1016/j.cellsig.2010.06.015.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:321–33.

Routhier A, Astuccio M, Lahey D, Monfredo N, Johnson A, Callahan W, et al. Pharmacological inhibition of Rho-kinase signaling with Y-27632 blocks melanoma tumor growth. *Oncol Rep* 2010;23:861–7.

Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology* 2002;67:203–33. doi:10.1016/S0301-0082(02)00016-3.

Roux PP, Colicos MA, Barker PA, Kennedy TE. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *J Neurosci* 1999;19:6887–96.

BIBLIOGRAPHIE

Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:5678–85. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2421.

Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 2011;12:68–78. doi:10.1038/nrc3181.

Ruan W, Kleinberg DL. Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology* 1999;140:5075–81. doi:10.1210/endo.140.11.7095.

Ruddy KJ, Winer EP. Male breast cancer: risk factors, biology, diagnosis, treatment, and survivorship. *Ann Oncol* 2013;24:1434–43. doi:10.1093/annonc/mdt025.

Ruike Y, Imanaka Y, Sato F, Shimizu K, Tsujimoto G. Genome-wide analysis of aberrant methylation in human breast cancer cells using methyl-DNA immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing. *BMC Genomics* 2010;11:137. doi:10.1186/1471-2164-11-137.

Russo J, Calaf G, Roi L, Russo IH. Influence of age and gland topography on cell kinetics of normal human breast tissue. *J Natl Cancer Inst* 1987;78:413–8.

Russo J, Russo IH. Development of the human breast. *Maturitas* 2004;49:2–15. doi:10.1016/j.maturitas.2004.04.011.

Russo J, Tay LK, Russo IH. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1982;2:5–73.

Rydén M, Hempstead B, Ibáñez CF. Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* 1997;272:16322–8.

Rydén M, Murray-Rust J, Glass D, Ilag LL, Trupp M, Yancopoulos GD, et al. Functional analysis of mutant neurotrophins deficient in low-affinity binding reveals a role for p75LNGFR in NT-4 signalling. *EMBO J* 1995;14:1979–90.

Ryś J, Kruczek A, Lackowska B, Jaszcz-Gruchała A, Brandys A, Stelmach A, et al. The role of CD44v3 expression in female breast carcinomas. *Pol J Pathol* 2003;54:243–7.

Saegusa M, Machida D, Hashimura M, Okayasu I. CD44 expression in benign, premalignant, and malignant ovarian neoplasms: relation to tumour development and progression. *J Pathol* 1999;189:326–37. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199911)189:3<326::AID-PATH425>3.0.CO;2-6.

Sakakura T, Sakagami Y, Nishizuka Y. Dual origin of mesenchymal tissues participating in mouse mammary gland embryogenesis. *Dev Biol* 1982;91:202–7.

Salehi AH, Xanthoudakis S, Barker PA. NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 2002;277:48043–50. doi:10.1074/jbc.M205324200.

BIBLIOGRAPHIE

Samson M, Porter N, Orekoya O, Hebert JR, Adams SA, Bennett CL, et al. Progesterin and breast cancer risk: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat* 2016;155:3–12. doi:10.1007/s10549-015-3663-1.

Samuel MS, Lopez JI, McGhee EJ, Croft DR, Strachan D, Timpson P, et al. Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and β -catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth. *Cancer Cell* 2011;19:776–91. doi:10.1016/j.ccr.2011.05.008.

Sánchez-Bailón MP, Calcabrini A, Gómez-Domínguez D, Morte B, Martín-Forero E, Gómez-López G, et al. Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Signal* 2012;24:1276–86.

Sandhu GK, Milevskiy MJG, Wilson W, Shewan AM, Brown MA. Non-coding RNAs in Mammary Gland Development and Disease. *Adv Exp Med Biol* 2016;886:121–53. doi:10.1007/978-94-017-7417-8_7.

Sarrió D, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sánchez-Estévez C, Guo M, Herman JG, et al. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *Int J Cancer* 2003;106:208–15. doi:10.1002/ijc.11197.

Saura C, Bendell J, Jerusalem G, Su S, Ru Q, De Buck S, et al. Phase Ib study of Buparlisib plus Trastuzumab in patients with HER2-positive advanced or metastatic breast cancer that has progressed on Trastuzumab-based therapy. *Clin Cancer Res* 2014;20:1935–45. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1070.

Scarff RW, Torloni H. *Histological Typing of Breast Tumours*. World Health Organization; 1968.

Schaider H, Soyer HP, Heider KH, Hofmann-Wellenhof R, Zatloukal K, Smolle J, et al. CD44 and variants in melanocytic skin neoplasms. *J Cutan Pathol* 1998;25:199–203.

Schenck K, Schreurs O, Hayashi K, Helgeland K. The Role of Nerve Growth Factor (NGF) and Its Precursor Forms in Oral Wound Healing. *Int J Mol Sci* 2017;18. doi:10.3390/ijms18020386.

Schiller MR. Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases--GEFs what's the link. *Cell Signal* 2006;18:1834–43. doi:10.1016/j.cellsig.2006.01.022.

Schlessinger J, Lemmon MA. SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE* 2003;2003:RE12. doi:10.1126/stke.2003.191.re12.

Schmidt BL. The neurobiology of cancer pain. *Neuroscientist* 2014;20:546–62. doi:10.1177/1073858414525828.

Schneider R, Schweiger M. A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene* 1991;6:1807–11.

