

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Science - Technologie - Santé, 258

Faculté des Sciences

Equipe Accueil n° 3842 "Homéostasie Cellulaire et Pathologies"

Faculté de Médecine

Année : 2005

Thèse N°

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Neurosciences, Cancérologie

présentée et soutenue publiquement par

Stéphanie GIRAUD

Le 30 Septembre 2005

**ETUDE DE L'ACTIVATION DE RECEPTEURS DE
MORT DANS LES LIGNEES NEURONALES ET
GLIALES HUMAINES**

Thèse dirigée par : Pr. Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN

Jury :

Pr MH. RATINAUD (Université de Limoges)

PRESIDENT

Pr I. CREVEAUX (Université de Clermont-Ferrand I)

RAPPORTEUR

Dr M. SANSON (Université de Paris VI)

RAPPORTEUR

Dr M. MATHONNET (Université de Limoges)

EXAMINATEUR

Pr F. STURTZ (Université de Limoges)

EXAMINATEUR

Remerciements

Nous exprimons toute notre reconnaissance au professeur Marie-Odile Jauberteau-Marchan qui est à l'origine et a dirigé cette étude. Ses compétences scientifiques nous ont permis de mener à bien ce travail. Nos remerciements lui sont adressés.

Nous sommes très sensibles à l'honneur que nous fait le Professeur Isabelle Creveaux en acceptant de juger ce travail et nous lui exprimons toute notre reconnaissance et notre profond respect.

Nous exprimons tous nos remerciements au Docteur Marc Sanson qui nous fait l'honneur de juger ce travail et nous lui témoignons toute notre reconnaissance et notre profond respect.

Nous remercions sincèrement le Professeur Marie-Hélène Ratinaud qui nous fait l'honneur de présider ce jury. Nous lui exprimons notre profond respect.

Tous nos remerciements sont adressés au Docteur Muriel Mathonnet qui a accepté d'être membre de ce jury. Nous lui témoignons toute notre reconnaissance.

Nous remercions vivement le Professeur Franck Sturtz d'avoir accepté de participer à ce jury. Nous lui témoignons toute notre reconnaissance.

Je remercie vivement la société Diaclone de m'avoir fourni gracieusement les anticorps nécessaires à cette étude. Mes remerciements s'adressent plus particulièrement à M. J. Widjenes et à Mme C. Vermot-Desroches qui ont toujours soutenu ces travaux. J'espère sincèrement que les publications issues de ces études contribueront à mieux faire connaître l'excellence de leurs réactifs.

Je remercie aussi tout particulièrement le Conseil Régional du Limousin ainsi que le Fond Social Européen pour leur soutien financier au cours de cette étude.

Je remercie aussi vivement l'école doctorale Science - Technologie - Santé, toujours à l'écoute de nos problèmes, et dont les formations ont été très enrichissantes, ainsi que Jean-Claude Vareille, A.C. Movahhedi et Mlle Gaëlle Peyrat.

Je remercie Françoise Esclaire et Catherine Yardin d'avoir pris de leur temps pour réaliser des tests de cytogénétique sur les lignées cellulaires utilisées dans ce manuscrit, mais aussi Fred Ramade, Olivier Decourt et Daniel Petit.

Toutes mes pensées pour Madame Ayer-Lelièvre. Je n'aurai probablement pas réalisé ma thèse à Limoges sans elle. Je la remercie pour tout.

Résumé

Ces travaux ont été consacrés à l'étude de récepteurs de la superfamille des TNF-R et de signaux impliqués dans la mort et/ou la survie cellulaire dans les lignées humaines neuroblastique SH-SY5Y et gliale U87-MG. Les neuroblastomes et glioblastomes correspondent à des tumeurs, à haut pouvoir tumorigène, issues de cellules du système nerveux dont le pronostic est grêvé par la résistance aux traitements classiques de chimiothérapie. Dans un premier temps, une étude des récepteurs pro-apoptotiques p75^{NTR} et Fas a mis en évidence leur étroite interaction dans les cellules SH-SY5Y, l'activation simultanée de ces deux récepteurs conduisant à une protection cellulaire contre l'apoptose. Par la suite, l'étude *in vitro* de la lignée U87-MG a permis de déterminer les concentrations optimales de FasL et d'étoposide aboutissant à un taux élevé d'apoptose et à une suppression de la prolifération cellulaire. Ces résultats ont alors abouti à la mise au point d'un modèle *in vivo* de xéno greffes dans des cerveaux de rats immunodéprimés. Ainsi, les greffes de cellules U87-MG chez les animaux ont permis d'obtenir des tumeurs cérébrales, lesquelles ont régressé significativement, à la suite d'un traitement avec FasL et étoposide. De plus, l'association d'une troisième molécule, un corticoïde (la dexaméthasone), a encore amélioré la régression tumorale. Au regard de ces résultats, des études complémentaires ont été entreprises afin d'optimiser les modèles de recherche thérapeutique anti-tumorale pouvant être envisagés. Ainsi, les cellules U87-MG, très hétérogènes, ont été triées par SdFFF dans le but d'une caractérisation fine quant au pouvoir tumorigène et à la nature des récepteurs exprimés sur chaque sous-population cellulaire. De plus, l'expression des récepteurs pro-apoptotiques TRAIL-R a également été recherchée dans chacune des deux lignées, et des inductions d'apoptose par le ligand TRAIL ont été initiées *in vitro*. Les résultats obtenus permettent d'envisager un passage au modèle *in vivo* afin de valider l'effet anti-tumoral de TRAIL. Enfin, une étude de la séquestration cellulaire du récepteur pro-apoptotique p75^{NTR} au niveau de l'appareil de Golgi a été réalisée sur la lignée cellulaire U-87 MG. En effet, la séquestration du récepteur expliquerait la résistance des cellules à la mort cellulaire. Par conséquent, la mise en évidence et la compréhension d'un tel phénomène ouvriraient de nouvelles perspectives pour des traitements anti-tumoraux.

Mots-clé : apoptose, Fas, p75^{NTR}, TRAIL-R, neuroblastomes, glioblastomes, tumeurs

Abstract

This work was related to the study of several members of the TNF-Receptors superfamily and of the signalling pathways leading to cellular death or survival, both in the neuroblastoma SH-SY5Y and glioma U87-MG human cells. Neuroblastomas and glioblastomas correspond to highly aggressive tumors of the nervous system, which are often resistant to classical chemotherapy treatments. First, the study of two pro-apoptotic receptors, namely p75^{NTR} and Fas, pointed out their close interactions and showed that a simultaneous activation of these two receptors led to a cellular protection against apoptosis. Then, an *in vitro* study allowed us to optimise FasL and etoposide concentrations leading both to a high apoptosis and a weak proliferation rate in the U87-MG cell line. The results could then be used after the development of an *in vivo* model of xenografted cells in immunodeficient rat brain. Thus, xenografts of U87-MG cells in rat brains led to cerebral tumor formation, that significantly regressed upon treatment with FasL and etoposide. Furthermore, tumor regression was even more marked by the concomitant administration of a corticoïd, the dexamethasone. Considering all these data, complementary studies were initiated such as to improve the anti-tumoral treatments. For instance, the highly heterogeneous U87-MG cell line was separated by SdFFF in order to determine precisely both the tumorigenicity and the expressed receptors for each cellular sub-population. Furthermore, the TRAIL receptors expression was looked for on both cell lines and experiments of apoptosis induction by TRAIL ligand were conducted *in vitro*. The results encouraged us to switch to the *in vivo* model to validate the anti-tumoral character of TRAIL. Last, a study of the pro-apoptotic p75^{NTR} retention in the Golgi apparatus was initiated in U-87 MG cell lines. Actually, such an intracellular retention of the receptor could be responsible for the high resistance of the cells to death. Therefore, both the demonstration and the comprehension of this retention phenomenon would be helpful to elaborate new anti-tumoral treatments.

Keywords : apoptosis, Fas, p75^{NTR}, TRAIL-R, neuroblastoma, glioblastoma, tumor

Table des matières

ABRÉVIATIONS	
INTRODUCTION	1
BIBLIOGRAPHIE	4
I - GENERALITES SUR L'APOPTOSE	4
II - MECANISMES DE L'APOPTOSE	5
II.1 - EFFECTEURS DE L'APOPTOSE	5
II.1.A - Rôle des caspases.....	6
- Structure des caspases.....	6
- Mécanisme d'action des caspases	7
II.1.B - Rôle mitochondrial.....	8
II.2 - LES RECEPTEURS DE MORT CELLULAIRE	9
III - LE RECEPTEUR P75^{NTR}	12
III.1 - STRUCTURE DE LA PROTEINE	13
III.1.A - Partie extra-cellulaire.....	14
III.1.B - Partie intra-cellulaire.....	14
III.1.C - Les protéines isoformes	15
III.2 - LES LIGANDS DU RECEPTEUR P75 ^{NTR}	16
III.3 - LES VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR LE RECEPTEUR P75 ^{NTR}	18
III.3.A - Les voies apoptotiques	19
III.3.A.a - P75 ^{NTR} peut agir indépendamment de la fixation d'un ligand	20
III.3.A.b - P75 ^{NTR} peut induire la mort cellulaire de façon ligand-dépendante.....	21
III.3.A.c - La voie des caspases	21
III.3.A.d - La phosphorylation des JUN kinases.....	22
III.3.A.e - Activation des molécules régulatrices du cycle cellulaire.....	24
III.3.A.f - Activation de la protéine p53	25
III.3.B - Les voies aboutissant à la survie ou à la différenciation cellulaire.....	25
III.3.B.a - Translocation nucléaire de NF- κ B	26
III.3.B.b - La voie de la Phosphoinositide-3 kinase (PI-3 kinase)	27
III.3.B.c - Production de céramides	28
III.3.C - Les molécules associées au récepteur p75 ^{NTR}	28
III.3.D - P75 ^{NTR} et les radeaux lipidiques (Raft)	32
III.4 - LES ROLES DU RECEPTEUR P75 ^{NTR}	33

III.5 - INTERACTION AVEC LES RECEPTEURS TRK.....	34
III.5.A - Formation de sites de haute affinité pour les NT.....	35
III.5.B - Effet de la co-expression des récepteurs p75 ^{NTR} et Trk sur les voies de signalisation.....	37
IV - LES RECEPTEURS A ACTIVITE TYROSINE KINASE TRK	38
IV.1 - STRUCTURE DES RECEPTEURS TRK	39
IV.2 - LES VOIES DE SIGNALISATION.....	41
IV.3 - FONCTIONS DES RECEPTEURS TRK.....	43
V - LE RECEPTEUR FAS	44
V.1 - STRUCTURE DE LA PROTEINE FAS	44
V.1.A - Partie extra-cellulaire	44
V.1.B - Partie intra-cellulaire.....	45
V.2 - VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR LE RECEPTEUR FAS	46
V.2.A - Initiation du signal	46
V.2.B - Transduction du signal.....	46
V.2.B.a - Voies apoptotiques.....	46
- Rôle de la voie mitochondriale : cellules de type I et de type II.....	48
V.2.B.b - Voie proliférative.....	50
V.2.C - Régulateurs de la transduction du signal de Fas	52
V.2.C.a - Fas et NF- κ B.....	52
V.2.C.b - Fas et les protéines kinases activées par la mitose	53
V.2.C.c - Fas et Protéine Kinase C	54
V.2.C.d - Sphingomyélinases, céramides, et regroupements membranaires du récepteur Fas.....	54
V.3 - ROLES PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE	55
V.3.A - Rôle dans le système immunitaire	55
V.3.A.a - Régulation des populations lymphocytaires.....	55
V.3.A.b - Elimination des cellules pathogènes.....	56
V.3.B - Fas et système nerveux	57
V.3.B.a - Fas et neurones.....	57
V.3.B.b - Fas et cellules gliales	58
VI - TRAIL-R.....	59
VI.1 - STRUCTURE DES RECEPTEURS DE TRAIL	59
VI.2 - LE LIGAND TRAIL	60
VI.3 - VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR LES RECEPTEURS TRAIL	60
VI.4 - ROLES PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE	63
VII - NEUROBLASTOMES ET GLIOBLASTOMES.....	65
VII.1 - LES NEUROBLASTOMES	65
VII.1 - LES GLIOBLASTOMES	67

VIII - OBJECTIF DES TRAVAUX	69
MATERIELS ET METHODES	71
I - CULTURES CELLULAIRES	71
I.1 - LIGNEE NEUROBLASTIQUE SH-SY5Y.....	71
I.2 - LIGNEE GLIALE U-87 MG	71
I.3 - CONDITIONS DE CULTURE.....	72
I.4 - ENSEMENCEMENT DES CELLULES	72
I.5 - CONDITIONS DE STIMULATION DES CELLULES	73
II - MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE DE TRANSCRITS CODANT LES RECEPTEURS.....	74
II.1 - EXTRACTION D'ARN TOTAUX	74
II.2 - SYNTHÈSE D'ADN COMPLEMENTAIRE (TRANSCRIPTION INVERSE : RT)	75
II.2.A - Selon le protocole de Superscript™ II RNase H Reverse transcriptase.....	76
II.2.B - Selon le protocole AMV reverse transcriptase.....	76
II.3 - AMPLIFICATION DE L'ADNc PAR REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (PCR)	76
II.4 - ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE	79
II.5 - CLONAGE	79
II.6 - TRANSFORMATION DE BACTERIES THERMOCOMPETENTES PAR LES PLASMIDES	80
II.7 - MISE EN CULTURE DE BACTERIES TRANSFORMEES PAR UN PLASMIDE	81
II.8 - PURIFICATION DES PLASMIDES AMPLIFIES	82
II.9 - DIGESTION ENZYMATIQUE DES PLASMIDES PURIFIES.....	82
II.10 - SEQUENÇAGE DE L'ADN	83
III - ETUDE DES VARIATIONS D'EXPRESSION D'ARN PAR LA TECHNIQUE DE NORTHERN-BLOT	84
III.1 - SEPARATION DES ARN PAR ELECTROPHORESE.....	84
III.2 - TRANSFERT DES ARN SEPRES PAR ELECTROPHORESE SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE	85
III.3 - SYNTHÈSE DE LA SONDE RADIOACTIVE.....	86
III.3.A - "Random priming"	86
III.3.B - Purification de la sonde.....	86
III.4 - HYBRIDATION DES MEMBRANES	87
III.5 - LAVAGES DES MEMBRANES ET REVELATION	87
IV - DETECTION DE PROTEINES PAR LA METHODE DE WESTERN-BLOTTING	88
IV.1 - PREPARATION DES PROTEINES	88
IV.1.A - Lysat cellulaire total	88
IV.1.B - Dosage de la concentration protéique	88
IV.2 - SEPARATION DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE	89

IV.3 - TRANSFERT SUR MEMBRANE DES PROTEINES.....	89
IV.4 - DETECTION DES PROTEINES D'INTERETS GRACE A DES ANTICORPS SPECIFIQUES	90
V - DETECTION DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	92
VI - ETUDE IMMUNOCYTOCHIMIQUE PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE	94
VII - ANALYSE DE LA POLARISATION DES RECEPTEURS	98
VIII - IMMUNOPURIFICATION DES PROTEINES FAS ET P75^{NTR}	99
VIII.1 - PREPARATION DES COLONNES D'IMMUNOPURIFICATION.....	99
VIII.2 - PURIFICATION DES PROTEINES	99
IX - DETECTION DE L'APOPTOSE	100
IX.1 - MISE EN EVIDENCE DE LA MORT CELLULAIRE GRACE AU DAPI.....	100
IX.2 - MISE EN EVIDENCE DE L'APOPTOSE PAR LA METHODE TUNEL	101
IX.3 - DETECTION DE LA LIBERATION DES NUCLEOSOMES SOLUBLES PAR ELISA	101
X - ANALYSE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE.....	102
X.1 - DETECTION DE LA PROLIFERATION DES CELLULES PAR DOSAGE DE L'ACTIVITE CELLULAIRE	102
X.2 - DETECTION DE LA PROLIFERATION DES CELLULES PAR INCORPORATION DE BRDU	103
XI - XENOGREFFES DE CELLULES	104
XI.1 - DETERMINATION DE LA ZONE DE GREFFE DES CELLULES	104
XI.2 - ANESTHESIE DES RATS.....	106
XI.3 - PREPARATION DES CELLULES	106
XI.4 - PROTOCOLE DE GREFFES DES CELLULES	107
XI.5 - TRAITEMENT DE LA TUMEUR PAR PERFUSION CORTICALE CHRONIQUE	108
<i>XI.5.A - Principe de la pompe</i>	<i>109</i>
<i>XI.5.B - Préparation de la pompe osmotique</i>	<i>110</i>
<i>XI.5.C - Implantation de la pompe osmotique.....</i>	<i>111</i>
XI.6 - SUIVI CLINIQUE	111
XII - ETUDES IMMUNOHISTOCHIMIQUES PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE	112
XIII - SEPARATION DES CELLULES PAR LA TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX - FORCE DE SEDIMENTATION (SDFFF)	114
XIII.1 - PRINCIPE DE LA SdFFF	114
XIII.2 - PREPARATION DES CELLULES.....	114
XIV - ANALYSES STATISTIQUES	115
RESULTATS.....	116

I - LE RECEPTEUR P75^{NTR} MODULE L' APOPTOSE INDUITE PAR LE RECEPTEUR FAS DANS LA LIGNEE NEUROBLASTIQUE SH-SY5Y	116
I.1 - LES RECEPTEURS FAS ET P75 ^{NTR} SONT EXPRIMES DANS LES CELLULES NEUROBLASTIQUES SH-SY5Y ...	116
I.2 - LE RECEPTEUR TrkB N' EST PAS DETECTE DANS LA LIGNEE NEUROBLASTIQUE.....	118
I.3 - L' ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATION DES RECEPTEURS FAS ET P75 ^{NTR} NE MODIFIE PAS L' EXPRESSION DU RECEPTEUR P75 ^{NTR}	119
I.4 - L' ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATION DES RECEPTEURS FAS ET P75 ^{NTR} PROVOQUE LA POLARISATION DE CES DEUX RECEPTEURS.....	121
I.5 - LES RECEPTEURS FAS ET P75 ^{NTR} SONT LIES	122
I.6 - ANALYSE DU TAUX D' APOPTOSE DES NEUROBLASTES DANS DIFFERENTES CONDITIONS D' ACTIVATIONS	124
II - L' EFFET PRO-APOPTOTIQUE DE FASL EST INHIBE PAR LE NGF DANS LES CELLULES SH-SY5Y ET U-87 MG	128
II.1 - LES DEUX LIGNEES CELLULAIRES EXPRIMENT LE RECEPTEUR TrkA A LEUR SURFACE	128
II.2 - ANALYSE DU TAUX D' APOPTOSE CELLULAIRE EN PRESENCE DE FASL, NGF, IC8 ET MA	129
III - LA COMBINAISON DE FASL, ETOPOSIDE ET DEXAMETHASONE EMPECHE LE DEVELOPPEMENT DE TUMEURS GLIALES <i>IN VIVO</i>	131
III.1 - CARACTERISATION DES CELLULES U-87 MG	131
III.2 - LE RECEPTEUR FAS EST EXPRIME A LA SURFACE DES CELLULES U-87 MG, MEME APRES EXPOSITION A DU FASL ET DE L' ETOPOSIDE.....	132
III.3 - LES CELLULES U-87 MG ENTRENT EN APOPTOSE EN PRESENCE DE FASL ET D' ETOPOSIDE	134
III.4 - FASL ET ETOPOSIDE DIMINUENT LA PROLIFERATION DES CELLULES GLIALES.....	137
III.5 - VERIFICATION DES COORDONNEES DE STEREOTAXIE	139
III.6 - LES XENOGREFFES DE CELLULES U-87 MG ABOUTISSENT A LA FORMATION D' UNE TUMEUR	140
III.7 - LES INJECTIONS DE LCR N' ONT AUCUN EFFET SUR DES RATS IMMUNODEPRIMES.....	143
III.8 - L' ASSOCIATION DE FASL ET DE L' ETOPOSIDE A UN EFFET ANTI-TUMORAL	144
III.9 - LA DEXAMETHASONE AUGMENTE L' EFFET ANTI-TUMORAL DE FASL ASSOCIE A L' ETOPOSIDE	145
IV - SEPARATION DES CELLULES U-87 MG SELON LA METHODE DE FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX FORCE (SDFFF)	146
IV.1 - OBSERVATION EN MICROSCOPIE INVERSEE DES CULTURES DE LA LIGNEE GLIALE U-87 MG	146
IV.2 - OBSERVATION DES CELLULES APRES TRI PAR SdFFF	146
V - ETUDE DE L' EXPRESSION DES RECEPTEURS DE TRAIL DANS LES LIGNEES CELLULAIRES SH-SY5Y ET U-87 MG	150
V.1 - RECHERCHE DES TRANSCRITS DES TRAIL-R.....	150
V.2 - RECHERCHE DES PROTEINES TRAIL-R SELON DIFFERENTES TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES	151
V.2.A - Détection par Western-blotting	151
V.2.B - Détection par immunofluorescence indirecte.....	151

V.2.C - Détection par cytométrie en flux.....	152
V.3 - ANALYSE DE L'EFFET APOPTOTIQUE DE TRAIL DANS LES DEUX TYPES DE LIGNEES CELLULAIRES.....	153
VI - LE RECEPTEUR P75^{NTR} EST SEQUESTRE DANS L'APPAREIL DE GOLGI DES CELLULES U-87 MG.....	155
VI.1 - EXPRESSION LOCALISEE DANS L'APPAREIL DE GOLGI DU RECEPTEUR P75 ^{NTR}	155
VI.2 - ETUDE DE LA PROTEINE P75 ^{NTR} PAR WESTERN-BLOTTING.....	158
VI.3 - EFFET DES LIGANDS DU RECEPTEUR P75 ^{NTR} SUR SON EXPRESSION A LA SURFACE DES CELLULES.....	160
VI.4 - L'ACTIVATION DU RECEPTEUR P75 ^{NTR} NE MODIFIE PAS LE TAUX D'APOPTOSE DES CELLULES.....	162
DISCUSSION.....	164
I - LE RECEPTEUR P75^{NTR} MODULE L'APOPTOSE INDUITE PAR LE RECEPTEUR FAS DANS LA LIGNEE NEUROBLASTIQUE SH-SY5Y.....	164
II - L'EFFET PRO-APOPTOTIQUE DE FASL EST INHIBE PAR LE NGF DANS LES CELLULES SH-SY5Y ET U-87 MG.....	170
III - LA COMBINAISON DE FASL, ETOPOSIDE ET DEXAMETHASONE EMPECHE LE DEVELOPPEMENT DE TUMEURS GLIALES <i>IN VIVO</i>.....	173
IV - SEPARATION DES CELLULES U-87 MG SELON LA METHODE DE FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX FORCE (SD FFF).....	177
V - ETUDE DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS DE TRAIL DANS LES LIGNEES CELLULAIRES SH-SY5Y ET U-87 MG.....	180
VI - LE RECEPTEUR P75^{NTR} EST SEQUESTRE DANS L'APPAREIL DE GOLGI DES CELLULES U-87 MG.....	183
BIBLIOGRAPHIE.....	188
ANNEXES.....	245

Liste des tableaux

Tableau 1. Nomenclature des récepteurs et des ligands de la superfamille du TNF (Kwon et al., 1999).....	10
Tableau 2. Bibliographie concernant l'effet pro-apoptotique du récepteur p75 ^{NTR} (Roux et Barker, 2002).....	19
Tableau 3. Le récepteur 75 ^{NTR} peut activer des voies de signalisation de façon ligand-dépendante ou indépendante (Casaccia-Bonnet et al., 1999).	20
Tableau 4. Liste des molécules déposées sur les cellules.	74
Tableau 5. Tableau récapitulatif des informations concernant les amorces utilisées lors des réactions de PCR.	78
Tableau 6. Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés en Western-blot.....	91
Tableau 7. Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux.....	94
Tableau 8. Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence.	96
Tableau 9. Liste des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte.....	97
Tableau 10. Liste des anticorps primaires utilisés en immunohistofluorescence.	113
Tableau 11. Analyse statistique des résultats obtenus lors de l'étude des variations de l'index apoptotique des cellules U-87 MG mises en présence de FasL à des concentrations croissantes, associées ou non à de l'étoposide (10 µg/mL).	136

Liste des figures

Figure 1. Voies de signalisation apoptotique des récepteurs de mort et de leurs ligands (Ashkenazi et Dixit, 1999).	11
Figure 2. Représentation schématique de la structure du récepteur p75 ^{NTR} (Roux et Barker, 2002).....	13
Figure 3. Schéma représentatif des différentes isoformes du récepteur p75 ^{NTR} (Roux et Barker, 2002).....	15
Figure 4. Caspases activées par le récepteur p75 ^{NTR} (d'après Casaccia-Bonnet et al., 1999).	22
Figure 5. Voie des JNK activée par le récepteur p75 ^{NTR} (d'après Kaplan et Miller, 2000).	24
Figure 6. Implication du récepteur p75 ^{NTR} dans la voie des CDK (d'après Kaplan et Miller, 2000).....	25
Figure 7. Activation du facteur de transcription NF- κ B (d'après Ghosh et al., 1998 ; Baeuerle, 1998).....	27
Figure 8. Voie de signalisation de la PI3-K et de Akt.....	28
Figure 9. Schéma d'interaction des molécules adaptatrices avec le récepteur p75 ^{NTR} (Roux et Barker, 2002).....	29
Figure 10. Les radeaux lipidiques (Rafts, d'après Lucero et Robbins, 2004).	32
Figure 11. Hypothèses d'influence du récepteur p75 ^{NTR} sur l'activation des récepteurs Trk (Chao et Hempstead, 1995).	36
Figure 12. Représentation schématique de la structure des récepteurs Trk (Casaccia-Bonnet et al., 1999).....	39
Figure 13. Représentation schématique des différentes isoformes des récepteurs Trk (Roux et Barker, 2002).....	40
Figure 14. Schéma représentant les différentes voies de signalisation activées par les récepteurs Trk (Patapoutian et Reichardt, 2001).....	41
Figure 15. Composition du récepteur Fas (d'après Lambert et al., 2003).	45
Figure 16. Modélisation du signal initial de l'activation de la voie Fas (Algeciras-Schimmich et al., 2002).....	48
Figure 17. Voies d'activation de Fas dans les cellules de type I ou de type II (Couzinet et al., 2002).....	50

Figure 18. Elimination des cellules pathogènes par les lymphocytes T CD8+ (Bobe, 2002)..	57
Figure 19. Représentation schématique de la structure des 5 TRAIL-R (Kimberley et Screatton, 2004).....	60
Figure 20. Implication de PLAD dans la trimérisation des TRAIL-R (d'après Kimberley et Screatton, 2004).....	61
Figure 21. Schéma d'activation de la voie des caspases par les récepteurs de TRAIL (Kimberley et Screatton, 2004).	62
Figure 22. Voies de signalisation majeures activées par les récepteurs de TRAIL (Kimberley et Screatton, 2004).....	63
Figure 23. Carte de la composition du vecteur pGEM-T Easy Vector.	79
Figure 24. Carte de la composition du vecteur pCR II-TOPO.....	80
Figure 25. Schéma de la construction du système de transfert passif utilisé en Northern-blot.	85
Figure 26. Planche de l'atlas de Paxinos et Watson.....	105
Figure 27. Photo de l'appareil de stéréotaxie.....	107
Figure 28. Système d'injection des cellules lors des xéno greffes.	108
Figure 29. Structure des pompes osmotique Alzet.....	109
Figure 30. Coupe schématique des pompes osmotiques Alzet.	110
Figure 31. Ajustement de la profondeur des canules par des espaceurs.	110
Figure 32. Mise en évidence de l'expression du récepteur p75 ^{NTR} dans les cellules SH-SY5Y.	117
Figure 33. Détection de l'expression du récepteur Fas dans la lignée neuroblastique.	117
Figure 34. Analyse de l'expression du récepteur TrkB dans la lignée SH-SY5Y par la technique de cytométrie en flux.	118
Figure 35. Mise en évidence de l'absence d'expression du récepteur TrkB dans les cellules SH-SY5Y par la méthode de Western-blotting.....	119
Figure 36. Absence de variation de l'expression des transcrits du récepteur p75 ^{NTR} au niveau de cellules de neuroblastome stimulées par BDNF et FasL.....	120
Figure 37. Analyse de l'expression du récepteur p75 ^{NTR} au niveau de cellules SH-SY5Y par cytométrie en flux.....	121
Figure 38. FasL et BDNF induisent une polarisation des récepteurs Fas et p75 ^{NTR}	122
Figure 39. Les récepteurs p75 ^{NTR} et Fas sont co-localisés dans des cellules activées par des anticorps agonistes pendant 24 heures.	123

Figure 40. Les récepteurs p75 ^{NTR} et Fas sont co-immunoprécipités quelles que soient les conditions de culture des cellules SH-SY5Y.	124
Figure 41. Mise en évidence des variations des index apoptotiques des cellules neuroblastiques, traitées avec différentes molécules, par les méthodes DAPI et TUNEL.	125
Figure 42. Détection de l'expression des récepteurs TrkA dans les lignées neuroblastique et gliale par immunofluorescence indirecte et cytométrie en flux.	128
Figure 43. Etude des variations de l'apoptose des cellules SH-SY5Y, en présence de Fas, NGF, IC8 et MA, grâce à la méthode TUNEL.	129
Figure 44. Etude des variations de l'apoptose des cellules U-87 MG, en présence de Fas, NGF, IC8 et MA, grâce à la méthode ELISA.	130
Figure 45. Analyse immunocytochimique des marqueurs exprimés par les cellules U-87 MG.	132
Figure 46. Détection par Western-blotting de l'expression du récepteur Fas au niveau de cellules gliales à l'état basal ou après exposition à FasL et étoposide.....	133
Figure 47. Etude immunocytochimique de l'expression de Fas au niveau de la lignée gliale U-87 MG à l'état basal ou après exposition à FasL et étoposide.....	133
Figure 48. Etude des variations de l'index apoptotique des cellules U-87 MG par dosage des nucléosomes solubles.	135
Figure 49. Détermination par la technique TUNEL du pourcentage de cellules U-87 MG en apoptose après traitement par FasL et étoposide.....	137
Figure 50. Etude de la viabilité des cellules gliales après exposition à FasL et étoposide par analyse de la réduction du MTT.....	138
Figure 51. Analyse de la prolifération des cellules gliales, en présence de FasL et d'étoposide, par détection de l'incorporation du BrdU.	139
Figure 52. Vérification des coordonnées de stéréotaxie grâce à l'injection de bleu de méthylène.	140
Figure 53. Représentation graphique des différents jours d'euthanasie des rats.....	141
Figure 54. Coloration à l'hématoxyline de coupes des cerveaux de rats.....	141
Figure 55. Valeurs de la surface moyenne des tumeurs.....	142
Figure 56. Analyse des marqueurs cellulaires exprimés au niveau des tumeurs de cellules U-87 MG xénogreffées.....	143
Figure 57. Aspect microscopique des cellules de la lignée U-87 MG.	146

Figure 58. Analyse de la morphologie cellulaire et de l'expression des molécules Fas et N-CAM dans les fractions F1 et F2 des cellules U-87 MG triées par SdFFF.....	147
Figure 59. Analyse par cytométrie en flux des marquages Fas et N-CAM, sur les cellules triées en SdFFF.....	148
Figure 60. Analyse de la morphologie des cellules U-87 MG dans les fractions F1, F2 et F3.	149
Figure 61. Mise en évidence de la présence des transcrits des récepteurs de TRAIL dans les cellules SH-SY5Y.	150
Figure 62. Analyse de l'expression des TRAIL-R par Western-blotting (SDS-PAGE à 12 %).	151
Figure 63. Détection par immunofluorescence des TRAIL-R.	152
Figure 64. Analyse de l'expression des récepteurs de TRAIL au niveau de cellules U-87 MG par cytométrie en flux	152
Figure 65. Etude de l'induction d'apoptose des cellules SH-SY5Y par TRAIL seul, ou associé à un inhibiteur de la caspase-8 (IC8) ou à un inhibiteur général des caspases (PAN), par ELISA.....	153
Figure 66. Etude par la méthode ELISA de l'effet de TRAIL sur l'apoptose des cellules U-87 MG.	154
Figure 67. Etude immunocytochimique en double marquage de l'expression du récepteur p75 ^{NTR} au niveau de l'appareil de Golgi.....	155
Figure 68. Analyse de l'expression du récepteur p75 ^{NTR} des cellules U-87 MG par cytométrie en flux.....	156
Figure 69. Etude de la localisation du récepteur p75 ^{NTR} grâce à deux anticorps polyclonaux.	157
Figure 70. Immunomarquages de fibroblastes grâce à un anticorps spécifique de l'appareil de Golgi, un anticorps anti-mannosidase II.	157
Figure 71. Etude de l'effet des toxines golgiennes, BFA et NDGA, sur la localisation du récepteur p75 ^{NTR} (Anti-p75 ^{NTR} mAb) et de l'anticorps anti-mannosidase II (Anti-Golgi Ab) par immunofluorescence sur les cellules U-87 MG.....	158
Figure 72. Détection de la protéine p75 ^{NTR} dans des lysats de cellules U-87 MG par Western-blotting avec 3 anticorps anti-p75 ^{NTR} :.....	159
Figure 73. Immunomarquages du récepteur p75 ^{NTR} et de l'appareil de Golgi après stimulation des cellules par du NGF et du BDNF.....	160

Figure 74. Immunomarquage du récepteur p75 ^{NTR} au niveau des cellules U-87 MG traitées ou non avec du BDNF.	161
Figure 75. Recherche de l'expression du récepteur p75 ^{NTR} dans les radeaux lipidiques par immunofluorescence.	162
Figure 76. Etude du taux d'apoptose des cellules après exposition à un anticorps monoclonal anti-p75 ^{NTR} par les techniques ELISA apoptose et TUNEL.	163
Figure 77 : Schéma représentatif de la voie de signalisation activée par la co-stimulation des récepteurs Fas et p75 ^{NTR} dans les cellules SH-SY5Y.	168

Liste des annexes

Publication 1 - Expression of a functional Fas death receptor by human foetal motoneurons.	246
Publication 2 - Modulation of Fas-induced apoptosis by p75 neurotrophin receptor in a human neuroblastoma cell line.....	247
Publication 3 - <i>In vitro</i> apoptotic induction of human glioblastoma cells by Fas Ligand <i>plus</i> etoposide and <i>in vivo</i> antitumor activity of combined drugs in xenografted nude rats..	248
Publication 4 - P75 neurotrophin receptor is sequestered in Golgi apparatus of U-87 MG cell line.....	249

Abréviations

Ab :	anticorps.
Apaf :	"apoptosis activating factor"
ARMS :	"ankyrin-rich membrane spanning"
ASK-1 :	"apoptosis signal-regulating kinase-1"
A-SMAse :	sphingomyélinases acides
BAR :	"bifunctional apoptosis regulator"
BDNF :	"brain-derived neurotrophic factor"
BIR :	"baculovirus IAP repeats"
BrdU :	bromodeoxyuridine
BSA :	albumine sérique bovine
CARD :	"caspase recrutement domain"
Caspase :	"cysteinyl aspartate-specific proteinase"
CDK :	"cyclin-dependant kinases"
CRD :	"cystein-rich domain"
CREB :	"cyclic AMP response element binding protein"
CRIB :	"Cdc42/Rac1 interactive binding"
DAG :	diacylglycérol
DAPI :	4,6-diamidino-2-phénylindole
DD :	"death domain"
DED :	"death effector domain"
DISC :	"death inducing signaling complex"
ELISA :	"enzyme-linked immunosorbent assay"
ERK :	"extracellular signal-regulated kinases"
FADD :	"Fas associated death domain"
FAIM :	"Fas apoptosis inhibitor molecule"
FAP :	"Fas-associated phosphatase"
FasL :	Fas ligand
FITC :	isothiocyanate de fluorescéine
FLIP :	"FLICE inhibitory protein"
FRS :	"fibroblast growth factor receptor substrate"
Gab-1 :	"Grb-associated binder-1"
GFAP :	protéine gliale fibrillaire acide
GSK :	"glycogen synthase kinase"
HES :	hémateïne-éosine-safran
IAP :	protéine inhibitrice de l'apoptose

IC8 :	inhibiteur de caspase-8
ICE :	"interleukin-1 β converting enzyme"
IFN-γ :	interféron-gamma
Ig :	immunoglobuline
IL :	interleukine
IMF :	intensité moyenne de fluorescence
IP3 :	inositol triphosphate
IRS :	"insulin receptor substrate"
JNK :	kinase N-terminale c-Jun
LBD :	"ligand binding domain"
LCR :	liquide céphalo rachidien
MA :	manumycine A
MAGE :	"melanoma antigen gene"
MAPPK :	"mitogen-activated protein kinase"
MTT :	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NADE :	"p75 ^{NTR} -associated cell death executor"
NAIP :	protéine inhibitrice de l'apoptose neuronale
NB :	neuroblaste
NDGA :	acide nordihydroguaiaretique
NF :	neurofilament
NGF :	"nerve growth factor"
NGFR :	"nerve growth factor receptor"
NIAP :	protéine inhibitrice de l'apoptose neuronale
NIK :	"NF- κ B-inducing kinase"
NK :	"natural killer"
NRAGE :	"neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog"
NRIF :	"neurotrophin receptor interacting factor"
N-SMAse :	sphingomyélinases neutres
NT :	neurotrophine
OPG :	ostéoprotégérine
p75^{NTR} :	récepteur aux neurotrophines p75
PARP :	poly-ADP-ribose-polymérase
PE :	phycoérythrine
PBS :	tampon phosphate salin à pH 7,2
PCR :	réaction de polymérisation en chaîne
PDK-1 :	"3-phosphoinositide-dependent kinase-1"
PFA :	paraformaldéhyde
PI3-K :	phosphatidylinositol 3-kinase
PKC :	protéine kinase C

PLAD :	"pre-ligand association domain"
PLC :	phospholipase C
PPAR-γ :	"Peroxisome proliferator-activated receptor- γ "
PTPase :	protéine à activité tyrosine phosphatase
Rb :	retinoblastoma
RIP :	"receptor interacting protein"
RSK :	p90 ribosomal S6 kinase
RT :	transcription inverse
SAM :	"sterile-alpha motif"
SAPK :	"stress-activated protein kinase"
SdFFF :	technique de fractionnement par couplage flux - force de sédimentation
SDS-PAGE :	"sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"
SIMP :	"soluble inter membrane mitochondrial protein"
SNC :	système nerveux central
SOS :	"son of sevenless"
SVFd :	sérum de veau foetal décomplémenté
TA :	température ambiante
TCR :	récepteur des cellules T
TNF-R :	"tumor necrosis factor receptor"
TRADD :	"TNF receptor-associated death domain"
TRAF :	"TNF-R associated factors"
TRAIL-R:	"TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor"
Trk :	récepteurs à activité tyrosine kinase
TUNEL :	"TdT-mediated dUTP nick end labelling"
V/SVF :	versène/SVF
XIAP :	IAP liée au chromosome X

Introduction

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire programmée au cours duquel des mécanismes complexes sont activés pour aboutir à la destruction de la cellule. Ce "suicide cellulaire" est un événement clé en biologie car il intervient dans l'équilibre entre prolifération et dégénérescence cellulaire des organismes pluricellulaires, c'est à dire le maintien de leur homéostasie. De plus, l'apoptose est un mécanisme "silencieux" pour l'organisme. Il permet donc la régulation des populations cellulaires tout en respectant l'intégrité de l'organisme.