Schofield AV, Bernard O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013;48:301–16. doi:10.3109/10409238.2013.786671.

BIBLIOGRAPHIE

Schulz R, Streller F, Scheel AH, Rüschoff J, Reinert M-C, Dobbelstein M, et al. HER2/ErbB2 activates HSF1 and thereby controls HSP90 clients including MIF in HER2-overexpressing breast cancer. *Cell Death Dis* 2014;5:e980. doi:10.1038/cddis.2013.508.

Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 2010;11:799–811. doi:10.1038/nrn2936.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115:199–208.

Scocciati C, Lauby-Secretan B, Bello P-Y, Chajes V, Romieu I. Female breast cancer and alcohol consumption: a review of the literature. *Am J Prev Med* 2014;46:S16-25. doi:10.1016/j.amepre.2013.10.031.

Screaton GR, Bell MV, Bell JI, Jackson DG. The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor: Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat. *Journal of Biological Chemistry* 1993;268:12235–8.

Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:12160–4.

Scully OJ, Bay B-H, Yip G, Yu Y. Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* 2012;9:311–20.

Seaman MNJ. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol* 2004;165:111–22. doi:10.1083/jcb.200312034.

Seidah NG, Benjannet S, Hamelin J, Mamarbachi AM, Basak A, Marcinkiewicz J, et al. The subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the novel enzyme SKI-1. *Ann N Y Acad Sci* 1999;885:57–74.

Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, et al. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* 1996;314 (Pt 3):951–60.

Seiter S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, et al. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 1993;177:443–55.

Serup Andersen O, Boisguerin P, Glerup S, Skeldal S, Volkmer R, Willnow TE, et al. Identification of a linear epitope in sortilin that partakes in pro-neurotrophin binding. *J Biol Chem* 2010;285:12210–22. doi:10.1074/jbc.M109.062364.

Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell* 2009;138:822–9. doi:10.1016/j.cell.2009.08.017.

Shah M, Nunes MR, Stearns V. CDK4/6 Inhibitors: Game Changers in the Management of Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer? *Oncology (Williston Park, NY)* 2018;32:216–22.

BIBLIOGRAPHIE

Shalapour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest* 2015;125:3347–55. doi:10.1172/JCI80007.

Shamovsky IL, Ross GM, Riopelle RJ, Weaver DF. The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study. *Protein Sci* 1999;8:2223–33. doi:10.1110/ps.8.11.2223.

Shao Y, Sun X, He Y, Liu C, Liu H. Elevated Levels of Serum Tumor Markers CEA and CA15-3 Are Prognostic Parameters for Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *PLoS One* 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0133830.

Sheikh A, Hussain SA, Ghori Q, Naeem N, Fazil A, Giri S, et al. The spectrum of genetic mutations in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:2177–85.

Shekhar MPV, Santner S, Carolin KA, Tait L. Direct Involvement of Breast Tumor Fibroblasts in the Modulation of Tamoxifen Sensitivity. *The American Journal of Pathology* 2007;170:1546–60. doi:10.2353/ajpath.2007.061004.

Shelton DL, Reichardt LF. Studies on the expression of the beta nerve growth factor (NGF) gene in the central nervous system: level and regional distribution of NGF mRNA suggest that NGF functions as a trophic factor for several distinct populations of neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2714–8.

Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:726–33.

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

Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009;30:636–45. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.010.

Shi J, Kandror KV. Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *Dev Cell* 2005;9:99–108. doi:10.1016/j.devcel.2005.04.004.

Shintani T, Noda M. Protein tyrosine phosphatase receptor type Z dephosphorylates TrkA receptors and attenuates NGF-dependent neurite outgrowth of PC12 cells. *J Biochem* 2008;144:259–66. doi:10.1093/jb/mvn064.

Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol* 2015;26:1291–9. doi:10.1093/annonc/mdv022.

Si M-L, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo Y-Y. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007;26:2799–803. doi:10.1038/sj.onc.1210083.

Silberstein GB, Daniel CW. Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor-beta. *Science* 1987;237:291–3.

BIBLIOGRAPHIE

Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001;264:29–41. doi:10.1006/excr.2000.5130.

Singer WD, Brown HA, Sternweis PC. Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu Rev Biochem* 1997;66:475–509. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.475.

Singh P, Yang M, Dai H, Yu D, Huang Q, Tan W, et al. Overexpression and hypomethylation of flap endonuclease 1 gene in breast and other cancers. *Mol Cancer Res* 2008;6:1710–7. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0269.

Sisti JS, Collins LC, Beck AH, Tamimi RM, Rosner BA, Eliassen AH. Reproductive risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer: results from the Nurses' Health Studies. *Int J Cancer* 2016;138:2346–56. doi:10.1002/ijc.29968.

Skaper SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol* 2012;846:1–12. doi:10.1007/978-1-61779-536-7_1.

Skeldal S, Matusica D, Nykjaer A, Coulson EJ. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75(NTR). *Bioessays* 2011;33:614–25. doi:10.1002/bies.201100036.

Skeldal S, Sykes AM, Glerup S, Matusica D, Palstra N, Autio H, et al. Mapping of the Interaction Site between Sortilin and the p75 Neurotrophin Receptor Reveals a Regulatory Role for the Sortilin Intracellular Domain in p75 Neurotrophin Receptor Shedding and Apoptosis. *J Biol Chem* 2012;287:43798–809. doi:10.1074/jbc.M112.374710.