L'apoptose survient naturellement au cours de l'embryogenèse, du renouvellement tissulaire et du vieillissement mais peut également se produire dans diverses conditions pathologiques. En effet, un dysfonctionnement des mécanismes régulateurs de l'apoptose va avoir des conséquences pathologiques. Ainsi, un défaut d'apoptose va entraîner des syndromes prolifératifs et des transformations tumorales, tout particulièrement au niveau des cellules à renouvellement rapide comme celles du système immunitaire (lymphome, leucémie) (Bai et al., 2005). A l'inverse, une activation anormale va aboutir à un phénomène de dégénérescence qui est responsable de la survenue de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la sclérose latérale amyotrophique (Honig et Rosenberg, 2000).

Parmi les molécules impliquées dans l'activation du processus apoptotique, les membres de la superfamille des récepteurs au TNF/NGF ("tumor necrosis factor/nerve growth factor") sont fréquemment étudiés. Parmi ceux-ci, il est possible de citer le récepteur Fas (Apo 1 ou CD95), le récepteur de faible affinité des neurotrophines (p75^{NTR}), ou les récepteurs de TRAIL ("TNF-related apoptosis-inducing ligand")/Apo2L. Tous sont des récepteurs transmembranaires qui possèdent un domaine de mort intra-cytoplasmique. L'activation des récepteurs par leurs ligands respectifs permet le recrutement de molécules adaptatrices qui aboutit à l'apoptose, la prolifération ou la différenciation des cellules, selon les voies de signalisations empruntées.

Le récepteur p75^{NTR} est un récepteur de type I appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF/NGF. Quatre neurotrophines (NT) peuvent se lier avec la même affinité sur ce récepteur. Ce sont le NGF, le BDNF ("brain-derived neurotrophic factor") et les NT-3 et -4. L'activation du récepteur déclenche différentes cascades de signalisation, comme par exemple la voie des caspases, la voie des céramides ou encore la voie du facteur nucléaire NF-κB, et peut ainsi aboutir à la survie, à la différenciation ou à l'apoptose cellulaire.

Fas, comme le récepteur p75^{NTR}, est un récepteur appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF/NGF. La fixation de son ligand naturel (FasL), ou d'un anticorps anti-Fas agoniste, permet son oligomérisation et entraîne le recrutement et l'activation de la caspase-8 grâce à la protéine adaptatrice FADD ("Fas associated death domain"). La caspase-8 va à son tour activer la caspase-3, soit directement par clivage, soit en activant la voie apoptotique mitochondriale. La caspase-3, véritable caspase exécutrice de l'apoptose, va permettre l'activation des molécules effectrices de l'apoptose. Le récepteur Fas joue un rôle crucial au niveau du système immunitaire, est impliqué dans l'élimination des cellules infectées par des virus ou des parasites et intervient au cours de pathologies neurodégénératives telles que l'ischémie ou la maladie d'Alzheimer (Ethell et Buhler, 2003). Du fait de son action pro-apoptotique, la dérégulation des voies de signalisation du récepteur Fas est fortement impliquée dans la formation de tumeurs. Ainsi, l'étude du récepteur Fas, la modulation de son expression et de son activation jouent un rôle clé dans la formation ou au contraire l'élimination des tumeurs.

Il existe quatre types de récepteurs TRAIL qui diffèrent par leur structure et leur capacité à induire des voies de signalisation. De nombreuses similitudes existent entre les récepteurs de TRAIL et Fas. En effet, les récepteurs de TRAIL non tronqués ont un effet plutôt pro-apoptotique et empruntent les mêmes voies de signalisation que le récepteur Fas. Ils appartiennent également à la superfamille des récepteurs au TNF et peuvent activer les voies de signalisation après fixation d'un trimère de TRAIL (Mongkolsapaya et al., 1999). Ces récepteurs semblent d'autant plus intéressants qu'ils ne sont généralement exprimés qu'au niveau de cellules pathologiques et notamment au niveau de cellules cancéreuses (Kelley et Ashkenazi, 2004). Cibler spécifiquement les cellules tumorales et entraîner leur apoptose est une des voies de recherche privilégiée dans la découverte de nouveaux traitements.

L'ensemble de cette étude a eu pour but de comprendre certains mécanismes associés au développement de tumeurs. En effet, la plupart des tumeurs sont résistantes à l'apoptose induite par l'activation de récepteurs de la superfamille de TNF-R. L'étude de ces récepteurs a également permis de mettre en évidence l'action anti-tumorale de certains de leurs ligands sur deux lignées tumorales humaines développées aux dépens de cellules nerveuses, une lignée neuroblastique et une lignée gliale.

Les interactions possibles entre les récepteurs Fas et p75^{NTR} ont tout d'abord été recherchées dans la lignée neuroblastique humaine SH-SY5Y. Pour cela, des études d'induction de l'apoptose et de co-localisation des deux récepteurs ont été réalisées. Ainsi, des regroupements membranaires des deux récepteurs activés, de même que des interactions réciproques sur les voies de signalisations intra-cellulaires ont pu être mises en évidence.

Le récepteur Fas a également été étudié au niveau d'une lignée de glioblastome humain, les cellules U-87 MG. L'effet anti-tumoral du récepteur Fas, associé à l'étoposide, un anti cancéreux, et à la dexaméthasone, un glucocorticoïde, a été recherché. Les résultats obtenus *in vitro* étant prometteurs, une analyse *in vivo* a ensuite confirmé un effet anti-tumoral concluant sur les cellules greffées dans des cerveaux de rats immunodéprimés.

De plus, afin d'optimiser les résultats obtenus pour le modèle animal, l'hétérogénéité des cellules U-87 MG a été analysée. En effet, cette lignée cellulaire est composée de plusieurs sous-clones. Il s'est avéré que ces sous-types cellulaires expriment des récepteurs et marqueurs différents pouvant les doter d'un pouvoir tumorigène variable et d'une résistance à l'apoptose plus ou moins prononcée.

Les récepteurs de TRAIL ont également été recherchés dans les deux lignées cellulaires, SH-SY5Y et U-87 MG. Les résultats préliminaires obtenus ont montré un effet anti-tumoral potentiel de TRAIL sur les cellules, ouvrant la voie vers la recherche de nouveaux traitements.

Enfin, une nouvelle forme de résistance des glioblastomes à l'apoptose a été mise en évidence. En effet, le récepteur pro-apoptotique p75^{NTR} est séquestré dans l'appareil de Golgi des cellules U-87 MG, empêche leur apoptose en présence de neurotrophine et est probablement mis en cause lors de la transformation tumorale.

Bibliographie

I - Généralités sur l'apoptose

Toutes les cellules ont la capacité de s'autodétruire en activant un programme intrinsèque dont l'exécution conduit à une forme de mort cellulaire, l'apoptose. Contrairement à la nécrose, l'apoptose est considérée comme étant un phénomène de mort cellulaire "ordonnée", résultant de la succession de différentes phases (Kerr et al., 1972 ; Duvall et Wyllie, 1986). Ces phases permettent l'interruption planifiée des processus biologiques et la destruction des macrostructures de manière à faciliter leur élimination.

Plusieurs signaux physiologiques et pathologiques, extra-cellulaires ou intra-cellulaires (drogues cytotoxiques, privation en facteurs de croissances, TNF- α , FasL, p53...) sont capables d'induire l'apoptose de nombreux types cellulaires. D'une manière générale, l'apoptose est considérée comme étant un mécanisme majeur impliqué dans des processus tant physiologiques que pathologiques. Ainsi, ce phénomène de mort cellulaire intervient dans l'élimination des cellules âgées ou endommagées et dans la dégénérescence des cellules surnuméraires, en particulier lors du développement embryonnaire. L'apoptose est donc impliquée dans les phénomènes de vieillissement cellulaire, dans le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire, lors du renouvellement tissulaire et du développement du système nerveux. Une résistance accrue à l'apoptose entraîne l'apparition de pathologies telles que les maladies auto-immunes ou le cancer. A l'inverse, un accroissement des taux d'apoptose participe à l'émergence de maladies telles que les maladies neurodégénératives.

II - Mécanismes de l'apoptose

Les cellules en apoptose vont tout d'abord s'isoler des autres cellules (perte des contacts intercellulaires). La mitochondrie de la cellule apoptotique va alors subir plusieurs modifications majeures : le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme (Kluck et al., 1997 ; Yang et al., 1997), la diminution du potentiel membranaire $\Delta\Psi_m$ et la modification de la perméabilité mitochondriale (Marchetti et al., 1996 ; Zamzami et al., 1996 ; Vander Heiden et al., 1997).

Un point morphologique important et caractéristique de l'apoptose est l'augmentation de la condensation à la fois du noyau (et de sa chromatine) et du cytoplasme, induisant ainsi une diminution significative du volume cellulaire. La chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases (pb) (Wyllie, 1980 et Wyllie et al., 1984) sous l'action d'endonucléases, engendrant ainsi des extrémités 3'OH sur chaque fragment d'ADN.

La membrane cellulaire, bien que conservant longtemps son intégrité, commence à bourgeonner. Finalement, toute la cellule se fragmente en vésicules entourées d'une membrane renfermant une partie du cytoplasme : ce sont les corps apoptotiques. Ils sont rapidement phagocytés par les cellules voisines, évitant ainsi toute possibilité d'inflammation locale. La reconnaissance de ces corps apoptotiques par les phagocytes est facilitée par la translocation des phosphatidylsérines membranaires du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Ce processus permet d'éviter toute libération du contenu cellulaire et de prévenir ainsi d'éventuelles lésions des cellules voisines.

II.1 - Effecteurs de l'apoptose

L'apoptose joue un rôle déterminant au cours de processus physiologiques aussi différents que le développement et le contrôle du renouvellement cellulaire et tissulaire. La régulation de l'apoptose est également fondamentale pour l'homéostasie du système hématopoïétique et du système immunitaire car elle permet de contrôler étroitement la taille des sous populations cellulaires.

De nombreux signaux très différents, physiologiques ou pathologiques, intra comme extra-cellulaires ont été identifiés comme pouvant déclencher l'apoptose. Ainsi, elle peut être induite par la carence en facteurs de croissance (NGF, IL-2...), par la liaison de certains récepteurs membranaires (Fas, p75^{NTR}...) à leurs ligands, ou par des lésions cellulaires (radiations ionisantes, agents cytotoxiques, chocs osmotiques, hyperthermie). Ces signaux doivent alors être intégrés par la cellule qui, en fonction de son degré de différenciation et d'activation, va orienter sa réponse soit vers la mort, soit vers la survie, la prolifération ou la différenciation. Cette intégration fait appel à un certain nombre de médiateurs intra-cellulaires qui sont soit anti- soit pro-apoptotiques selon le type cellulaire et les molécules présentes dans l'environnement.

II.1.A - Rôle des caspases

La mort cellulaire par apoptose résulte de l'intervention d'une machinerie spécialisée, conservée entre chaque espèce, et responsable de modifications morphologiques comparables, quel que soit l'agent inducteur. En dépit de la diversité des signaux, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent des modifications morphologiques et biochimiques similaires, suggérant l'existence d'une phase effectrice commune à tous les types cellulaires. Ainsi, cette signalisation aboutit à l'activation irréversible de molécules effectrices. Parmi les principaux effecteurs contribuant à la destruction de la cellule, on distingue d'une part les protéases à cystéine, également appelées caspases ("cysteinyl aspartate-specific proteinases") et d'autre part les nucléases. Les cibles des caspases sont des protéines dont le clivage aboutit soit à la perte de leur fonction, soit à l'acquisition de nouvelles activités enzymatiques.

- Structure des caspases

Actuellement, 14 caspases différentes sont connues. L'ensemble des membres de cette famille d'endoprotéases possède un site catalytique comprenant un résidu cystéine directement impliqué dans le processus catalytique localisé dans un motif QACxG (où le

résidu x est R, Q ou G). Ces enzymes reconnaissent, puis clivent, des chaînes polypeptidiques au niveau d'un résidu aspartate de la partie carboxy-terminale.

Les caspases sont présentes dans le cytoplasme sous une forme inactive (zymogène). Comme elles clivent spécifiquement leurs substrats au niveau d'un résidu Asp, elles ont la capacité de s'auto activer et/ou de s'activer mutuellement, aboutissant à une activation protéolytique en cascade. Leur protéolyse provoque la dimérisation des formes zymogènes conduisant à leur clivage. Un premier clivage libère une première sous-unité (p10/p12), tandis qu'un second clivage engendrera une sous-unité de taille plus importante portant le site catalytique (p17/p20). L'enzyme ainsi formée par l'association des deux sous-unités est composée de deux hétérodimères qui comprennent chacun deux sites catalytiques actifs (Budihardjo et al., 1999).

- Mécanisme d'action des caspases

En plus de leurs sous-unités actives, les pro-caspases possèdent un pro-domaine de longueur variable à leur extrémité NH₂-terminale qui permet de les diviser en deux sous-groupes.

Les caspases à long pro-domaine, dites caspases d'amont ou initiatrices, contiennent des motifs d'interaction protéine-protéine, tels que les domaines DED ("death effector domain") pour les caspases 8 et 10 ou CARD ("caspase recruitment domain") pour les caspases 1, 2, 4 et 9. Ces domaines permettent leur recrutement par des protéines adaptatrices au niveau de complexes protéiques d'initiation de l'apoptose. Le recrutement des pro-caspases initiatrices au niveau de ces sites spécifiques entraîne l'oligomérisation des proenzymes et leur activation par autocatalyse (Kumar et Colussi, 1999).

Les caspases 3, 6, 7 et 14 possèdent quant à elles un pro-domaine plus court (10 à 40 résidus) et sont dites caspases d'aval. Elles ne possèdent pas de domaine leur permettant d'être recrutées et de s'oligomériser. Elles sont activées à la suite de leur clivage par une autre caspase (à pro-domaine court ou long) ou par le granzyme B, ce qui aboutit à un fonctionnement dit en cascade. Leur activation conduit au clivage de diverses protéines

substrats (Thornberry et Lazebnik, 1998) à l'origine de la plupart des événements biochimiques, structuraux ou morphologiques de l'apoptose.

De nombreux substrats des caspases ont, à ce jour, été identifiés. Le premier substrat identifié est l'enzyme poly-ADP-ribose-polymérase (PARP) dont la coupure, au niveau de la séquence DEVD-G, est l'un des premiers signes détectables de l'apoptose. Le clivage protéolytique a pour conséquences, soit l'activation de protéines impliquées dans le déroulement de l'apoptose [pro-caspases, endonucléases, protéine kinase C (PKC- δ), facteurs de transcription SREBP-1,-2], soit l'inactivation de protéines contribuant au maintien de l'intégrité cellulaire (actine, lamines nucléaires, fodrine, facteur ICAD/DFF45) ou à la régulation de la réparation de l'ADN (PARP, DNA-PK) ou du cycle cellulaire (Rb) (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004).

II.1.B - Rôle mitochondrial

La mitochondrie, depuis longtemps identifiée comme l'organite indispensable à la production d'ATP, a été également impliquée dans la régulation des mécanismes moléculaires de mort cellulaire. En effet, dans une cellule engagée dans un processus de mort cellulaire (à la suite de stimuli engendrant un stress ou un dommage cellulaire), les membranes mitochondriales sont perméabilisées (à l'origine de la libération de protéines pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire vers le cytosol) et cette perméabilisation est accompagnée dans la plupart des cas d'une chute du potentiel membranaire $\Delta\Psi_m$.

Les protéines mitochondriales libérées lors de cette perméabilisation sont regroupées sous le nom générique de SIMP ("soluble inter membrane mitochondrial proteins") et possèdent toutes une activité pro-apoptotique. Une première classe de SIMP agit sur la voie classique d'apoptose dépendante des caspases : ce sont des pro-caspases, le cytochrome c et un répresseur d'inhibiteur de caspases, la protéine Smac/DIABLO. Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec la protéine Apaf-1 et la pro-caspase 9, formant ainsi, en présence d'ATP, un complexe multiprotéique appelé apoptosome à l'origine du clivage de la pro-caspase-9 en caspase-9, et donc de la formation de sa forme active (Zou et al., 1999). Cette dernière activera à son tour d'autres caspases exécutrices comme les caspases 3 ou 7. La

protéine Smac/DIABLO, quant à elle, se lie aux protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) et les inactive.

Les membres de la famille Bcl-2 ont également une importance cruciale dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire. Cette famille comprend aussi bien des protéines pro-apoptotiques (comme Bax, Bak, Bad, Bid, Bim) qu'anti-apoptotiques (comme Bcl-2 et Bcl-x_L). L'alignement de leur séquence protéique a permis de définir quatre régions hautement conservées appelées domaines BH ("Bcl-2 homology") 1 à 4. Certaines molécules pro-apoptotiques contiennent les domaines BH1, BH2 et BH3 (Bak), tandis que d'autres ne contiennent que le domaine BH3 (Bid, Bim, Bad). Le domaine BH4 est quant à lui spécifique des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1, Diva). Ces protéines interagissent entre elles, formant des homodimères ou des hétérodimères, le niveau relatif de chaque protéine dans la cellule déterminant sa sensibilité à un signal de mort (Adams et al., 1998).

Par ailleurs, une grande majorité d'entre elles contient une partie carboxy-terminale hydrophobe qui assure leur ancrage au niveau de la membrane externe mitochondriale, mais également des membranes externes du réticulum endoplasmique et du noyau. Les molécules anti-apoptotiques seraient localisées dans la mitochondrie tandis que les protéines pro-apoptotiques seraient plutôt localisées dans le cytosol ou au niveau des microtubules. À la suite d'un signal apoptotique, ces dernières s'inséreraient dans la membrane mitochondriale et induiraient sa perméabilisation (Crompton, 2000). Il a été proposé que cette capacité d'insertion serait liée à leur similitude de structure avec certaines toxines bactériennes, leur permettant de former des pores transmembranaires et modulant ainsi la libération des SIMP (Schendel et al., 1998).

II.2 - Les récepteurs de mort cellulaire

Parmi les molécules effectrices de l'apoptose, il existe des récepteurs dits récepteurs de mort qui appartiennent à la superfamille des TNF-R.

Les membres de la famille du TNF-R sont des protéines transmembranaires de type 1 possédant dans leur domaine extra-cellulaire de deux à six régions riches en cystéines,

impliquées dans la liaison du ligand. Ils peuvent promouvoir, selon le contexte cellulaire la survie, ou la mort. Cette superfamille regroupe différents récepteurs comme CD27 (Camerini et al., 1991), CD30 (Durkop et al., 1992), CD40 (Stamenkovic et al., 1989), TNF-RI (Loetscher et al., 1990 ; Schall et al., 1990), TNF-RII (Smith et al., 1990), Ox40 (Mallett et al., 1990), p75^{NTR} (Johnson et al., 1986), CD95 (Fas/APO-1) (Itoh et al., 1991 ; Oehm et al., 1992), DR3 (Chinnaiyan et al., 1996a), DR4 (Chaudhary et al., 1997), DR5 (Chaudhary et al., 1997) et DR6 (Pan et al., 1998).

Certains des membres de la superfamille des récepteurs au TNF possèdent dans leur portion intra-cellulaire une région conservée appelée domaine de mort (DD) et sont connus sous le nom de récepteurs de mort. Le DD est un motif protéique d'environ 80 acides aminés nécessaire à la transmission du signal de mort par ces récepteurs (Tartaglia et al., 1993 ; Chaudhary et al., 1997 ; Nagata, 1997). Sept récepteurs de mort sont actuellement connus : Fas (CD95/APO-1), TNF-R1 (p55/CD120a), DR3, DR6, p75^{NTR}, DR4 (ou TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2) (Locksley et al., 2001). Récemment une nouvelle nomenclature a été proposée pour classer les récepteurs et les ligands de la superfamille du TNF (Tableau 1).

LIGANDS		RECEPTEURS	
Ancienne	Nouvelle	Ancienne	Nouvelle
LT- α	TNFSF1	TNF-RI	TNFRSF1A
TNF- α	TNF (TNFSF2)	TNF-RII	TNFRSF1B
LT- β	TNFSF3	LT- β R	TNFRSF3
OX40L	TNFSF4	OX40	TNFRSF4
CD40L	TNFSF5	CD40	TNFRSF5
FasL	TNFSF6	<u>Fas</u>	TNFRSF6
CD27L	TNFSF7	<u>DR3</u>	TNFRSF6B
CD30L	TNFSF8	CD27	TNFRSF7
4-1BBL	TNFSF9	CD30	TNFRSF8
TRAIL	TNFSF10	4-1BB	TNFRSF9
TRANCE	TNFSF11	<u>TRAIL-R1</u>	TNFRSF10A
TWEAK	TNFSF12	<u>TRAIL-R2</u>	TNFRSF10B
APRIL	TNFSF13	<u>TRAIL-R3</u>	TNFRSF10C
LIGHT	TNFSF14	<u>TRAIL-R4</u>	TNFRSF10D
TL1	TNFSF15	RANK	TNFRSF11A
NA	TNFSF16	OPG/OCIF/ODF/FDCR-1	TNFRSF11B
NA	TNFSF17	DR3	TNFRSF12
AITR-L	TNFSF18	NA	TNFRSF13
		HVEM/HvcA/LIGHTR/ TR2/ATAR	TNFRSF14
		NA	TNFRSF15
		<u>NGFR</u>	TNFRSF16
		BCMA	TNFRSF17
		AITR/GITR	TNFRSF18

Tableau 1. Nomenclature des récepteurs et des ligands de la superfamille du TNF (Kwon et al., 1999).

De façon générale, les voies de signalisation apoptotique des récepteurs de mort de la famille du récepteur au TNF conduisent à l'activation des caspases et en sont directement dépendantes (Enari et al., 1995 ; Longthorne et Williams, 1997). Les récepteurs de mort sont

activés par la fixation de leur ligand et vont recruter des protéines intra-cellulaires dites adaptatrices. Ces protéines vont alors à leur tour recruter les caspases initiateuses (principalement la 8 et la 10) et induire leur activation par auto-clivage. Cependant, des voies de signalisation autres que celles des caspases ont été décrites et doivent être prises en considération.

Il existe également un autre sous-groupe de récepteurs homologues au récepteur du TNF : les "decoy" récepteurs (DcR) ou récepteurs leurres (Figure 1). DcR1 (Sheridan et al., 1997) et DcR2 (Marsters et al., 1997) sont des récepteurs membranaires alors que DcR3 (Pitti et al., 1998) est une protéine soluble sécrétée. Ces récepteurs joueraient un rôle inhibiteur des récepteurs de mort plutôt qu'un rôle de transduction d'un signal. En effet, les domaines extracellulaires de DcR1 et DcR2 sont tous les deux capables de fixer le ligand TRAIL et entrent ainsi en compétition avec les récepteurs DR4 et DR5. Cependant, DcR1 ne possède pas de région cytoplasmique, et celle de DcR2, plus courte qu'un domaine de mort typique, ne permet pas la transmission d'un signal apoptotique. DcR3 présente 4 domaines riches en cystéine et est une protéine soluble qui peut se fixer à FasL avec la même affinité que Fas. De ce fait, DcR3 inhiberait, par compétition avec Fas, l'apoptose induite par FasL. Cependant, son rôle physiologique n'est pas encore clairement établi.

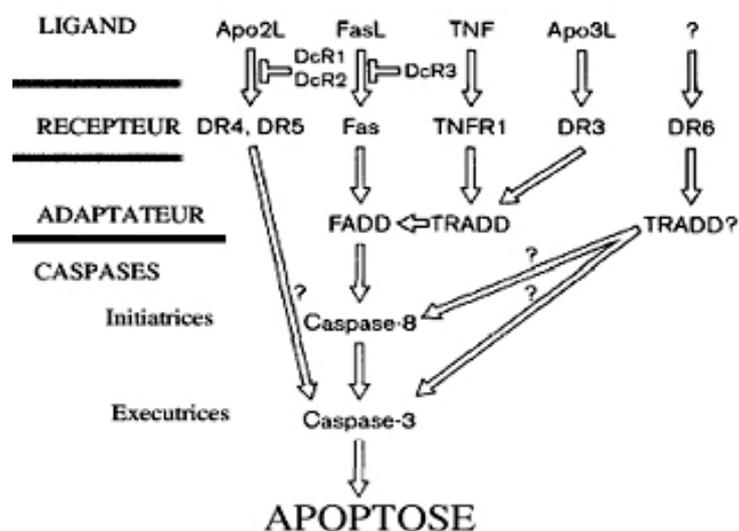


Figure 1. Voies de signalisation apoptotique des récepteurs de mort et de leurs ligands (Ashkenazi et Dixit, 1999).

Les récepteurs p75^{NTR}, Fas et TRAIL-R ayant été plus particulièrement étudiés, les données bibliographiques qui suivent détaillent plus précisément la composition et la fonction de ces récepteurs.

III - LE RECEPTEUR p75^{NTR}

Le récepteur p75 a tout d'abord été décrit sous le nom de récepteur au NGF, p75^{NGFR}, du fait de sa capacité à interagir avec le NGF. Il est maintenant connu sous le nom de récepteur de faible affinité pour les neurotrophines (NT), p75^{NTR} (TNFRSF 16). En effet, il est capable de se lier à toutes les NT, NGF, BDNF et NT-3 et -4, avec la même affinité. Chacune de ces NT peut également interagir spécifiquement avec un des récepteurs à activité tyrosine kinase, Trk (NGF : TrkA ; BDNF et NT-4 : TrkB ; NT-3 : TrkC), et l'association de ces deux types de récepteurs, Trk et p75^{NTR}, permet d'augmenter l'affinité des récepteurs Trk pour les NT.

Le récepteur de basse affinité pour les NT est une protéine qui appartient à la superfamille des récepteurs au TNF/NGF (Chao, 1994 ; Chao et Hempstead, 1995). La protéine p75^{NTR} est exprimée dans divers tissus et le gène codant cette protéine est hautement régulé pendant le développement et dans les modèles de lésions neuronales chez l'adulte. Le gène codant le récepteur p75^{NTR} contient six exons qui couvrent environ 23 kpb sur la région chromosomique 17q12-17q22. Il code un ARN messager de 1,3 kb. Alors que p75^{NTR} a tout d'abord été considéré comme une protéine associée/accessoire aux récepteurs Trk, il est maintenant clair qu'il peut agir comme un récepteur inducteur du signal même s'il ne possède aucun domaine catalytique. Cependant, de nombreuses cellules exprimant ce récepteur ne montrent aucune réponse suite à la stimulation par une NT. De plus, il est important de noter que la signalisation cellulaire induite suite à la fixation d'un ligand est hautement spécifique de la neurotrophine fixée. Enfin, afin d'induire une cascade de signalisation, le récepteur p75^{NTR} peut interagir avec plusieurs types de molécules.

Son expression a été détectée au niveau de cellules du système nerveux central dans un grand nombre de populations cellulaires (Ernfors et al., 1988; Cotrina et al., 2000) durant les stades précoces du développement, avec une diminution lors du développement de l'embryon et surtout à la naissance. Il a également été largement détecté dans des cellules du système nerveux périphérique avec une expression plus réduite chez l'adulte. Ce récepteur est également exprimé au niveau de quelques tissus non neuronaux et est fortement exprimé après lésion, comme par exemple des axotomies ou des ischémies (Ernfors et al., 1989 ; Roux et al., 1999 ; Casha et al., 2001). Il est également associé à de nombreuses maladies chroniques comme la sclérose en plaques (Dowling et al., 1999), la maladie d'Alzheimer (Yaar et al., 1997) et de nombreux cancers (Krygiel et Djakiew, 2001). Cependant, son rôle dans la progression des maladies reste indéterminé.

III.1 - Structure de la protéine

Ce récepteur est une glycoprotéine membranaire de type 1 et, comme tous les récepteurs de ce type, il possède un domaine extra-cellulaire, une partie transmembranaire et un domaine intra-cellulaire composé en partie par un domaine de mort (Figure 2). P75^{NTR} est une protéine composée de 427 acides aminés et dont le poids moléculaire est de 75 kDa lorsque celle-ci n'est pas tronquée et a subi toutes les modifications post traductionnelles.

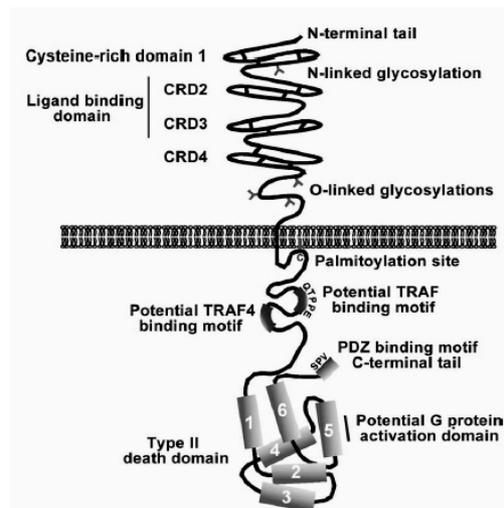


Figure 2. Représentation schématique de la structure du récepteur p75^{NTR} (Roux et Barker, 2002).

III.1.A - Partie extra-cellulaire

La partie extra-cellulaire ou N-terminale du récepteur est composée des 221 premiers acides aminés et du peptide signal de 28 acides aminés. Cette partie comprend 4 domaines riches en cystéine (CRD), CRD1 des acides aminés 31 à 64, CRD2 des acides aminés 66 à 107, CRD3 des acides aminés 108 à 147 et CRD4 des acides aminés 148 à 188, mais également une zone riche en sérine et thréonine. Un groupement carbohydrate peut être N-lié à l'asparagine 33 alors que plusieurs groupements carbohydrates O-liés sont retrouvés dans la partie juxta-membranaire extra-cellulaire (Large et al., 1989).

C'est au niveau de ces CRD que vont se fixer les différents ligands de ce récepteur. Le troisième domaine semble d'ailleurs primordial lors de ces interactions (Yan et Chao, 1991; Shamovsky et al., 1999).

III.1.B - Partie intra-cellulaire

Contrairement à de nombreuses autres protéines, la partie intra-cellulaire du récepteur ne contient pas de domaine catalytique, mais différentes zones juxta-membranaires qui vont pouvoir interagir avec d'autres protéines adaptatrices, et un domaine de mort (allant des acides aminés 344 à 421), permettant la transduction d'un signal. La cystéine 279, située dans la zone juxta-membranaire, est palmitoylée (Barker, 1998) et des résidus sérine et thréonine peuvent être phosphorylés (Grob et al., 1985 ; Taniuchi et al., 1986).

Ces modifications post traductionnelles pourraient avoir un rôle dans l'interaction avec d'autres protéines, sur la localisation cellulaire (Higuchi et al., 2003), ou sur la multimérisation du récepteur, les monomères étant phosphorylés (Grob et al., 1985).

Par comparaison des séquences en acides aminés des parties intra-cellulaires, il a été montré qu'il existe de grandes homologies de séquences entre les séquences des domaines de mort des récepteurs p75^{NTR}, Fas et p55 (Feinstein et al., 1995 ; Hofmann et Tschopp, 1995). Ce domaine de mort représente environ 80 acides aminés et il permet l'interaction des récepteurs de la famille au TNF-R avec les domaines de mort de molécules adaptatrices. Des études de RMN ont également montré des ressemblances frappantes entre la structure tridimensionnelle du récepteur p75^{NTR} (Liepinsh et al., 1997), celle du récepteur Fas (Huang

et al., 1996) et celle de la molécule adaptatrice FADD (Eberstadt et al., 1998). Cette molécule adaptatrice possède, en plus du domaine de mort, un domaine effecteur de mort contenant des résidus hydrophobes. Cependant, la distribution spatiale des résidus hydrophobes du récepteur p75^{NTR} est plus proche de celle de la molécules FADD que de celle du récepteur Fas, ce qui pourrait laisser penser que le récepteur p75^{NTR} pourrait interagir directement avec la pro-caspase 8 (Liepinsh et al., 1997 ; Eberstadt et al., 1998). Ces interactions entre le domaine de mort de p75^{NTR} et celui de molécules adaptatrices n'aboutissent pas exclusivement à l'activation de voie de mort cellulaire (Feinstein et al., 1995 ; Hoffmann et Tschopp, 1995). A ce jour, trois molécules sont connues pour interagir avec le domaine de mort du récepteur : ce sont les molécules NADE ("p75^{NTR}-associated cell death executor") (Mukai et al., 2000), RhoA (Yamashita et al., 1999) et RIP-2 ("Receptor Interacting Protein") (Khursigara et al., 2001).

III.1.C - Les protéines isoformes

Il existe des formes protéiques tronquées du récepteur p75^{NTR} qui proviennent soit de l'épissage alternatif du transcrit soit de la protéolyse de la protéine (Figure 3).

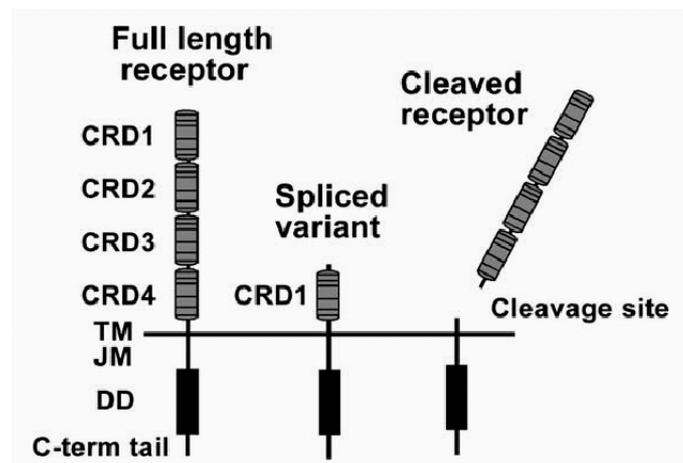


Figure 3. Schéma représentatif des différentes isoformes du récepteur p75^{NTR} (Roux et Barker, 2002).

Les protéines isoformes sont générées à la suite de l'épissage alternatif du transcrit primaire du gène. L'épissage alternatif de l'exon III a été mis en évidence chez l'homme, le rat, la souris et le poulet. Le transcrit obtenu contient un cadre ouvert de lecture qui aboutit à la synthèse d'un récepteur p75^{NTR} tronqué. L'exon III code les domaines extra-cellulaires riches en cystéine 2, 3 et 4, zone essentielle pour la fixation des ligands sur le récepteur. De ce fait, la protéine tronquée ne peut plus fixer ses ligands. Au contraire, la partie intra-cellulaire n'est pas modifiée et peut continuer à fixer toutes les molécules intra cytoplasmiques pouvant ainsi potentiellement induire un signal ou au contraire interférer avec ceux-ci (Dechant et Barde, 1997).

Une métalloprotéase constitutivement active est capable de cliver le récepteur p75^{NTR} pour générer une protéine soluble constituée de la partie extra-cellulaire du récepteur et une protéine ancrée dans la membrane comprenant les parties transmembranaire et intra-cellulaire (Zupan et al., 1989 ; Barker et al., 1991 ; DiStefano et al., 1991).

Les formes solubles du récepteur (et probablement les domaines ancrés dans la membrane) sont synthétisées en grande quantité pendant le développement et après lésion de nerfs périphériques (Zupan et al., 1989 ; Di Stefano et al., 1991) mais, dans tous les cas, leur rôle reste incertain. Cependant, l'action des différentes zones du récepteur est avérée puisque la surexpression du domaine intra-cellulaire du récepteur p75^{NTR} chez les animaux transgéniques aboutit à la mort cellulaire, durant le développement, de nombreuses populations neuronales (Majdan et al., 1997).