Skelton TP, Zeng C, Nocks A, Stamenkovic I. Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan. *J Cell Biol* 1998;140:431–46.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177–82.

Smilowitz JT, Lebrilla CB, Mills DA, German JB, Freeman SL. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annu Rev Nutr* 2014;34:143–69. doi:10.1146/annurev-nutr-071813-105721.

Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994;76:959–62.

Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *MP, Mol Pathol* 1998;51:191–200.

Sobottka B, Reinhardt D, Brockhaus M, Jacobsen H, Metzger F. ProNGF inhibits NGF-mediated TrkA activation in PC12 cells. *J Neurochem* 2008;107:1294–303. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05690.x.

BIBLIOGRAPHIE

Sokolina K, Kittanakom S, Snider J, Kotlyar M, Maurice P, Gandía J, et al. Systematic protein-protein interaction mapping for clinically relevant human GPCRs. *Mol Syst Biol* 2017;13:918. doi:10.15252/msb.20167430.

Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009;86:1065–73. doi:10.1189/jlb.0609385.

Son KS, Kang H-S, Kim SJ, Jung S-Y, Min SY, Lee SY, et al. Hypomethylation of the interleukin-10 gene in breast cancer tissues. *The Breast* 2010;19:484–8. doi:10.1016/j.breast.2010.05.011.

Song W, Hwang Y, Youngblood VM, Cook RS, Balko JM, Chen J, et al. Targeting EphA2 impairs cell cycle progression and growth of basal-like/triple-negative breast cancers. *Oncogene* 2017;36:5620–30. doi:10.1038/onc.2017.170.

Sonnenblick A, de Azambuja E, Azim HA, Piccart M. An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol* 2015;12:27–41. doi:10.1038/nrclinonc.2014.163.

Sopata M, Katz N, Carey W, Smith MD, Keller D, Verburg KM, et al. Efficacy and safety of tanezumab in the treatment of pain from bone metastases. *Pain* 2015;156:1703–13. doi:10.1097/j.pain.0000000000000211.

Sørensen KP, Thomassen M, Tan Q, Bak M, Cold S, Burton M, et al. Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker of metastasis in estrogen receptor-positive primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013;142:529–36. doi:10.1007/s10549-013-2776-7.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869–74. doi:10.1073/pnas.191367098.

Sørli T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8418–23. doi:10.1073/pnas.0932692100.

Sortino MA, Condorelli F, Vancheri C, Chiarenza A, Bernardini R, Consoli U, et al. Mitogenic effect of nerve growth factor (NGF) in LNCaP prostate adenocarcinoma cells: role of the high- and low-affinity NGF receptors. *Mol Endocrinol* 2000;14:124–36. doi:10.1210/mend.14.1.0402.

Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology* 2015;82:142–52. doi:10.1159/000430499.

Spandidos DA. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. *J BUON* 2007;12 Suppl 1:S9-12.

BIBLIOGRAPHIE

Srihari S, Kalimutho M, Lal S, Singla J, Patel D, Simpson PT, et al. Understanding the functional impact of copy number alterations in breast cancer using a network modeling approach. *Mol Biosyst* 2016;12:963–72. doi:10.1039/c5mb00655d.

Staaf J, Jönsson G, Ringnér M, Baldetorp B, Borg A. Landscape of somatic allelic imbalances and copy number alterations in HER2-amplified breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011;13:R129. doi:10.1186/bcr3075.

Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J* 1991;10:343–8.

Stanway SJ, Delavault P, Purohit A, Woo LWL, Thurieau C, Potter BVL, et al. Steroid sulfatase: a new target for the endocrine therapy of breast cancer. *Oncologist* 2007;12:370–4. doi:10.1634/theoncologist.12-4-370.

Stefansson OA, Jonasson JG, Olafsdottir K, Hilmarsdottir H, Olafsdottir G, Esteller M, et al. CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer. *Epigenetics* 2011;6:638–49. doi:10.4161/epi.6.5.15667.

Stefansson OA, Moran S, Gomez A, Sayols S, Arribas-Jorba C, Sandoval J, et al. A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes. *Molecular Oncology* 2015;9:555–68. doi:10.1016/j.molonc.2014.10.012.

Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 2012;486:400–4. doi:10.1038/nature11017.

Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA, Kaplan DR. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 1994;12:691–705.

Stoica G, Lungu G, Kim H-T, Wong PKY. Up-regulation of pro-nerve growth factor, neurotrophin receptor p75, and sortilin is associated with retrovirus-induced spongiform encephalomyelopathy. *Brain Res* 2008;1208:204–16. doi:10.1016/j.brainres.2008.02.085.

Strange R, Li F, Saurer S, Burkhardt A, Friis RR. Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development* 1992;115:49–58.

Stratton MR, Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008;40:17–22. doi:10.1038/ng.2007.53.

Strong A, Patel K, Rader DJ. Sortilin And Lipoprotein Metabolism: Making Sense Out Of Complexity. *Curr Opin Lipidol* 2014;25:350–7. doi:10.1097/MOL.000000000000110.

Sumi T, Matsumoto K, Nakamura T. Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2001;276:670–6. doi:10.1074/jbc.M007074200.

BIBLIOGRAPHIE

Sundberg C, Kowanetz M, Brown LF, Detmar M, Dvorak HF. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest* 2002;82:387–401.

Suo D, Park J, Harrington AW, Zweifel LS, Mihalas S, Deppmann CD. Coronin-1 is a neurotrophin endosomal effector that is required for developmental competition for survival. *Nat Neurosci* 2014;17:36–45. doi:10.1038/nn.3593.