III.2 - Les ligands du récepteur p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} possède la particularité de pouvoir fixer avec la même faible affinité quatre NT (Rodriguez-Tebar et al., 1992 ; Squinto et al., 1991). Ces NT sont des facteurs de croissance que l'on retrouve principalement au niveau du système nerveux central (SNC). Elles jouent un rôle très important lors du développement du système nerveux des mammifères. Elles régulent la survie, la mort et la différenciation des neurones durant le développement embryonnaire et après la naissance, mais également lors du maintien neuronal

tout au long de la vie. Cette famille de facteurs de croissance comprend quatre membres chez les mammifères : le NGF (Levi-Montalcini, 1966 et 1987), le BDNF (Leibrock et al., 1989), la NT-3 (Hohn et al., 1990) et la NT-4 (Halbook et al., 1991) (également connue sous le nom de NT-4/5 et NT-5) (Snider, 1994). Cependant, il a été montré que toutes les NT ne se lient pas exactement au même endroit du récepteur p75^{NTR}. Ces différences d'interaction peuvent induire des changements conformationnels multiples du récepteur et expliquer les effets spécifiques de chaque NT sur la transduction du signal par p75^{NTR} (Dobrowsky et al., 1995 ; Mukai et al., 2000).

Ces quatre NT ont été détectées chez les mammifères et leur gène code des précurseurs des NT qui sont ensuite glycosylés (31 à 35 kDa). Ces précurseurs, les pro-NT, sont clivés par des convertases comme les furines et les convertases 1 et 2, aboutissant à l'obtention de NT matures (13,2 et 15,9 kDa). Les NT sont alors trouvées sous forme d'homodimères liés de façon non covalente (Chao et Bothwell, 2002). Ces quatre NT comportent des homologies de structure et possèdent ainsi environ 50 % d'acides aminés en commun.

L'expression des NT n'est pas limitée au système nerveux central, car elles peuvent être détectées au niveau d'autres cellules telles que les cellules du système immunitaire (Vega et al., 2004), les kératinocytes (Marconi et al., 2003), certains épithéliums, les fibroblastes et les muscles lisses (Zhou et Rush, 1993 ; Nockher et Renz, 2005)... Le NGF et la NT-3 sont secrétées de façon constitutive alors que le BDNF semble être secrété de façon régulée. Par exemple, au niveau des neurones, l'activité du BDNF dépend de sa sécrétion et semblerait être importante lors de la régulation de la plasticité synaptique (Ghosh et al, 1994 ; Mowla et al, 1999). Au niveau du système nerveux, le NGF est synthétisé et secrété par des organes cibles sympathiques et sensoriels mais les NT sont également synthétisées par les neurones eux-mêmes. La sécrétion des NT est également augmentée au niveau du système nerveux à la suite de traumatismes (Zafra et al., 1990 ; Lindvall et al., 1992).

La diversité des NT ainsi que le double système de récepteurs à haute et basse affinités rend la régulation par les NT très complexe. Les récepteurs p75^{NTR} et Trk peuvent influencer simultanément la décision de vie ou de mort des cellules, cette décision dépendant des NT exprimées. Ainsi, des cultures primaires de neurones trijumeaux meurent en présence de NT-4 alors que le BDNF permet leur survie, bien que ces deux NT se fixent sur le récepteur p75^{NTR}

(Agerman et al., 1999 ; Fundin et al., 1999). Ainsi, même si le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ peut fixer avec la même affinité quatre NT différentes, chacune d'elles peut exercer divers effets sur les fonctions cellulaires et la viabilité des cellules selon le type de récepteur activé, $p75^{\text{NTR}}$ ou Trk.

III.3 - Les voies de signalisation induites par le récepteur $p75^{\text{NTR}}$

Au niveau cellulaire, la fixation des NT sur leur récepteur peut induire des réponses très diverses qui peuvent même parfois sembler paradoxales. Les NT peuvent ainsi induire la prolifération des cellules ou la sortie du cycle cellulaire, la croissance ou l'arrêt de la croissance, et protéger les cellules de l'apoptose ou au contraire induire la mort cellulaire. Cette diversité peut être due au fait que le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ possède la particularité d'induire différentes voies de signalisation selon qu'il est ou non associé aux récepteurs de haute affinité pour les NT, selon les cellules où il est exprimé, et selon la présence ou l'absence d'un de ses ligands.

L'agrégation du récepteur $p75^{\text{NTR}}$, comme pour beaucoup de récepteurs au TNF, est un pré requis pour induire une signalisation cellulaire. Des homodimères de $p75^{\text{NTR}}$ ont ainsi été mis en évidence (Grob et al., 1985 ; Meakin et Shooter, 1991 ; Carter et al., 1996a) et certains auteurs ont montré que la dimérisation du récepteur peut également bloquer la signalisation apoptotique (Wang JJ et al., 2000). Il est important de noter que le récepteur ne va pas interagir avec les mêmes molécules intra-cellulaires selon qu'il sera sous forme monomérique ou dimérique (Ye et al., 1999). L'équilibre entre les formes monomériques et dimériques du récepteur est régulé grâce à la phosphorylation de sérine-thréonine du récepteur (Grob et al., 1985). Des mesures biophysiques ont également révélé que $p75^{\text{NTR}}$ peut être retrouvé sous forme d'aggrégats (Venkatakrishnan et al., 1991).

Plusieurs questions se posent lorsqu'on étudie les voies de signalisation du récepteur $p75^{\text{NTR}}$. Comment un récepteur peut-il initier des cascades de signalisation intra-cellulaires de manière ligand-indépendante ou dépendante ? Quelles sont les différentes voies de signalisation induites suite à l'activation de ce récepteur ? Comment cette signalisation peut-

elle être transmise par un récepteur qui ne possède pas d'activité catalytique intrinsèque au niveau de son domaine intra cytoplasmique ?

III.3.A - Les voies apoptotiques

Il est clair que le récepteur p75^{NTR} peut induire la mort des cellules qui l'expriment au niveau de leur membrane. Le tableau 2 répertorie différentes publications dans lesquelles il a été montré que le récepteur p75^{NTR} peut avoir un effet pro-apoptotique *in vitro* mais également *in vivo* et dans différents types cellulaires.

	Cell types	References
In vivo ^b	Oligodendrocytes	Casha et al., 2001
	Sensory neurons	Lee et al., 1992; Cheema et al., 1996; Majdan et al., 1997; Davey and Davies, 1998
	Sympathetic neurons	Taniuchi and Johnson, 1985; Majdan et al., 1997; Bamji et al., 1998
	Retinal ganglion cells	Frade et al., 1996; Frade and Barde, 1999
	Schwann cells	Ferri and Bisby, 1999; Syroid et al., 2000
	Motor neurons	Sekiya et al., 1986; Sendtner et al., 1992; Terrado et al., 2000; Frade and Barde, 1999; Ferri et al., 1997
	Isthmo-optic nucleus neurons	von Bartheld et al., 1994
	Somite cells	Cotrina et al., 2000
	Cortical neurons	Majdan et al., 1997; Roux et al., 1999
	Hippocampal neurons	Roux et al., 1999; Park et al., 2000a,b
	Keratinocytes	Botchkarev et al., 2000
	Smooth muscle cells	Wang et al., 2000
	Cholinergic neurons	Yeo et al., 1997; Oh et al., 2000
	In vitro ^c	Oligodendrocytes
Sensory neurons		Barrett and Bartlett, 1994; Coulson et al., 1999, 2000
Sympathetic neurons		Bamji et al., 1998; Aloyz et al., 1998; Savitz and Kessler, 2000
Retinal ganglion cells		Frade, 2000a,b
Schwann cells		Soilu-Hanninen et al., 1999
Cortical neurons		Park et al., 2000a,b
Hippocampal neurons		Friedman, 2000
Neuronal cell lines		Rabizadeh et al., 1993; Barrett and Georgiou, 1996; Huang et al., 2000; Mukai et al., 2000; Roux et al., 2001; Kimura et al., 2001
Hepatic stellate cells		Trim et al., 2000
Vascular smooth muscle cells		Wang et al., 2000
Neuroblastoma cells		Bunone et al., 1997; Lievremon et al., 1999
Schwannoma cells		Gentry et al., 2000
Sympathetic precursor cells		Salehi et al., 2000
293T cells		Irie et al., 1999; Ye et al., 1999a,b; Mukai et al., 2000; Wang et al., 2000; Kimura et al., 2001
SH-SY5Y cells		Bono et al., 1999

^a Reports demonstrating the implication of p75NTR in the induction of cell death, through ligand-independent or ligand-dependent mechanisms, using loss or gain of function experiments.

^b Refers to work on cell populations *in situ*, which endogenously express p75NTR.

^c Refers to work on cultured cells, looking at endogenous receptor or using an overexpression paradigm.

Tableau 2. Bibliographie concernant l'effet pro-apoptotique du récepteur p75^{NTR} (Roux et Barker, 2002).

Il est cependant important de remarquer qu'il est capable d'induire la mort des cellules en présence ou non d'une NT, c'est-à-dire de façon ligand-dépendante ou indépendante (Tableau 3).

Ligand-independent p75 induced apoptosis	
Immortalized neural cell lines	Rabizadeh et al., 1993
Postnatal sensory neurons	Barrett and Bartlett, 1994
PC12 cells (NGF withdrawal)	Barrett and Georgiou, 1996
Ligand-dependent p75 induced apoptosis	
Facial nerve motor neurons	Sendtner et al., 1992
Chick isthmo-optic nucleus	von Bartheld et al., 1994
Chick embryonic retina	Frade et al., 1996
Postnatal rat oligodendrocytes	Casaccia-Bonnet et al., 1996
Postnatal rat sympathetic neurons	Bamji et al., 1998
Trigeminal neurons	Davey and Davies, 1998
	Agerman et al., submitted
Motor neurons	Terrado et al., 1998
	Chu et al., 1998
	Sendtner et al., 1998

Tableau 3. Le récepteur 75^{NTR} peut activer des voies de signalisation de façon ligand-dépendante ou indépendante (Casaccia-Bonnet et al., 1999).

III.3.A.a - $P75^{\text{NTR}}$ peut agir indépendamment de la fixation d'un ligand

L'hypothèse selon laquelle le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ peut agir comme un récepteur de mort a tout d'abord été démontrée sur des lignées neuronales (Rabizadeh et al., 1993). En effet, des lignées de cellules neuronales sur-exprimant le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ voient leur taux d'apoptose augmenter en réponse à une privation de sérum. Un mécanisme de mort ligand-indépendant des cellules a alors été proposé. Cette hypothèse a été confirmée par des études sur la lignée PC12, lignée qui exprime fortement le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ et dont le taux d'apoptose augmente lors de la privation de NGF (Barrett et Georgiou, 1996). De même, l'utilisation de la stratégie d'ARN antisens sur des cultures de neurones sensitifs isolés à partir de ganglions rachidiens postérieurs de rats nouveaux nés, provoquant une diminution de l'expression du récepteur $p75^{\text{NTR}}$, a montré une augmentation de la survie des cellules (Barrett et Bartlett, 1994). Ainsi, il est possible de conclure que le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ peut avoir un effet sur les cellules qui l'expriment, et ce, même en absence de ses ligands.

III.3.A.b - P75^{NTR} peut induire la mort cellulaire de façon ligand-dépendante

Le récepteur p75^{NTR} peut également induire la mort des cellules qui l'expriment suite à la fixation d'un ligand. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré l'implication des NT et du récepteur p75^{NTR} dans la mort sélective de populations cellulaires. Voici quelques exemples concernant les effets de la fixation du NGF et du BDNF sur le récepteur p75^{NTR}.

Suite à sa fixation sur le récepteur p75^{NTR}, le NGF induit l'apoptose des cellules de la rétine ou de la moelle épinière, les récepteurs TrkA n'étant pas exprimés dans ces cellules (Frade et al., 1996 ; Frade et Brade, 1998). De plus, des traitements avec des anticorps anti-NGF ou anti-p75^{NTR} sur des embryons de poulet empêchent l'apoptose des cellules de la rétine dorsale lors des stades précoces du développement (Frade et al., 1996). D'autres études ont également montré que des cultures de neurones trijumeaux au stade de développement embryonnaire E10 meurent après fixation du NGF sur le récepteur p75^{NTR} (Davey et Davies, 1998).

De même, de fortes concentrations de BDNF peuvent, dans certaines conditions, augmenter l'apoptose de cellules après fixation sur le récepteur p75^{NTR}. En effet, des neurones sympathiques post-nataux, exprimant le récepteur p75^{NTR}, meurent après fixation du BDNF sur le récepteur p75^{NTR} (Bamji et al., 1998). Des études *in vivo* ont confirmé ces résultats. En effet, des souris déficientes en BDNF voient leur nombre de neurones sympathiques augmenter. De même, des souris p75^{-/-} subissent une apoptose retardée au niveau des neurones sympathiques. Enfin, des neurones moteurs exprimant le récepteur p75^{NTR} sont également sensibles à de fortes concentrations en BDNF et NT-3.

III.3.A.c - La voie des caspases

Certaines études ont montré que la mort induite par la fixation d'un ligand sur le récepteur p75^{NTR} impliquerait son domaine de mort (Wang X et al., 2001) alors que d'autres études ont conclu que la région cytoplasmique juxta-membranaire du récepteur serait nécessaire et suffisante lors de l'induction de l'apoptose cellulaire (Coulson et al., 2000). Cette région de 29 acides aminés appelée "Chopper" induit la mort cellulaire par activation de la voie des caspases dans de nombreux types cellulaires neuronaux ou non neuronaux (Coulson

et al., 2000). L'induction de l'apoptose par le récepteur $p75^{NTR}$ peut donc être due à son domaine de mort, à sa région juxta-membranaire intra-cellulaire ou à l'induction de la mort cellulaire selon des voies de signalisation indépendantes des deux précédemment citées.

La fixation de ligands sur le récepteur $p75^{NTR}$ peut permettre l'activation de certains membres de la famille des caspases, comme les caspases 1, 2 et 3 (Figure 4). C'est par exemple le cas au niveau des oligodendrocytes (Gu et al., 1999). Il semble également que la voie des caspases activée par la fixation d'un ligand sur le récepteur $p75^{NTR}$ soit différente de la voie classique empruntée par les autres membres de la superfamille des récepteurs au TNF. En effet, la caspase-8 ne semble pas toujours être clivée, comme c'est le cas classiquement lors de la fixation des récepteurs au TNF par leur ligand. Au contraire, la caspase-9 serait plus souvent activée lors de la mort cellulaire induite par le récepteur $p75^{NTR}$ (Gu et al., 1999 ; Wang X et al., 2001). Cependant, des études ont déjà mis en évidence l'activation de la caspase-8 lors de la fixation d'un ligand sur le récepteur $p75^{NTR}$ (Della-Bianca et al, 2001).

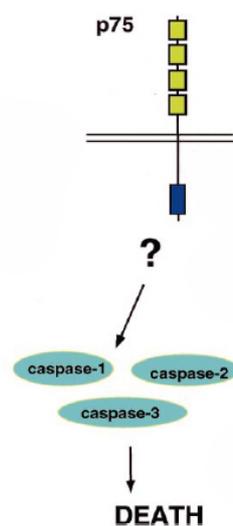


Figure 4. Caspases activées par le récepteur $p75^{NTR}$ (d'après Casaccia-Bonnel et al., 1999).

III.3.A.d - La phosphorylation des JUN kinases

La voie de la kinase N-terminale c-Jun (JNK) peut être activée par divers signaux tels que les facteurs de croissance, les cytokines, l'osmolarité ou les ultraviolets. Elle va ensuite activer, par phosphorylation, des facteurs de transcription (cJun, ATF2). Cette voie de

signalisation a été impliquée dans la prolifération, la différenciation et dans l'induction, mais aussi dans la prévention, de l'apoptose (Pinkoski et Green., 1999 ; Davis, 2000 ; Shaulian et Karin, 2002).

La cascade des JNK joue un rôle important dans le déclenchement de la mort cellulaire programmée. Le récepteur p75^{NTR} peut, suite à la fixation d'un de ses ligands, entraîner l'activation de ces kinases. C'est par exemple le cas au niveau des neurones sympathiques (Deshmukh et al., 1996 ; Bamji et al., 1998 ; Martinou et al., 1999 ; Harding et al., 2001) ou au niveau d'oligodendrocytes (Casaccia-Bonnet et al., 1996). De même, l'activité des JNK induite par un stress peut être augmentée lors de la fixation de NT sur le récepteur p75^{NTR}.

Alors que les événements qui aboutissent à l'activation des JNK ne sont pas encore parfaitement connus, la voie de signalisation située en aval est maintenant bien déterminée (Figure 5). Ainsi, lors de la privation en NGF, les petites GTPases Cdc42 et Rac1 sont activées (Bazenet et al., 1998) et vont se lier au motif "Cdc42/Rac1 interactive binding" (CRIB) des MAPKKKs ("mitogen-activated protein kinase"), telles que GCK, MEKK-1-MEKK4 et MLK-2-MLK3 (Fan et al., 1996 ; Hirai et al., 1996 ; Rana et al., 1996 ; Tibbles et al., 1996 ; Sakuma et al., 1997). Les MAPKKK(s) phosphorylées et actives vont à leur tour activer MKK4/MKK7 (Xu et al., 2001) des membres de la famille des MAPKK qui phosphorylent et activent à leur tour des isoformes spécifiques des JNK. Une fois phosphorylé par les JNK, le facteur c-jun se lie aux promoteurs de gènes contenant l'élément AP-1 et induit la transcription de ces gènes. Les membres de la famille de Bad, Bim et Dp5 sont des gènes pro-apoptotiques dont la transcription est sous la dépendance de c-jun. L'activation de la voie de JNK aboutit également à l'expulsion du cytochrome c de la mitochondrie, à l'activation sélective de la caspase-9 et à l'apoptose. Enfin, la protéine p53 peut être activée par les JNK.

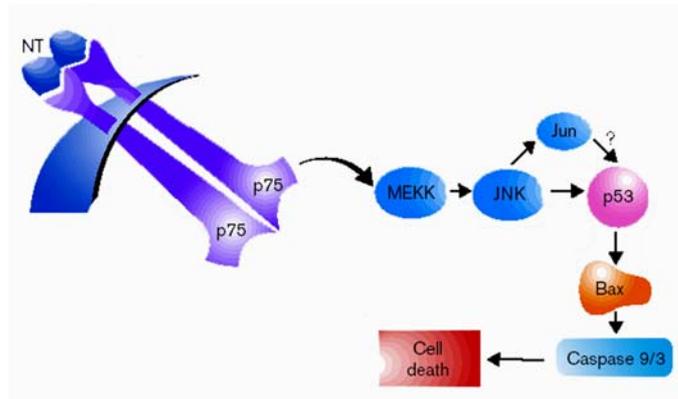


Figure 5. Voie des JNK activée par le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ (d'après Kaplan et Miller, 2000).

III.3.A.e - Activation des molécules régulatrices du cycle cellulaire

Une des voies d'induction de mort cellulaire induite par l'activation du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ est l'activation de molécules régulatrices du cycle cellulaire (Figure 6). Les "cyclin-dépendant kinases" (CDKs) 4/6 phosphorylent la protéine du rétinoblastome (Rb) et participent à l'induction de l'apoptose cellulaire (Park DS et al., 1997 et 1998 ; Frade, 2000a). Le fait que des inhibiteurs des CDK bloquent l'apoptose induite par $p75^{\text{NTR}}$ a d'ailleurs confirmé cette hypothèse. De plus, il a été montré que quatre des molécules qui interagissent avec $p75^{\text{NTR}}$, SC-1, NRAGE ("neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog"), NRIF1 ("neurotrophin receptor interacting factor") et NRIF2, peuvent bloquer le cycle cellulaire et que NRAGE et NRIF1/NRIF2 peuvent induire la mort cellulaire (Frade, 2000b ; Salehi et al., 2000 ; Benzel et al., 2001). Tous ces résultats confirment que le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ peut aboutir à la mort cellulaire par l'intermédiaire de l'activation des CDKs.

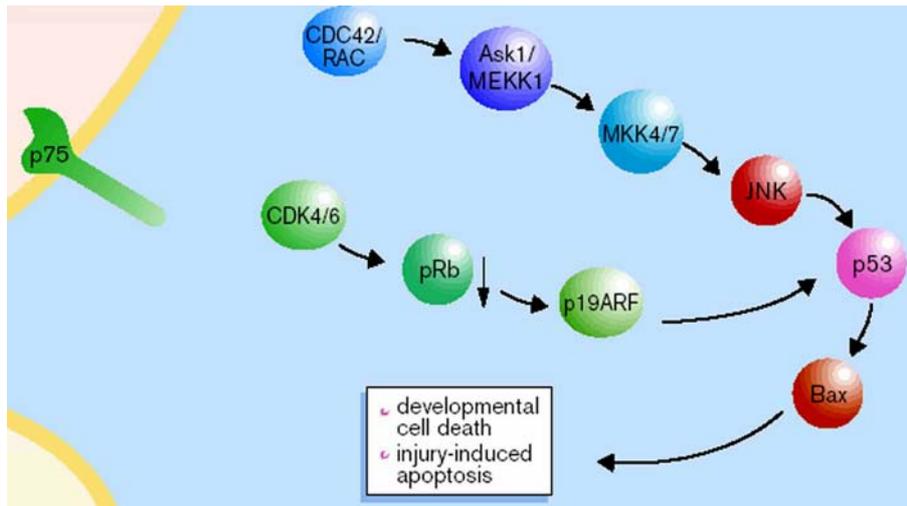


Figure 6. Implication du récepteur p75^{NTR} dans la voie des CDK (d'après Kaplan et Miller, 2000).

III.3.A.f - Activation de la protéine p53

Une autre molécule importante dont l'activité est modifiée par le récepteur p75^{NTR} est la protéine p53. P53 est une protéine dite suppresseur de tumeurs impliquée dans la mort cellulaire, particulièrement après des lésions de l'ADN ou des stress cellulaires. Ainsi, l'activation du récepteur p75^{NTR} par du BDNF conduit à une augmentation de la quantité de protéine p53 dans les neurones sympathiques et à l'induction de la mort des cellules (Aloyz et al., 1998). Ce phénomène pourrait être activé suite à sa phosphorylation par les JNK (Figure 5) (Milne et al., 1995 ; Hu MCT et al., 1997).

III.3.B - Les voies aboutissant à la survie ou à la différenciation cellulaire

Plusieurs études ont montré que le récepteur p75^{NTR} pouvait faciliter la survie cellulaire plutôt que l'apoptose et ceci, indépendamment des Trk (Shimohama et al., 1993 ; Cheng B et al., 1993 ; Kume et al., 2000 ; De Freitas et al., 2001 ; Descamps et al., 2001). Plusieurs voies de signalisation peuvent également être activées par le récepteur p75^{NTR}.

III.3.B.a - Translocation nucléaire de NF- κ B

L'activation de la voie de signalisation du facteur nucléaire NF- κ B (Figure 7) répond à des stimuli variés tels que l'exposition à des cytokines, des ultraviolets, et des produits bactériens ou viraux (Silverman et Maniatis, 2001 ; Ghosh et Karin., 2002 ; Karin et Lin, 2002).

Une réponse possible des cellules, dont le p75^{NTR} est activé, est la translocation du facteur de transcription NF- κ B dans le noyau. Ce facteur de transcription régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la survie cellulaire (O'Neill et Kaltschmidt, 1997). Ainsi, l'activité de NF- κ B peut être augmentée en présence de NGF dans les cellules de Schwann exprimant p75^{NTR} mais pas le récepteur TrkA (Carter et al., 1996b). Cette augmentation n'est pas détectable en présence de BDNF ou de NT-3 au niveau de ces cellules qui expriment les récepteurs TrkB et C. L'activation de NF- κ B par l'intermédiaire du récepteur p75^{NTR} a été montrée dans plusieurs autres types cellulaires (Ladiwala et al., 1998 ; Maggirwar et al., 1998 ; Yoon et al., 1998 ; Gentry et al., 2000; Hughes et al., 2001) et aboutit généralement à la survie cellulaire (Yoon et al., 1998 ; Descamps et al., 2001; Khursigara et al., 2001). A la suite de l'activation du récepteur p75^{NTR}, NF- κ B est transloqué dans le noyau et peut aller se fixer sur les régions régulatrices d'un gène cible codant la molécule d'adhérence des cellules neuronales L1, molécule qui intervient dans l'adhésion neurone-neurone, dans la croissance neuritique et dans les interactions neurones-cellules de Schwann lors de la formation de la gaine de myéline (Itoh et al., 1995 ; Seilheimer et Schachner., 1987 ; Anton et al., 1994).

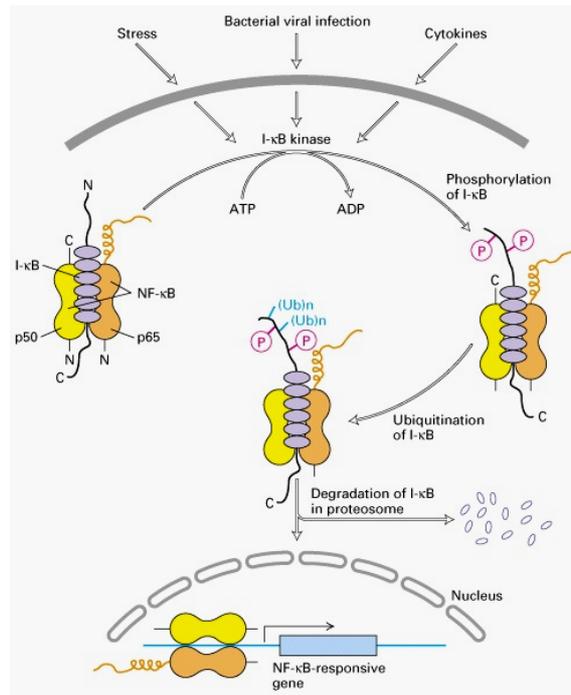


Figure 7. Activation du facteur de transcription NF-κB (d'après Ghosh et al., 1998 ; Baeuerle, 1998).

III.3.B.b - La voie de la Phosphoinositide-3 kinase (PI-3 kinase)

Le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ peut activer la voie de la PI-3 kinase et de Akt. L'activation de la PI-3 kinase et d'Akt, une kinase sérine/thréonine en aval dans la voie de signalisation, est importante pour induire la survie cellulaire de façon indépendante ou dépendante des Trk (Yao et Cooper, 1995 ; Ulrich et al., 1998). La PI-3 kinase est composée de deux sous-unités, une sous-unité régulatrice, p85, et une sous-unité catalytique, p110 (Figure 8). L'activation de Akt est associée à une augmentation, en amont, de la phosphorylation de tyrosines de différentes protéines dont la sous-unité régulatrice p85 de la PI-3 kinase (Roux et al., 2001). Il existe de multiples cibles pour Akt comme I κ B kinase 1 qui, une fois phosphorylée, joue un rôle dans l'activation de NF-κB (Kane et al., 1999 ; Ozes et al., 1999 ; Romashkova et Makarov, 1999), ainsi que d'autres protéines comme la caspase-9 (Cardone et al., 1998), Bad (Datta et al., 1999), CREB ("Cyclic AMP response element binding protein") (Du et Montminy, 1998)...

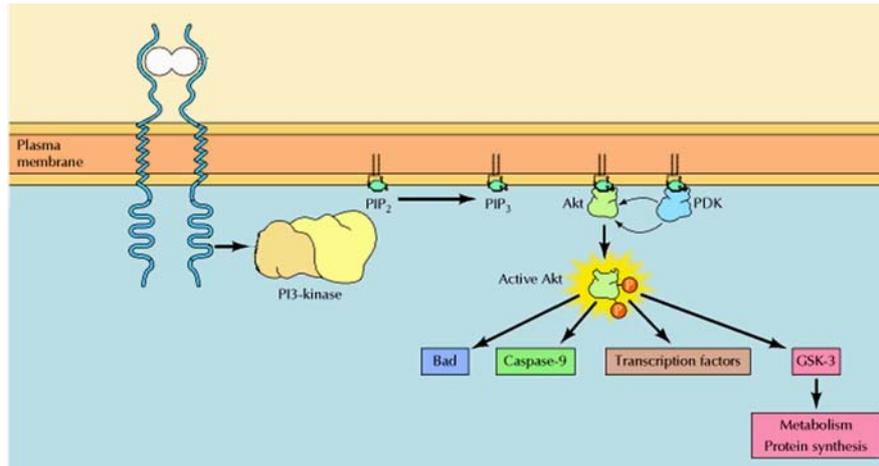


Figure 8. Voie de signalisation de la PI3-K et de Akt.

III.3.B.c - Production de céramides

La fixation des NT sur le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ induit l'activation des sphingomyélinases acides et/ou neutres, et l'hydrolyse des sphingomyélines aboutit à l'accumulation de céramides. Ainsi, l'élévation intra-cellulaire du taux de céramides due à l'augmentation de l'hydrolyse de la sphingomyéline a été observée dans différents types cellulaires comme les cellules T9, NIH3T3 et PC12 (Dobrowsky et al., 1995). La production de céramides à la suite de la fixation du NGF sur le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ est corrélée à l'activation des JNK et l'apoptose des oligodendrocytes (Verheij et al., 1996 ; Westwick et al., 1995 ; Casaccia-Bonnet et al., 1996). De plus, le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ stimule la production de céramides dans les caveolea et les "Caveolae-related domains" (Dobrowsky et al., 1994 ; Bilderback et al., 1997 et 1999) alors que les récepteurs Trk abolissent ce phénomène (Dobrowsky et al., 1995). Finalement, l'activation du récepteur peut également être associée à la différenciation cellulaire ou la survie (Brann et al., 1999 ; De Freitas et al., 2001). Le rôle des céramides dans la fonction de $p75^{\text{NTR}}$ reste donc controversé.

III.3.C - Les molécules associées au récepteur $p75^{\text{NTR}}$

Une des clés de la compréhension du fonctionnement du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ est l'identification des protéines cytosoliques qui interagissent physiquement avec le domaine

intra-cellulaire du récepteur et qui lui permettent de moduler les voies de signalisation intra-cellulaires. Durant les dernières années, plusieurs de ces protéines ont été identifiées (Figure 9) :

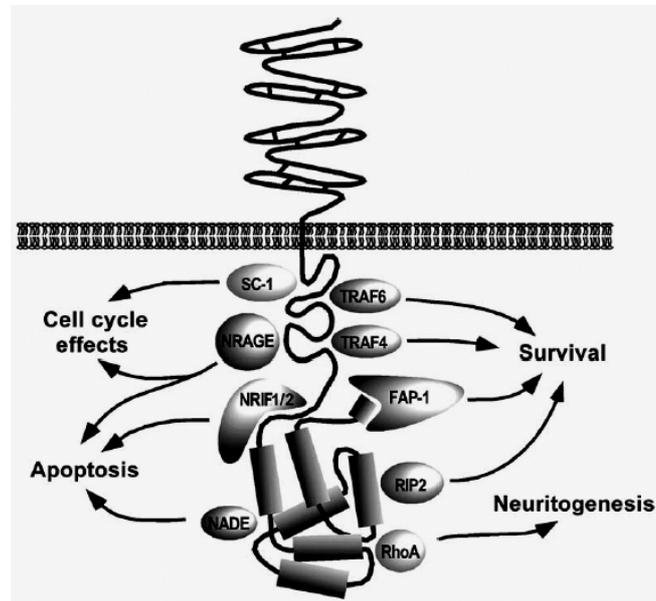


Figure 9. Schéma d'interaction des molécules adaptatrices avec le récepteur p75^{NTR} (Roux et Barker, 2002).

- NRIF 1 et 2 sont des protéines de 94 kDa en doigts de zinc (Klug et Schwabe, 1995) qui interagissent avec la région juxta-membranaire et le domaine de mort de p75^{NTR} (Casademunt et al., 1999 ; Benzel et al., 2001). Ces deux protéines agissent probablement comme des répresseurs de la transcription et leur surexpression bloque la progression des cellules dans le cycle cellulaire (Benzel et al., 2001). En général, ces protéines sont détectées dans le noyau, mais en présence de p75^{NTR}, on les retrouve accumulées dans le cytosol. De plus, la surexpression de NRIF1 induit la mort des cellules. De même, lors du développement, l'apoptose de la rétine est diminuée au niveau d'embryon NRIF1^{-/-} (Casademunt et al., 1999). Des résultats similaires ont été observés chez des souris n'exprimant pas le récepteur p75^{NTR} (Frade et Barde, 1999).

- NRAGE est une protéine de 86 kDa qui interagit *in vitro* et *in vivo* avec le domaine juxta-membranaire intra-cellulaire du récepteur p75^{NTR} (Salehi et al., 2000). C'est une protéine qui contient un domaine d'homologie nommé MHD avec le "melanoma antigen

gene" MAGE, zone d'environ 200 acides aminés, et qui appartient donc à la famille de protéines MAGE (Barker et Salehi, 2002). Le domaine MHD va interagir avec la région juxta-membranaire du récepteur p75^{NTR}. Pendant le développement, NRAGE est co-localisée avec le récepteur p75^{NTR} au niveau de plusieurs types cellulaires (Frade et Barde, 1999). Cette protéine a été montrée comme nécessaire lors de l'apoptose induite par p75^{NTR}. De plus, l'expression des Trk empêche cette apoptose puisque TrkA et NRAGE sont en compétition pour interagir avec p75^{NTR} sur le même site de fixation. NRAGE pourrait donc être à la base d'un système de modulation des voies de signalisation des récepteurs p75^{NTR} et Trk. La fonction précise des MAGE n'est pas encore connue, mais on sait que NRAGE facilite la sortie du cycle cellulaire des cellules 293, suggérant que ces protéines interagissent avec des régulateurs du cycle cellulaire (Salehi et al., 2000).

- NADE a été identifié grâce au système double hybride en utilisant le domaine de mort du récepteur p75^{NTR} comme domaine d'interaction (Mukai et al., 2000). Plusieurs études ont montré que NADE et p75^{NTR} sont associés lors de l'activation de la voie des caspases et permettent l'apoptose des cellules (Park et al., 2000).

- Les protéines TRAF sont des molécules adaptatrices qui interagissent avec les membres de la superfamille de récepteurs au TNF et avec les interleukines. Elles modulent les voies de signalisation de JNK (Ishida et al., 1996), la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NF- κ B (Wajant et al., 2001) et peuvent s'associer au récepteur p75^{NTR} afin d'aboutir à la survie cellulaire. Six protéines TRAF ont été identifiées comme interagissant avec les récepteurs de la famille au TNF et il a été montré que le récepteur p75^{NTR} peut interagir avec les protéines TRAF4 (Krajewska et al., 1998) et TRAF6 (Khursigara et al., 1999). La fixation de TRAF6 se fait au niveau juxta-membranaire intra-cellulaire du récepteur p75^{NTR} et au niveau du domaine de mort, à la suite de la fixation de NT sur le récepteur. TRAF6 interagit alors avec des protéines adaptatrices par l'intermédiaire d'un domaine situé dans sa région C-terminale. D'autres études ont montré que p75^{NTR} peut interagir avec d'autres molécules de la famille de TRAF (Ye et al., 1999) mais ces résultats sont encore controversés (Krajewska et al., 1998 ; Khursigara et al., 1999).

- RIP-2 est une protéine adaptatrice qui contient un domaine à activité sérine/thréonine kinase et un domaine CARD qui va pouvoir interagir avec le domaine de mort de p75^{NTR}

après fixation du NGF (Khursigara et al., 2001). En plus d'initier la voie des caspases, RIP-2 semble également jouer un rôle lors de l'activation de NF- κ B par le récepteur p75^{NTR}.

- FAP-1 ("Fas-associated phosphatase") est une protéine à activité tyrosine phosphatase (PTPase) qui a tout d'abord été identifiée comme étant une protéine interagissant avec le récepteur Fas. Il a ensuite été montré qu'elle se lie également au motif SPV présent au niveau de l'extrémité C-terminale du récepteur p75^{NTR} (Sato et al., 1995 ; Irie et al., 1999). Le rôle précis de FAP-1 n'est pas encore connu mais une légère augmentation de l'activation de NF- κ B a été constatée à la suite de son interaction avec p75^{NTR} dans des cellules 293T. De plus, la survie cellulaire due au récepteur p75^{NTR}, au niveau de cellules PC12 et de fibroblastes humains, est corrélée avec la diminution de l'activité PTPase de FAP-1 (Roux et al., 2001), suggérant que ce récepteur pourrait se lier et inactiver FAP-1.

- ARMS ("ankyrin-rich membrane spanning") est également une protéine qui interagit avec les récepteur p75^{NTR} (Kong et al., 2001). ARMS peut être associée au récepteur p75^{NTR} et au récepteur TrkA et est phosphorylée sur un résidu tyrosine en réponse à l'activation de TrkA ou TrkB. Ainsi, ARMS semble être un composant à part entière du complexe Trk-p75^{NTR} et pourrait être une protéine adaptatrice capable de faire interagir ces deux récepteurs physiquement et fonctionnellement.

- La protéine SC-1 est composée, entre autre, d'un domaine possédant un motif commun avec des facteurs de transcription (Buyse et al., 1995 ; Ren et al., 1999) qui agit comme un répresseur de la transcription. Elle interagit avec le récepteur p75^{NTR} et la liaison du NGF sur ce récepteur (mais pas sur les TrkA) induit la translocation de SC-1 du cytoplasme vers le noyau. Comme NRAGE, SC-1 arrête le cycle cellulaire quand il est surexprimé. (Chittka et Chao, 1999).