Suter U, Heymach JV, Shooter EM. Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *EMBO J* 1991;10:2395–400.

Sutter A, Riopelle RJ, Harris-Warrick RM, Shooter EM. Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J Biol Chem* 1979;254:5972–82.

Suzuki J, Chen Y-Y, Scott GK, Devries S, Chin K, Benz CC, et al. Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2009;15:3163–71. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2319.

Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Cea G, Panella S, Chioda A, et al. TrkAIII expression in the thymus. *J Neuroimmunol* 2007;183:151–61. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.12.005.

Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Desantis G, Tessitore A, Vetuschi A, et al. TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 2004;6:347–60. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.011.

Takatsu H, Katoh Y, Shiba Y, Nakayama K. Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding (GGA) proteins interact with acidic dileucine sequences within the cytoplasmic domains of sorting receptors through their Vps27p/Hrs/STAM (VHS) domains. *J Biol Chem* 2001;276:28541–5. doi:10.1074/jbc.C100218200.

Talhouk RS, Bissell MJ, Werb Z. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol* 1992;118:1271–82.

Tamimi RM, Colditz GA, Hazra A, Baer HJ, Hankinson SE, Rosner B, et al. Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;131:159–67. doi:10.1007/s10549-011-1702-0.

Tan E-J, Kahata K, Idås O, Thuault S, Heldin C-H, Moustakas A. The high mobility group A2 protein epigenetically silences the *Cdh1* gene during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res* 2015;43:162–78. doi:10.1093/nar/gku1293.

Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, et al. Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification. *Cell* 2011;146:1016–28. doi:10.1016/j.cell.2011.08.008.

BIBLIOGRAPHIE

Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* 2011;470:548–53. doi:10.1038/nature09707.

Tang P, Skinner KA, Hicks DG. Molecular Classification of Breast Carcinomas by Immunohistochemical Analysis: Are We Ready? *Diagnostic Molecular Pathology* 2009;18:125–32. doi:10.1097/PDM.0b013e31818d107b.

Tanimura S, Chatani Y, Hoshino R, Sato M, Watanabe S, Kataoka T, et al. Activation of the 41/43 kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway is required for hepatocyte growth factor-induced cell scattering. *Oncogene* 1998;17:57–65. doi:10.1038/sj.onc.1201905.

Tao L, Huang G, Song H, Chen Y, Chen L. Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment (Review). *Oncology Letters* 2017;14:2611–20. doi:10.3892/ol.2017.6497.

Tao R-H, Maruyama IN. All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. *J Cell Sci* 2008;121:3207–17. doi:10.1242/jcs.033399.

Tapia V, Gabler F, Muñoz M, Yazigi R, Paredes A, Selman A, et al. Tyrosine kinase A receptor (trkA): a potential marker in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2011;121:13–23. doi:10.1016/j.ygyno.2010.12.341.

Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL. Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev Neurobiol* 2010;70:350–9. doi:10.1002/dneu.20768.

Tep C, Lim TH, Ko PO, Getahun S, Ryu JC, Goettl VM, et al. Oral Administration of a Small Molecule Targeted to Block proNGF Binding to p75 Promotes Myelin Sparing and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J Neurosci* 2013;33:397–410. doi:10.1523/JNEUROSCI.0399-12.2013.

The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012;490:61–70. doi:10.1038/nature11412.

Thompson EW, Paik S, Brünner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, et al. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 1992;150:534–44. doi:10.1002/jcp.1041500314.

Tice JA, O’Meara ES, Weaver DL, Vachon C, Ballard-Barbash R, Kerlikowske K. Benign breast disease, mammographic breast density, and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:1043–9. doi:10.1093/jnci/djt124.

Tijink BM, Buter J, de Bree R, Giaccone G, Lang MS, Staab A, et al. A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus. *Clin Cancer Res* 2006;12:6064–72. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0910.

BIBLIOGRAPHIE

Titus-Ernstoff L, Longnecker MP, Newcomb PA, Dain B, Greenberg ER, Mittendorf R, et al. Menstrual factors in relation to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:783–9.

Todoroki K, Ogasawara S, Akiba J, Nakayama M, Naito Y, Seki N, et al. CD44v3+/CD24- cells possess cancer stem cell-like properties in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2015. doi:10.3892/ijo.2015.3261.

Toillon R-A, Chopin V, Jouy N, Fauquette W, Boilly B, Le Bourhis X. Normal breast epithelial cells induce p53-dependent apoptosis and p53-independent cell cycle arrest of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2002;71:269–80.

Toillon R-A, Lagadec C, Page A, Chopin V, Sautière P-E, Ricort J-M, et al. Proteomics Demonstration That Normal Breast Epithelial Cells Can Induce Apoptosis of Breast Cancer Cells through Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 and Maspin. *Molecular & Cellular Proteomics* 2007;6:1239–47. doi:10.1074/mcp.M600477-MCP200.

Tomao F, Papa A, Zaccarelli E, Rossi L, Caruso D, Minozzi M, et al. Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *Onco Targets Ther* 2015;8:177–93. doi:10.2147/OTT.S67673.

Tomellini E, Touil Y, Lagadec C, Julien S, Ostyn P, Ziental-Gelus N, et al. Nerve growth factor and proNGF simultaneously promote symmetric self-renewal, quiescence, and epithelial to mesenchymal transition to enlarge the breast cancer stem cell compartment. *Stem Cells* 2015;33:342–53. doi:10.1002/stem.1849.

Tong CWS, Wu M, Cho WCS, To KKW. Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer. *Front Oncol* 2018;8. doi:10.3389/fonc.2018.00227.

Trabjerg E, Kartberg F, Christensen S, Rand KD. Conformational characterization of nerve growth factor- β reveals that its regulatory pro-part domain stabilizes three loop regions in its mature part. *J Biol Chem* 2017;292:16665–76. doi:10.1074/jbc.M117.803320.

Tremmel M, Matzke A, Albrecht I, Laib AM, Olaku V, Ballmer-Hofer K, et al. A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis. *Blood* 2009;114:5236–44. doi:10.1182/blood-2009-04-219204.

Trop I, LeBlanc SM, David J, Lalonde L, Tran-Thanh D, Labelle M, et al. Molecular classification of infiltrating breast cancer: toward personalized therapy. *Radiographics* 2014;34:1178–95. doi:10.1148/rg.345130049.

Tropberger P, Schneider R. Going global: novel histone modifications in the globular domain of H3. *Epigenetics* 2010;5:112–7.

Trudeau ME, Crump M, Charpentier D, Yelle L, Bordeleau L, Matthews S, et al. Temozolomide in metastatic breast cancer (MBC): a phase II trial of the National Cancer Institute of Canada - Clinical Trials Group (NCIC-CTG). *Ann Oncol* 2006;17:952–6. doi:10.1093/annonc/mdl056.

BIBLIOGRAPHIE

Truzzi F, Marconi A, Lotti R, Dallaglio K, French LE, Hempstead BL, et al. Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* 2008;128:2031–40. doi:10.1038/jid.2008.21.

Tsimberidou AM, Eggermont AMM, Schilsky RL. Precision cancer medicine: the future is now, only better. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2014;61–9. doi:10.14694/EdBook_AM.2014.34.61.

Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 2004;4:814–9. doi:10.1038/nrc1457.

Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* 2007;26:2126–32. doi:10.1038/sj.onc.1210014.

Tyan S-W, Kuo W-H, Huang C-K, Pan C-C, Shew J-Y, Chang K-J, et al. Breast Cancer Cells Induce Cancer-Associated Fibroblasts to Secrete Hepatocyte Growth Factor to Enhance Breast Tumorigenesis. *PLOS ONE* 2011;6:e15313. doi:10.1371/journal.pone.0015313.

Ugolini G, Marinelli S, Covaceuszach S, Cattaneo A, Pavone F. The function neutralizing anti-TrkA antibody MNAC13 reduces inflammatory and neuropathic pain. *PNAS* 2007;104:2985–90. doi:10.1073/pnas.0611253104.

Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203–12.

Underhill C. CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci* 1992;103 (Pt 2):293–8.

Underwood CK, Reid K, May LM, Bartlett PF, Coulson EJ. Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase. *Mol Cell Neurosci* 2008;37:346–58. doi:10.1016/j.mcn.2007.10.005.

Urban D, Lorenz J, Meyborg H, Ghosh S, Kintscher U, Kaufmann J, et al. Proprotein convertase furin enhances survival and migration of vascular smooth muscle cells via processing of pro-nerve growth factor. *J Biochem* 2013;153:197–207. doi:10.1093/jb/mvs137.

Urfer R, Tsoulfas P, O’Connell L, Shelton DL, Parada LF, Presta LG. An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J* 1995;14:2795–805.

Vaegter CB, Jansen P, Fjorback AW, Glerup S, Skeldal S, Richner M, et al. Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and signaling by neurotrophins. *Nat Neurosci* 2011;14. doi:10.1038/nn.2689.

Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med* 2013;19:1469–72. doi:10.1038/nm.3352.

Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC. TRKking Down an Old Oncogene in a New Era of Targeted Therapy. *Cancer Discov* 2015;5:25–34. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0765.

BIBLIOGRAPHIE

Valdez G, Akmentin W, Philippidou P, Kuruvilla R, Ginty DD, Halegoua S. Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors. *J Neurosci* 2005;25:5236–47. doi:10.1523/JNEUROSCI.5104-04.2005.

Valdez G, Philippidou P, Rosenbaum J, Akmentin W, Shao Y, Halegoua S. Trk-signaling endosomes are generated by Rac-dependent macroendocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:12270–5. doi:10.1073/pnas.0702819104.

Vallejos CS, Gómez HL, Cruz WR, Pinto JA, Dyer RR, Velarde R, et al. Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *Clin Breast Cancer* 2010;10:294–300. doi:10.3816/CBC.2010.n.038.

Van Grembergen O, Bizet M, de Bony EJ, Calonne E, Putmans P, Brohée S, et al. Portraying breast cancers with long noncoding RNAs. *Sci Adv* 2016;2:e1600220. doi:10.1126/sciadv.1600220.

Vanhecke E, Adriaenssens E, Verbeke S, Meignan S, Germain E, Berteaux N, et al. 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* 2011;17:1741–52. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1890.

Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews Cancer* 2007;7:659–72. doi:10.1038/nrc2193.

Vazquez-Ortiz G, Chisholm C, Xu X, Lahusen TJ, Li C, Sakamuru S, et al. Drug repurposing screen identifies lestaurtinib amplifies the ability of the poly (ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor AG14361 to kill breast cancer associated gene-1 mutant and wild type breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2014;16:R67. doi:10.1186/bcr3682.