- RhoA fait partie de la famille des petites GTPases impliquées dans plusieurs aspects de la morphogenèse neuronale, incluant la migration, la polarisation, la croissance et la guidance axonales, la plasticité dendritique et la formation des synapses (Luo, 2000). Il a récemment été montré qu'elle interagit avec le domaine intra-cellulaire du récepteur p75^{NTR} (Yamashita et al., 1999). L'interaction fonctionnelle de ces deux protéines pourrait jouer un rôle lors de la régulation de la croissance neuritique.

III.3.D - P75^{NTR} et les radeaux lipidiques (Raft)

Les voies de signalisation des récepteurs aux NT sont modifiées par des phénomènes cellulaires dynamiques comme des changements de l'environnement lipidique, l'internalisation dans des compartiments cellulaires, via des mécanismes dépendant de la clathrine, (MacPhee et Barker, 1999), leur dégradation ou leur transport rétrograde. Les radeaux lipidiques sont des rassemblements dynamiques de cholestérol et de sphingolipides dispersés dans la phase fluide et désordonnée de la membrane plasmique (Figure 10). Ce sont des concentrations de lipides et de protéines qui interviennent dans les événements de signalisation cellulaire, permettant aux voies de signalisation d'interagir et excluant toute interférence avec les molécules extérieures aux radeaux. Ces radeaux lipidiques peuvent être comparés à des plateformes d'intégration des signaux cellulaires. Ils participent à différentes étapes des cascades de signalisation cellulaire, allant de l'initiation à la propagation et à la maintenance des signaux de la membrane plasmique.

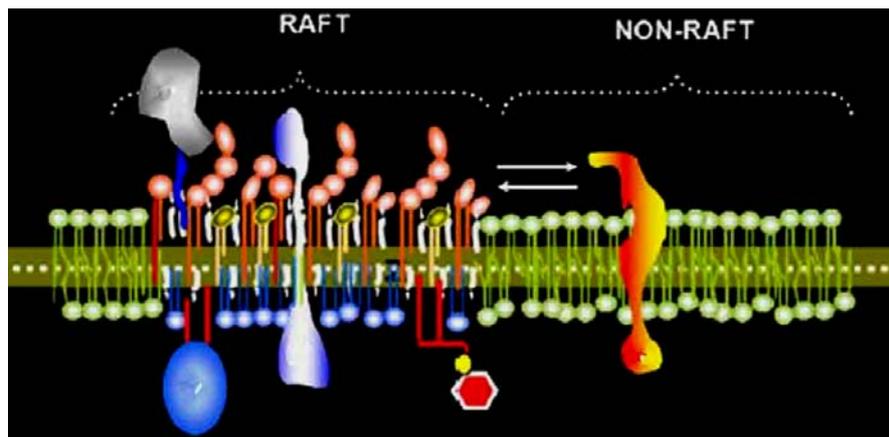


Figure 10. Les radeaux lipidiques (Rafts, d'après Lucero et Robbins, 2004).

Certains récepteurs sont associés de façon plus ou moins permanente avec les radeaux lipidiques. Plusieurs études confirment que le récepteur p75^{NTR} fait partie au moins transitoirement des protéines présentes dans les radeaux lipidiques. En effet, Huang et collaborateurs ont montré que l'interaction du NGF avec les récepteurs p75^{NTR} et TrkA se déroule principalement au niveau des radeaux lipidiques (Huang CS et al., 1999). Ces conditions favorisent la formation de sites de haute affinité, suggérant la participation de ces radeaux dans la formation de sites de liaison de haute affinité pour le NGF. De nombreux

intermédiaires impliqués dans les voies de signalisation des récepteurs p75^{NTR} et Trk ont également été détectés dans les radeaux lipidiques comme la PI-3 kinase, la phospholipase C γ (PLC γ), Shc, Grb2, Ras, Raf-1 et les MAP kinases (Simons et Toomre, 2000). Finalement, p75^{NTR} peut induire la production de céramides, produits de l'hydrolyse de la sphingomyéline, un lipide trouvé en grande quantité dans les radeaux lipidiques.

La dimérisation des récepteurs ainsi que l'induction de leurs signaux sont ainsi influencées par la composition lipidique de leur environnement. Des études sur les cellules PC12 ont montré que les récepteurs Trk et p75^{NTR} sont également localisés dans les caveolae, des régions membranaires de la cellule où sont regroupées des molécules de la signalisation cellulaire (Bilderback et al., 1997, 1999 ; Huang et al., 1999). Les caveolae sont des radeaux lipidiques spécialisés qui contiennent de la caveoline (Parton, 1996) et qui sont caractérisés par des invaginations de la surface cellulaire qui pourraient agir comme des plateformes de signalisation (Okamoto, 1998). Ces structures de la membrane plasmique sont enrichies en molécules de la signalisation cellulaire.

III.4 - Les rôles du récepteur p75^{NTR}

De nombreux rôles ont été attribués au récepteur p75^{NTR} à la suite de son activation. Plusieurs études ont montré qu'il peut être associé à l'apoptose cellulaire (Cf voies apoptotiques, page 19 et tableau 2), particulièrement lors du développement du système nerveux. Cependant, il est maintenant évident qu'il intervient également lors de la survie (Cf voies impliquées dans la survie, page 25), de la différenciation, de la croissance cellulaire, lors de lésions ou d'agressions, ou dans le transport des NT.

Le récepteur p75^{NTR} intervient lors du développement neuronal du système nerveux central et en particulier lors de l'apoptose cellulaire. Plusieurs études réalisées *in vivo* ont également montré que ce récepteur peut induire l'apoptose de différents types cellulaires dans différents types d'organismes lors du développement : ainsi, il intervient au cours du développement de la rétine chez le poulet (Frade et al., 1996) ou de différents types de neurones comme les neurones sympathiques (Majdan et al., 1997 ; Bamji et al., 1998).

Ce récepteur est également impliqué dans la différenciation et la croissance cellulaire. Par exemple, des embryons de souris $p75^{\text{NTRexonIII-/-}}$ montrent un déficit de croissance des nerfs thoraciques intercostaux et des retards dans les arborisations axonales (Yamashita et al., 1999 ; Bentley et Lee, 2000). Au contraire, l'hippocampe de souris $p75^{\text{NTRexonIII-/-}}$ est hyper innervé par les neurones cholinergiques afférents (Yeo et al., 1997). Cette hypothèse d'intervention de $p75^{\text{NTR}}$ lors de la croissance cellulaire n'est donc pas encore entièrement comprise ni expliquée. Cependant, le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ peut interagir et moduler une protéine régulatrice de la croissance cellulaire, RhoA, suggérant que ce récepteur pourrait contrôler la croissance axonale en modulant les petites GTPases (Yamashita et al., 1999).

Le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ intervient également après lésions des cellules. En effet, l'expression de ce récepteur est augmentée après une lésion et cette augmentation d'expression est la plupart du temps associée à une augmentation de l'apoptose (Ernfors et al., 1989 ; Roux et al., 1999 ; Casha et al., 2001). Ainsi, l'axotomie de neurones moteurs ou leur écrasement rendent ces cellules plus sensibles à la mort cellulaire lors d'un traitement au NGF. Cette sensibilité des neurones moteurs au NGF montre que la mort cellulaire induite par le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ est augmentée lors de lésions ou lors de conditions traumatiques (Casaccia-Bonofil et al., 1996). De même, une grande quantité de récepteur $p75^{\text{NTR}}$ a été détectée dans les cellules de Schwann après lésion nerveuse (Lemke et Chao, 1988).

Enfin, le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ agit sur le transport axonal des NT et il a été montré qu'il est lui-même transporté de manière antérograde et rétrograde dans le nerf sciatique (Johnson et al., 1987). Des résultats indiquent que ce récepteur joue un rôle dans l'internalisation et le transport rétrograde du NGF, du BDNF et de la NT-3 (Curtis et al., 1995 ; von Bartheld et al., 1996).

III.5 - Interaction avec les récepteurs Trk

Pendant de nombreuses années, le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ a été considéré comme étant un récepteur n'ayant pour seule activité que d'aider les récepteurs Trk en leur permettant de détecter de faibles quantités de NT et en modulant leur activité tyrosine kinase. Il est aujourd'hui clair que la décision de mort ou de survie des cellules dépend de la présence ou de

l'absence des différents récepteurs aux NT : p75^{NTR} seuls, Trk seuls ou p75^{NTR} et Trk co-exprimés à la surface de la cellule.

III.5.A - Formation de sites de haute affinité pour les NT

La co-expression des récepteurs p75^{NTR} et Trk permet la formation de sites de haute affinité pour les NT et augmente la survie des cellules à la suite de la fixation de ces ligands (Chao et Hempstead, 1995). En effet, le récepteur p75^{NTR} possède une constante de dissociation de 10⁻⁹ M. De même, la constante de dissociation des récepteurs Trk est de 10⁻⁹ M (Kaplan et al., 1991 ; Hempstead et al., 1991) mais l'association de ces deux récepteurs permet d'augmenter l'affinité des récepteurs Trk pour les NT, la constante de dissociation étant alors de 10⁻¹¹ M. Ainsi, en présence du récepteur p75^{NTR}, le niveau d'association du NGF sur le récepteur TrkA est augmenté de 25 fois (Mahadeo et al., 1994). L'existence de ces sites de haute affinité permet alors d'augmenter la réponse des récepteurs Trk en présence de faibles concentrations de NT. Cette propriété est importante pour les neurones qui doivent se lier à des NT présentes à des concentrations inférieures au picomolaire (Barde, 1989).

Deux hypothèses ont été émises afin d'expliquer la formation de sites de haute affinité lorsque les récepteurs p75^{NTR} et TrkA sont associés (Figure 11). La première est basée sur le fait que le récepteur p75^{NTR} agirait comme un co-récepteur qui lie rapidement les NT et les concentre localement pour les Trk ou qui les présente aux Trk dans une conformation favorable à leur fixation (Barker et Shooter, 1994 ; Hantzopoulos et al., 1994). La deuxième hypothèse repose sur le fait que p75^{NTR} aurait un effet allostérique sur les Trk, indépendamment de la fixation des NT sur le récepteur p75^{NTR}. Le récepteur p75^{NTR} pourrait ainsi modifier la conformation des récepteurs Trk, augmentant leur capacité d'association aux NT et conduisant ainsi à la formation de sites de haute affinité.

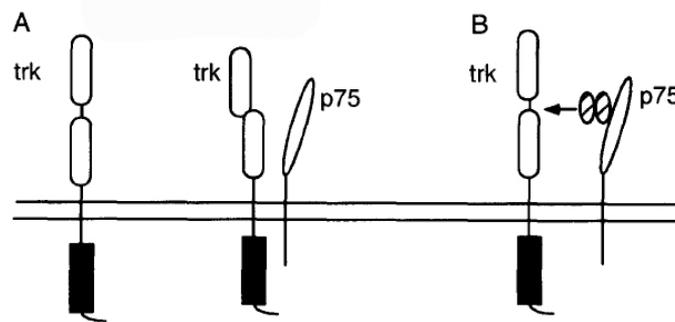


Figure 11. Hypothèses d'influence du récepteur p75^{NTR} sur l'activation des récepteurs Trk (Chao et Hempstaed, 1995).

A : Le récepteur p75^{NTR} modifie la conformation des récepteurs Trk, augmentant leur capacité d'association avec les NT. B : Le récepteur p75^{NTR} présente les NT dans une conformation favorable à leur fixation par les récepteurs Trk.

Les interactions fonctionnelles entre les deux types de récepteurs pourraient également être dues à des interactions physiques entre les deux récepteurs (Huber et Chao, 1995 ; Ross et al., 1998 ; Bibel et al., 1999). En effet, les récepteurs p75^{NTR} et Trk interagissent au niveau de leurs domaines cytosoliques et transmembranaires (Nykjaer et al., 2005). De plus, il a été montré que le récepteur p75^{NTR} peut être co immunoprécipité avec n'importe lequel des trois récepteurs Trk (Gargano et al., 1997 ; Bibel et al., 1999). Le rapprochement de ces récepteurs serait facilité par la formation de complexes contenant ces deux récepteurs. Ainsi, les récepteurs TrkA et p75^{NTR} sont tous les deux présents dans les caveolea et tous les deux associés à la caveoline, qui favorise la formation des complexes p75^{NTR}/Trk (Bilderback et al., 1997 et 1999 ; Huang et al., 1999). Deux autres molécules pourraient également intervenir lors de l'interaction p75^{NTR}/Trk. Ce sont ARMS, qui interagit physiquement avec les deux récepteurs (Kong et al., 2001; Lee R et al., 2001), et NRAGE qui interagit avec le récepteur p75^{NTR} et qui est capable d'empêcher l'interaction p75^{NTR}/Trk (Salehi et al., 2000).

Dans les différentes populations neuronales sensibles aux NT, les récepteurs p75^{NTR} et TrkA sont fréquemment co-exprimés, particulièrement dans le système nerveux périphérique des vertébrés. A ce niveau, il est commun de dire que le récepteur p75^{NTR} agit comme un régulateur positif des récepteurs Trk (Barker et Shooter, 1994 ; Verdi et al., 1994 ; Horton et

al., 1997) en augmentant le nombre de sites de fixation de haute affinité pour les NT. La capacité d'une cellule à répondre à de faibles concentrations de NGF et la capacité à former des sites de haute affinité dépend des niveaux relatifs des récepteurs p75^{NTR} et TrkA (Benedetti et al., 1993 ; Verdi et al., 1994). La régulation de la formation de sites de haute affinité par la co-expression des récepteurs p75^{NTR} et TrkA donne une explication sur la manière dont ces deux récepteurs coopèrent pour augmenter la réponse due aux NT pendant le développement. En effet, les lignées cellulaires neuronales expriment les récepteurs p75^{NTR} et TrkA et l'autophosphorylation du récepteur TrkA est augmentée en présence de NGF, menant à une réponse de différenciation plus rapide (Verdi et al., 1994).

III.5.B - Effet de la co-expression des récepteurs p75^{NTR} et Trk sur les voies de signalisation

En absence du récepteur TrkA, le récepteur p75^{NTR} peut générer, dans des populations spécifiques et selon les conditions, un signal de mort (Rabizadeh et al., 1993 ; Frade et al., 1996 ; Casaccia-Bonofil et al., 1996 ; Bamji et al., 1998). Il semblerait que, dans les cellules co-exprimant les récepteurs p75^{NTR} et Trk, la survie cellulaire médiée par les récepteurs Trk soit un signal dominant et qu'il bloque l'effet pro-apoptotique du récepteur p75^{NTR}, que ce soit en présence de NGF ou de BDNF (Bamji et al., 1998 ; Yoon et al., 1998 ; Davey et Davies, 1998). Les mécanismes qui bloquent l'effet pro-apoptotique du récepteur p75^{NTR} ne sont pas encore bien déterminés. Il semblerait cependant que l'activation de la voie de signalisation des TrkA bloque la production de céramides due à l'activation du récepteur p75^{NTR} par l'intermédiaire de l'activation des PI3-Kinases (Dobrowsky et al., 1994 et 1995 ; Bilderback et al., 2001) et empêche la mort cellulaire, p75^{NTR} et MAP kinases dépendante, par la suppression de l'activité des c-jun kinases induites par le récepteur p75^{NTR}. L'activité de NF- κ B induite par le récepteur p75^{NTR} ne serait pas modifiée.

Il a également été montré, au niveau de cellules embryonnaires endothéliales de rein par exemple, que le récepteur p75^{NTR} limiterait la spécificité des Trk pour une NT précise en diminuant l'effet inducteur de signalisation cellulaire par les NT non préférentielles. Par exemple, en présence du récepteur p75^{NTR}, le NGF active les récepteurs TrkA mais l'activation par les NT-3 et -4 est grandement diminuée (Mischel et al., 2001). De même,

l'activation du récepteur TrkB par le BDNF n'est pas modifiée en présence du récepteur p75^{NTR} alors que l'effet des NT-3 et -4 est diminué lorsque p75^{NTR} est co-exprimé (Bibel et al., 1999).

In vitro, les effets de la co-expression des récepteurs Trk et p75^{NTR} est remarquablement complexe. Par exemple, l'expression du récepteur p75^{NTR} sensibilise le récepteur TrkA au NGF, mais diminue sa sensibilité pour la NT-3 au niveau de cellules PC12 ou MAH (Benedetti et al., 1993 ; Verdi et al., 1994). De plus, l'effet de p75^{NTR} sur TrkB semble variable et dépend du système cellulaire (Bibel et al., 1999 ; Vesa et al., 2000). L'ensemble de tous les résultats démontre clairement que p75^{NTR} interagit de façon différente avec chacun des 3 récepteurs Trk et que les résultats obtenus avec un type de récepteur Trk ne sont pas extrapolables aux autres.

Ce système de signalisation, faisant intervenir deux récepteurs membranaires, permet une plus grande sensibilité, sélectivité et flexibilité pour que les NT induisent de nombreuses réponses biologiques.

Le récepteur p75^{NTR} aurait ainsi deux fonctions physiologiques principales : moduler les voies de signalisation des récepteurs Trk et initier de façon autonome les cascades de signalisation qui régulent la survie et l'apoptose des cellules.

IV - Les récepteurs à activité tyrosine kinase Trk

Trois récepteurs à activité tyrosine kinase (Trk) capables d'interagir avec les quatre NT ont été identifiés. Le récepteur TrkA peut interagir avec le NGF, le TrkB avec le BDNF et la NT-4 (Squinto et al., 1991), et le TrkC avec la NT-3. Il faut noter que la NT-3 peut également interagir avec les récepteurs TrkA et TrkB mais avec une affinité moindre. L'activation des voies de signalisation par les récepteurs Trk induit la survie et la

différenciation de nombreuses populations cellulaires et en particulier les populations neuronales.

IV.1 - Structure des récepteurs Trk

Comme le récepteur $p75^{\text{NTR}}$, les récepteurs Trk sont des récepteurs transmembranaires de type 1 (Figure 12) qui appartiennent à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase.

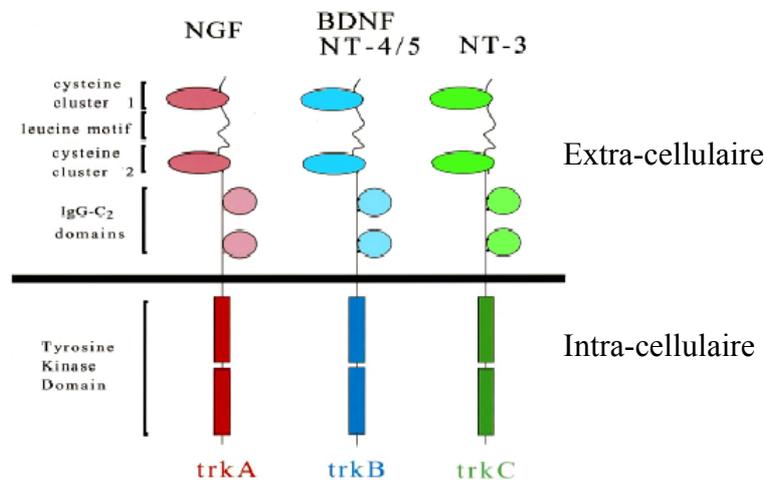


Figure 12. Représentation schématique de la structure des récepteurs Trk (Casaccia-Bonnelly et al., 1999).