Veeck J, Esteller M. Breast Cancer Epigenetics: From DNA Methylation to microRNAs. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15:5–17. doi:10.1007/s10911-010-9165-1.

Vela E, Hilari JM, Roca X, Muñoz-Mármol AM, Ariza A, Isamat M. Multisite and bidirectional exonic splicing enhancer in CD44 alternative exon v3. *RNA* 2007;13:2312–23. doi:10.1261/rna.732807.

Veltmaat JM, Relaix F, Le LT, Kratochwil K, Sala FG, van Veelen W, et al. Gli3-mediated somitic Fgf10 expression gradients are required for the induction and patterning of mammary epithelium along the embryonic axes. *Development* 2006;133:2325–35. doi:10.1242/dev.02394.

Verbeke S, Meignan S, Lagadec C, Germain E, Hondermarck H, Adriaenssens E, et al. Overexpression of p75(NTR) increases survival of breast cancer cells through p21(waf1). *Cell Signal* 2010;22:1864–73. doi:10.1016/j.cellsig.2010.07.014.

Vesuna F, Lisok A, Kimble B, Raman V. Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia* 2009;11:1318–28.

BIBLIOGRAPHIE

- Vetter ML, Martin-Zanca D, Parada LF, Bishop JM, Kaplan DR. Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5650–4.
- Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol* 2012;23 Suppl 10:x207-210. doi:10.1093/annonc/mds326.
- Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Simi A, Karaca E, Reversi A, et al. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* 2009;62:72–83. doi:10.1016/j.neuron.2009.02.020.
- Virani Shama, Virani Shami, Colacino JA, Kim JH, Rozek LS. Cancer epigenetics: a brief review. *ILAR J* 2012;53:359–69. doi:10.1093/ilar.53.3-4.359.
- Visvader JE. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* 2009;23:2563–77. doi:10.1101/gad.1849509.
- van der Voort R, Taher TE, Derksen PW, Spaargaren M, van der Neut R, Pals ST. The hepatocyte growth factor/Met pathway in development, tumorigenesis, and B-cell differentiation. *Adv Cancer Res* 2000;79:39–90.
- Voutsadakis IA. HER2 in stemness and epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer. *Clin Transl Oncol* 2018. doi:10.1007/s12094-018-1961-x.
- Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch* 2014;465:1–14. doi:10.1007/s00428-014-1593-7.
- Walerych D, Napoli M, Collavin L, Del Sal G. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis* 2012;33:2007–17. doi:10.1093/carcin/bgs232.
- Walicke PA, Hefti F, Bales R, Lu S-P, Ruckle JL, Brown MT, et al. First-in-human randomized clinical trials of the safety and efficacy of tanezumab for treatment of chronic knee osteoarthritis pain or acute bunionectomy pain. *Pain Rep* 2018;3:e653. doi:10.1097/PR9.0000000000000653.
- Walker RA. Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. *Journal of Clinical Pathology* 2008;61:689–96. doi:10.1136/jcp.2006.041830.
- Walker-Daniels J, Riese DJ, Kinch MS. c-Cbl-dependent EphA2 protein degradation is induced by ligand binding. *Mol Cancer Res* 2002;1:79–87.
- Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, Dowidar N, Schaper C, Ferree S, et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Medical Genomics* 2015;8:54. doi:10.1186/s12920-015-0129-6.
- Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 2002;420:74–8. doi:10.1038/nature01176.

BIBLIOGRAPHIE

Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* 2017;8:761–73. doi:10.7150/jca.17648.

Wang W, Quan Y, Fu Q, Liu Y, Liang Y, Wu J, et al. Dynamics between Cancer Cell Subpopulations Reveals a Model Coordinating with Both Hierarchical and Stochastic Concepts. *PLOS ONE* 2014;9:e84654. doi:10.1371/journal.pone.0084654.

Wang X, Simpson ER, Brown KA. Aromatase overexpression in dysfunctional adipose tissue links obesity to postmenopausal breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015;153:35–44. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.07.008.

Wang Y, Klijn JGM, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365:671–9. doi:10.1016/S0140-6736(05)17947-1.

Wang YM, Seibenhener ML, Vandenplas ML, Wooten MW. Atypical PKC zeta is activated by ceramide, resulting in coactivation of NF-kappaB/JNK kinase and cell survival. *J Neurosci Res* 1999;55:293–302. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19990201)55:3<293::AID-JNR4>3.0.CO;2-9.

Warrington RJ, Lewis KE. Natural antibodies against nerve growth factor inhibit in vitro prostate cancer cell metastasis. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60:187–95. doi:10.1007/s00262-010-0934-x.

Watson FL, Porcionatto MA, Bhattacharyya A, Stiles CD, Segal RA. TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J Neurobiol* 1999;39:323–36.

Weeraratna AT, Dalrymple SL, Lamb JC, Denmeade SR, Miknyoczki S, Dionne CA, et al. Pan-trk inhibition decreases metastasis and enhances host survival in experimental models as a result of its selective induction of apoptosis of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001;7:2237–45.

Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H, Garcia KC. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* 2007;53:25–38. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.034.

Weidle UH, Maisel D, Klostermann S, Weiss EH, Schmitt M. Differential Splicing Generates New Transmembrane Receptor and Extracellular Matrix-related Targets for Antibody-based Therapy of Cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2011;8:211–26.

Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol* 2010a;220:263–80. doi:10.1002/path.2648.

Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: How special are they? *Molecular Oncology* 2010b;4:192–208. doi:10.1016/j.molonc.2010.04.004.

Wellings SR, Jensen HM. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *J Natl Cancer Inst* 1973;50:1111–8.

BIBLIOGRAPHIE

Wells CD, Gutowski S, Bollag G, Sternweis PC. Identification of potential mechanisms for regulation of p115 RhoGEF through analysis of endogenous and mutant forms of the exchange factor. *J Biol Chem* 2001;276:28897–905. doi:10.1074/jbc.M102913200.

Westergaard UB, Sørensen ES, Hermey G, Nielsen MS, Nykjær A, Kirkegaard K, et al. Functional Organization of the Sortilin Vps10p Domain. *J Biol Chem* 2004;279:50221–9. doi:10.1074/jbc.M408873200.

Wiesmann C, de Vos AM. Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:748–59.

Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G, et al. Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:8006–14. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0632.

Willnow TE, Petersen CM, Nykjaer A. VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:899–909. doi:10.1038/nrn2516.

Wilson CM, Naves T, Vincent F, Melloni B, Bonnaud F, Lalloué F, et al. Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J Cell Sci* 2014;127:3983–97. doi:10.1242/jcs.149336.

Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 2012;487:505–9. doi:10.1038/nature11249.

Witkiewicz AK, Knudsen ES. Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions. *Breast Cancer Res* 2014;16:207. doi:10.1186/bcr3652.

Wolfson B, Eades G, Zhou Q. Adipocyte activation of cancer stem cell signaling in breast cancer. *World Journal of Biological Chemistry* 2015;6:39–47. doi:10.4331/wjbc.v6.i2.39.

Wong SHM, Fang CM, Chuah L-H, Leong CO, Ngai SC. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2018;121:11–22. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.11.010.

Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang K, Bothwell M, Poo M. A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* 2002;5:1302–8. doi:10.1038/nn975.

Woo NH, Teng HK, Siao C-J, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, et al. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* 2005;8:1069–77. doi:10.1038/nn1510.

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995;378:789–92. doi:10.1038/378789a0.

BIBLIOGRAPHIE

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994;265:2088–90.

Wooten MW, Seibenhener ML, Neidigh KB, Vandenplas ML. Mapping of atypical protein kinase C within the nerve growth factor signaling cascade: relationship to differentiation and survival of PC12 cells. *Mol Cell Biol* 2000;20:4494–504.

Wooten MW, Vandenplas ML, Seibenhener ML, Geetha T, Diaz-Meco MT. Nerve growth factor stimulates multisite tyrosine phosphorylation and activation of the atypical protein kinase C's via a src kinase pathway. *Mol Cell Biol* 2001;21:8414–27. doi:10.1128/MCB.21.24.8414-8427.2001.

Wu C, Lai CF, Mobley WC. Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J Neurosci* 2001;21:5406–16.

Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet* 2014;46:444–50. doi:10.1038/ng.2938.

Wu X-J, Li X-D, Zhang H, Zhang X, Ning Z-H, Yin Y-M, et al. Clinical significance of CD44s, CD44v3 and CD44v6 in breast cancer. *J Int Med Res* 2015;43:173–9. doi:10.1177/0300060514559793.

Wuerstlein R, Harbeck N. Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer. *Rev Recent Clin Trials* 2017;12:81–92. doi:10.2174/1574887112666170202165049.

Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2010;15:166–79.

Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 1996;273:959–63.

Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA, Greenberg ME. Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1998;18:1946–55.

Xu N, Chen F, Wang F, Lu X, Wang X, Lv M, et al. Clinical significance of high expression of circulating serum lncRNA RP11-445H22.4 in breast cancer patients: a Chinese population-based study. *Tumor Biol* 2015;36:7659–65. doi:10.1007/s13277-015-3469-0.

Yamaguchi H. Pathological roles of invadopodia in cancer invasion and metastasis. *Eur J Cell Biol* 2012;91:902–7. doi:10.1016/j.ejcb.2012.04.005.

Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K, Terao S, Mitsuma T. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res* 1996;21:929–38.

Yamashita T, Tohyama M. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 2003;6:461–7. doi:10.1038/nn1045.

BIBLIOGRAPHIE

- Yamashita T, Tucker KL, Barde YA. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 1999;24:585–93.
- Yan KS, Kuti M, Yan S, Mujtaba S, Farooq A, Goldfarb MP, et al. FRS2 PTB domain conformation regulates interactions with divergent neurotrophic receptors. *J Biol Chem* 2002;277:17088–94. doi:10.1074/jbc.M107963200.
- Yang S, Kim H-M. ROCK inhibition activates MCF-7 cells. *PLoS ONE* 2014;9:e88489. doi:10.1371/journal.pone.0088489.
- Yang X-Q, Xu Y-F, Guo S, Liu Y, Ning S-L, Lu X-F, et al. Clinical significance of nerve growth factor and tropomyosin-receptor-kinase signaling pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2014;20:4076–84. doi:10.3748/wjg.v20.i14.4076.
- Yano H, Chao MV. Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm Acta Helv* 2000;74:253–60.
- Yardley DA, Ismail-Khan RR, Melichar B, Lichinitser M, Munster PN, Klein PM, et al. Randomized Phase II, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Exemestane With or Without Entinostat in Postmenopausal Women With Locally Recurrent or Metastatic Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Progressing on Treatment With a Nonsteroidal Aromatase Inhibitor. *JCO* 2013;31:2128–35. doi:10.1200/JCO.2012.43.7251.
- Yardley DA, Weaver R, Melisko ME, Saleh MN, Arena FP, Forero A, et al. EMERGE: A Randomized Phase II Study of the Antibody-Drug Conjugate Glembatumumab Vedotin in Advanced Glycoprotein NMB-Expressing Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2015;33:1609–19. doi:10.1200/JCO.2014.56.2959.
- Ye H, Kuruvilla R, Zweifel LS, Ginty DD. Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron* 2003;39:57–68.
- Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, Shin H, et al. TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* 1999;274:30202–8.
- Yeaman C, Gall AHL, Baldwin AN, Monlauzeur L, Bivic AL, Rodriguez-Boulan E. The O-glycosylated Stalk Domain Is Required for Apical Sorting of Neurotrophin Receptors in Polarized MDCK Cells. *The Journal of Cell Biology* 1997;139:929–40. doi:10.1083/jcb.139.4.929.
- Yeh J-F, Akinci A, Al Shaker M, Chang MH, Danilov A, Guillen R, et al. Monoclonal antibodies for chronic pain: A practical review of mechanisms and clinical applications. *Mol Pain* 2017;13. doi:10.1177/1744806917740233.
- Yoon SO, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chao MV. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 1998;18:3273–81.

BIBLIOGRAPHIE

Yu T, Calvo L, Anta B, López-Benito S, Southon E, Chao MV, et al. Regulation of trafficking of activated TrkA is critical for NGF-mediated functions. *Traffic* 2011;12:521–34. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01156.x.

Yu W-H, Woessner JF, McNeish JD, Stamenkovic I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev* 2002;16:307–23. doi:10.1101/gad.925702.

Yue W, Yager JD, Wang J-P, Jupe ER, Santen RJ. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids* 2013;78:161–70. doi:10.1016/j.steroids.2012.11.001.

Zaccaro MC, Ivanisevic L, Perez P, Meakin SO, Saragovi HU. p75 Co-receptors regulate ligand-dependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering Trk docking subdomains. *J Biol Chem* 2001;276:31023–9. doi:10.1074/jbc.M104630200.

Zagrebelsky M, Holz A, Dechant G, Barde Y-A, Bonhoeffer T, Korte M. The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2005;25:9989–99. doi:10.1523/JNEUROSCI.2492-05.2005.

Zaha DC. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World J Clin Oncol* 2014;5:382–92. doi:10.5306/wjco.v5.i3.382.

Zampieri N, Xu C-F, Neubert TA, Chao MV. Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains. *J Biol Chem* 2005;280:14563–71. doi:10.1074/jbc.M412957200.

Zarogoulidis P, Lampaki S, Turner JF, Huang H, Kakolyris S, Syrigos K, et al. mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review (Review). *Oncol Lett* 2014;8:2367–70. doi:10.3892/ol.2014.2608.

Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, Irizarry AR, Kinch MS. EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2001;61:2301–6.

Zeng Z, Liu H, Jiang D. [NRH2 induces cell apoptosis of cerebral tissues around hematomas after intracerebral hemorrhage through up-regulating proNGF, sortilin and p75NTR expressions]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2015;31:532–6, 539.

Zhang C, Zhang S, Zhang Z, He J, Xu Y, Liu S. ROCK has a crucial role in regulating prostate tumor growth through interaction with c-Myc. *Oncogene* 2014;33:5582–91. doi:10.1038/onc.2013.505.

Zhang H-Y, Liang F, Jia Z-L, Song S-T, Jiang Z-F. PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients. *Oncol Lett* 2013;6:161–8. doi:10.3892/ol.2013.1331.

Zhang J, Wang L-S, Ye S-L, Luo P, Wang B-L. Blockage of tropomyosin receptor kinase a (TrkA) enhances chemo-sensitivity in breast cancer cells and inhibits metastasis in vivo. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:634–41.

BIBLIOGRAPHIE

Zhang L, Luo J, Wan P, Wu J, Laski F, Chen J. Regulation of cofilin phosphorylation and asymmetry in collective cell migration during morphogenesis. *Development* 2011;138:455–64. doi:10.1242/dev.046870.

Zhang M, Lee AV, Rosen JM. The Cellular Origin and Evolution of Breast Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2017;7. doi:10.1101/cshperspect.a027128.

Zhao C-M, Hayakawa Y, Kodama Y, Muthupalani S, Westphalen CB, Andersen GT, et al. Denervation suppresses gastric tumorigenesis. *Sci Transl Med* 2014;6:250ra115. doi:10.1126/scitranslmed.3009569.

Zhao Q-Y, Lei P-J, Zhang X, Zheng J-Y, Wang H-Y, Zhao J, et al. Global histone modification profiling reveals the epigenomic dynamics during malignant transformation in a four-stage breast cancer model. *Clin Epigenetics* 2016;8:34. doi:10.1186/s13148-016-0201-x.

Zhao W, Luo J, Jiao S. Comprehensive characterization of cancer subtype associated long non-coding RNAs and their clinical implications. *Sci Rep* 2014;4:6591. doi:10.1038/srep06591.

Zhu W, Zhou L, Qian J-Q, Qiu T-Z, Shu Y-Q, Liu P. Temozolomide for treatment of brain metastases: A review of 21 clinical trials. *World J Clin Oncol* 2014;5:19–27. doi:10.5306/wjco.v5.i1.19.

Zolfaroli I, Tarín JJ, Cano A. The action of estrogens and progestogens in the young female breast. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2018. doi:10.1016/j.ejogrb.2018.03.057.