Leur partie extra-cellulaire est composée d'un peptide signal, d'un motif riche en leucine entouré de deux zones riches en cystéines et de deux domaines de type Immunoglobuline (Ig-like) dans la zone juxta-membranaire. Le deuxième domaine Ig-like (Urfer et al., 1998) ainsi que le deuxième domaine composé de répétitions de leucines seraient responsables de l'interaction des Trk avec les NT. La partie intra-cellulaire comporte une partie juxta-membranaire, un domaine à activité tyrosine kinase, une extrémité COOH et 10 tyrosines conservées. Ces tyrosines pourront être phosphorylées et sont impliquées dans la boucle autorégulée des domaines à activité kinase.

Plusieurs isoformes des Trk ont également été identifiées (Figure 13) :

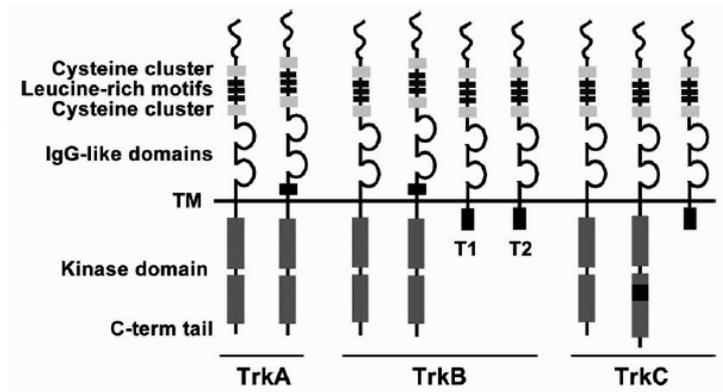


Figure 13. Représentation schématique des différentes isoformes des récepteurs Trk (Roux et Barker, 2002).

TM : région trans-membranaire ; ■ : régions de tailles variables additionnées ; T1 et T2 : isoformes sans domaine catalytique.

Les deux isoformes des TrkA diffèrent par la présence ou l'absence de 6 acides aminés (VSFSPV) dans la zone juxta-membranaire extra-cellulaire. Ces deux isoformes semblent posséder les mêmes propriétés mais ont des profils d'expression différents. Comme pour les récepteurs TrkA, les récepteurs TrkB peuvent posséder une séquence d'acides aminés en plus dans la partie extra-cellulaire juxta-membranaire. Deux isoformes, T1 et T2, du récepteur TrkB, ne possédant pas de domaine catalytique, ont également été identifiées (Klein et al., 1990 ; Middlemas et al., 1991). Ces deux récepteurs tronqués diffèrent par la présence de 21 ou 23 acides aminés dans leur partie cytoplasmique (Fryer et al., 1996). Ils possèdent cependant les mêmes domaines extra-cellulaire et trans-membranaire. Enfin, 5 isoformes du récepteur TrkC ont été identifiées. Trois d'entre elles diffèrent par la présence dans leur domaine catalytique de régions de tailles variables de 14, 25 ou 39 (cumul de 25 et 14 acides aminés) acides aminés, rendant ces récepteurs non fonctionnels (Tsoulfas et al., 1993 ; Valenzuela et al., 1993). Enfin, comme pour le récepteur TrkB, le récepteur TrkC possède une isoforme sans domaine intra cytoplasmique catalytique. La fonction physiologique de ces récepteurs tronqués n'est pas précisément connue mais il est probable qu'ils agissent comme des modulateurs négatifs des voies de signalisation des Trk.

IV.2 - Les voies de signalisation

La dimérisation des récepteurs Trk, induite par la fixation d'un homodimère de NT, est l'événement dominant de déclenchement de la signalisation cellulaire pour les récepteurs Trk. Cependant, ce n'est pas le seul puisque des phénomènes d'auto-activation en absence d'un ligand ont été mis en évidence dans certaines lignées cellulaires. Après fixation du ligand et dimérisation, un phénomène d'autophosphorylation des résidus tyrosine des récepteurs Trk a lieu (Jing et al., 1992 ; Heldin, 1995 ; Cunningham et al., 1997), suivi de la phosphorylation de molécules substrats des Trk qui régulent la croissance cellulaire et la survie. Il semble que les tyrosines 490 et 785 (qui ne sont pas situées dans le domaine à activité kinase) soient des sites importants de phosphorylation et d'interaction des Trk avec des protéines adaptatrices. Les substrats activés assurent alors la propagation des cascades de signalisation. Parmi ces substrats, on trouve la PLC (Loeb et al., 1994), les protéines activatrices des Ras GTPases et la PI3-kinase (Kaplan et Stephens, 1994 ; Segal et Greenberg, 1996 ; Kaplan et Miller, 2000) (Figure 14).

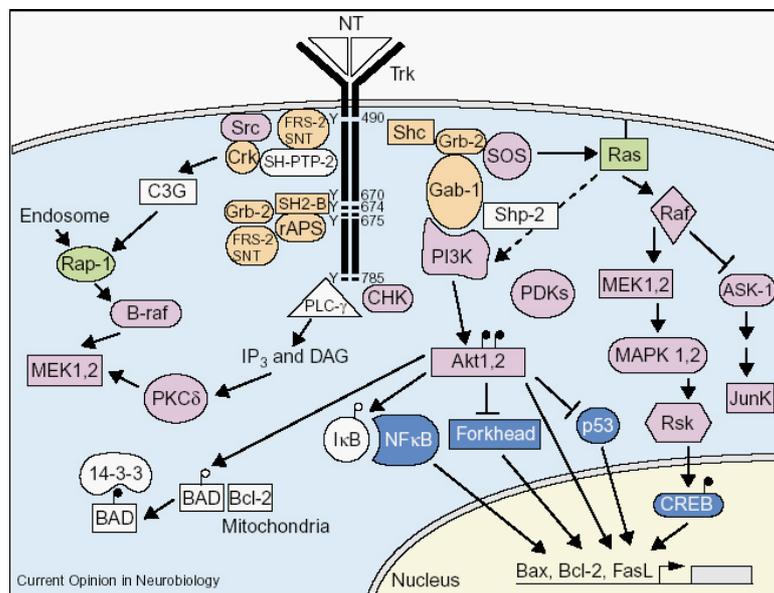


Figure 14. Schéma représentant les différentes voies de signalisation activées par les récepteurs Trk (Patapoutian et Reichardt, 2001).

- La voie de signalisation faisant intervenir les molécules Ras régule la survie neuronale et la différenciation grâce à l'activation des voies de signalisation de la PI3-K ou des MAPKs/extracellular signal-regulated kinase (ERK ou MEK) (Ballif et Blenis, 2001). La protéine adaptatrice Shc se lie à la tyrosine 490 phosphorylée, est phosphorylée à son tour et recrute Grb2 et "son of sevenless" (SOS) à la membrane. SOS active alors Ras et des protéines de la signalisation en aval : la PI3K ou c-Raf/B-Raf/MEK 1,2/MAPK 1,2 (Meakin et al., 1999). La p90 ribosomal S6 kinase (RSK) est alors activée par les ERK/MAPK 1,2. Il s'en suit la phosphorylation de CREB par RSK (Xing et al., 1998 ; Bonni et al., 1999) ainsi que la transcription de nombreux gènes impliqués dans la survie cellulaire.

Il existe une voie alternative d'activation des MEK 1,2. La protéine FRS-2 ("fibroblast growth factor receptor substrate") peut également se lier à la tyrosine 490 phosphorylée des Trk, être à son tour phosphorylée sur une tyrosine par les Trk et s'associer à différentes molécules comme le complexe Grb2/SOS (Meakin et al., 1999) ou Src.

- La PI3-K joue un rôle important dans la survie Trk-dépendante de nombreux neurones. Les récepteurs Trk peuvent activer la PI3-K selon deux voies différentes, dépendantes ou non de la voie des Ras. La voie Ras-indépendante fait intervenir le complexe Shc-Grb2. Suite à la phosphorylation de la tyrosine 490 des récepteurs Trk, Shc va venir se fixer sur cette tyrosine et va recruter Grb2 qui sera phosphorylé à son tour. Le complexe se lie ensuite aux "insulin receptor substrate" (IRS) 1 et 2 et au "Grb-associated binder-1" (Gab-1) qui pourront à leur tour se lier à la PI3-K. Leur association à la PI3-K permet alors son accès à ses substrats situés dans la paroi interne de la membrane plasmique (Holgado-Madruga et al., 1997 ; Yamada et al., 1997). Les lipides phosphorylés générés par la PI3-K permettent le recrutement de la sérine/thréonine kinase "3-phosphoinositide-dependent kinase-1" (PDK-1 ; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000) et de son substrat, Akt (Bellacosa et al., 1991 ; Coffey et Woodgett, 1991 ; Jones et al., 1991). PDK1 active Akt et Akt phosphoryle des molécules qui régulent la survie neuronale, comme par exemple Bax, BAD (Datta et al., 1997 ; Del Peso et al., 1997) la caspase-9 (Cardone et al., 1998 ; Rohn et al., 1998), la kinase I κ B (Kane et al., 1999), la "glycogen synthase kinase-3" (GSK-3, Cross et al., 1995 ; Shaw et al., 1997 ; Pap et Cooper, 1998) et les membres de la famille des Forkhead (FKHR, Biggs et al., 1999 ; Brunet et al., 1999). Cependant, la PI3-K peut également, comme nous l'avons vu précédemment,

directement interagir avec Ras. C'est le cas dans les neurones, et l'inhibition de Ras supprime l'activité de la PI3-K due à la fixation du NGF sur les récepteurs Trk (Rodriguez-Viciana et al., 1994).

- La tyrosine 785 phosphorylée des récepteurs Trk permet l'interaction avec la PLC γ . Les Trk activent la PLC γ en la phosphorylant. La PLC γ peut alors hydrolyser les phosphatidyl inosides en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG) (Vetter et al., 1991). L'IP3 augmente alors le niveau de Ca²⁺ cytoplasmique, activant de nombreuses voies contrôlées par le Ca²⁺, alors que le DAG active la PKC δ , protéine impliquée dans la croissance neuritique et l'activation de la cascade des ERK (Corbit et al., 1999).

IV.3 - Fonctions des récepteurs Trk

L'activation des voies de signalisation par les récepteurs Trk provoque des conséquences assez différentes selon le type cellulaire. Dans la plupart des neurones, la fixation d'un ligand sur un récepteur Trk permet la survie cellulaire (Huang et Reichardt, 2001 ; Sofroniew et al., 2001). Dans d'autres cellules, les NT, par l'intermédiaire des récepteurs Trk, induisent la mitose et la différenciation des cellules sans effet détectable sur la survie. Dans certaines cellules tumorales, l'activation des récepteurs peut également provoquer l'apoptose des cellules (Kim et al., 1999). Ces différents effets sur la signalisation cellulaire pourraient être dus au fait que les molécules, décrites précédemment et intervenant dans la signalisation cellulaire, ne sont pas forcément toutes exprimées dans chaque type cellulaire (Sakai et al., 2000). Les récepteurs Trk peuvent également être responsables des effets chémoattractifs ou chémorépulseurs des neurones, induisent et dirigent les cônes de croissance (Song et Poo, 1999) et la croissance neuritique et sont également impliqués lors du développement (Mendell et al., 1999).

V - LE RECEPTEUR FAS

Le récepteur Fas appartient à la superfamille des récepteurs au TNF/NGF, superfamille qui est caractérisée par la présence de 2 à 5 domaines riches en cystéine situés dans la partie extra-cellulaire du récepteur. Dans cette famille, Fas (également appelé CD95 ou Apo1) est le mieux décrit des récepteurs de mort, et est également caractérisé par la présence d'un DD intra-cellulaire crucial dans l'induction du signal pro-apoptotique. Le récepteur Fas peut ainsi induire la mort des cellules mais également déclencher la prolifération et la différenciation, promouvoir la progression des tumeurs et l'angiogénèse ou induire la sécrétion des cytokines et l'expression de l'intégrine.

V.1 - Structure de la protéine Fas

Fas est une protéine de 335 acides aminés. Son poids moléculaire varie de 45 à 52 kDa (Oehm et al., 1992) suivant les études, probablement en raison de différences de glycosylation du récepteur (Keppler et al., 1999). De plus, des formes solubles du récepteur ont été décrites et sont générées par un épissage alternatif du transcrit au niveau des régions codant le domaine transmembranaire. Elles contribuent à la régulation de l'apoptose induite par FasL (Cheng J et al., 1994 ; Papoff et al., 1999).

V.1.A - Partie extra-cellulaire

La partie extra-cellulaire du récepteur Fas est composée des 156 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale. Elle est caractérisée par la présence de 3 CRD composés des acides aminés 28 à 65 pour CRD1, 65 à 112 pour CRD2 et 112 à 149 pour CRD3. Des travaux, réalisés à partir de récepteur Fas tronqué dans la partie extra-cellulaire, ont mis en évidence que les deux domaines les plus proches de la partie trans-membranaire correspondent à la zone de fixation du ligand de Fas. Cette région est appelée région LBD pour "ligand binding domain". Plus récemment, le troisième domaine a été identifié comme

étant la zone d'oligomérisation du récepteur, indépendante du ligand, et indispensable dans la transduction du signal apoptotique de Fas (Papoff et al., 1999). Cette oligomérisation indépendante du ligand est liée à la présence d'un domaine d'auto-association ou PLAD ("pre-ligand association domain") composée des acides aminés 1 à 65 du récepteur Fas (Siegel et al., 2000) (Figure 15).

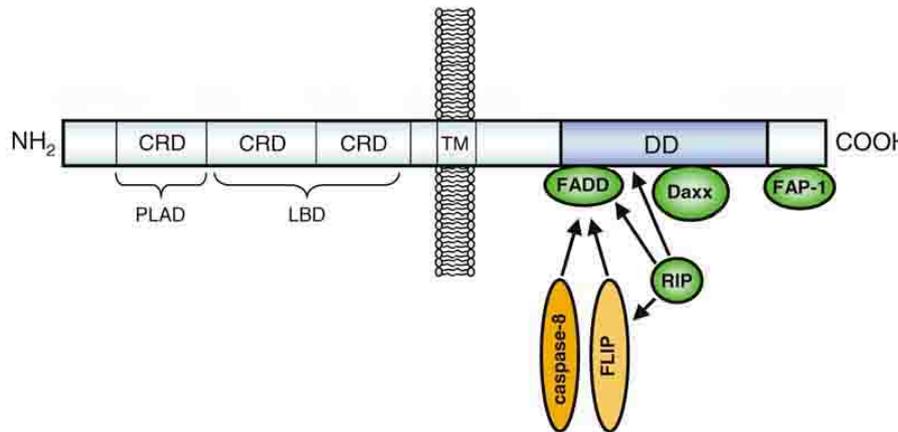


Figure 15. Composition du récepteur Fas (d'après Lambert et al., 2003).

CRD : domaine riche en cystéine ; PLAD : domaine de pré-association ; LBD : domaine de liaison du ligand ; TM : domaine transmembranaire ; DD : domaine de mort

V.1.B - Partie intra-cellulaire

La partie intra-cellulaire du récepteur Fas ne contient aucune séquence consensus qui pourrait prédire la présence d'une activité enzymatique (Sartorius et al., 2001). Les 15 résidus de la partie C-terminale de Fas servent de zone d'interaction avec la protéine tyrosine phosphatase FAP-1, et leur délétion entraîne une augmentation de l'apoptose transmise par Fas (Sato et al., 1995). Une zone de 68 résidus hautement conservée entre Fas et le TNF-R1 correspond au DD de Fas (Itoh et al., 1991) (Figure 15). Ce domaine comporte notamment le résidu Valine 238 dont la mutation chez les souris *lpr^{cg}* abolit le signal apoptotique induit par le récepteur Fas. Le récepteur va également interagir avec deux molécules adaptatrices, FADD et Daxx, qui aboutissent à l'activation de voies de signalisation. Enfin, un site de phosphorylation a été mis en évidence en dehors du DD, au niveau de la zone proximale (Kennedy et al., 1999).

V.2 - Voies de signalisation induites par le récepteur Fas

V.2.A - Initiation du signal

Il a longtemps été supposé que FasL sous forme homotrimérique engageait trois monomères du récepteur Fas, et que ce phénomène conduisait à l'assemblage d'un récepteur trimérique et à l'agrégation de ses DD sous la membrane (Orlinick et al., 1997).

Il est maintenant clair que non seulement le récepteur Fas possède la capacité de s'assembler en trimères indépendamment de l'engagement de son ligand, mais que ce pré-assemblage en trimères constitue un pré-requis à la liaison de FasL, et par conséquent à la transmission du signal de mort (Papoff et al., 1999 ; Siegel et al., 2000). La région nécessaire à cette trimérisation de Fas, appelée PLAD, est constituée des 49 premiers acides aminés de la région N-terminale de la portion extra-cellulaire de Fas ; elle est donc parfaitement distincte du domaine de liaison à FasL. Ainsi, qu'il y ait absence ou présence du ligand, des monomères et des trimères du récepteur Fas co-existent dans la membrane plasmique. Le trimère de Fas ainsi formé permet probablement des changements de conformation des récepteurs et l'activation des voies de signalisation situées en aval. Des molécules adaptatrices constituées, entre autres, d'un domaine de mort sont recrutées. Ce sont les molécules FADD, RIP, FAP-1 et Daxx.

V.2.B - Transduction du signal

V.2.B.a - Voies apoptotiques

- Formation du complexe de signalisation de mort induite (DISC)

Le récepteur Fas ne possédant aucune activité enzymatique, le signal de mort doit être transmis par l'intermédiaire de protéines qui s'associent au récepteur après sa stimulation. La transmission du signal apoptotique de Fas passe par la formation d'un complexe multiprotéique formé des agrégats de Fas, de la protéine FADD et de la caspase-8. Ce complexe est nommé complexe de signalisation de la mort induite ou DISC.

La protéine FADD se fixe au récepteur Fas stimulé par son ligand ou par un anticorps agoniste (Kischkel et al., 1995), cette association étant réalisée grâce aux DD homologues entre les protéines FADD et Fas (Boldin et al., 1995 ; Chinnaiyan et al., 1995). L'extrémité N-terminale de FADD, quant à elle, possède un DED qui est indispensable au recrutement et à l'activation de caspases initiatrices, les caspase-8 ou -10. Ainsi, une protéine FADD possédant son domaine DD mais tronquée dans son domaine DED ne pourrait pas induire l'activation de l'apoptose (Chinnaiyan et al., 1996b).

Cependant, le DISC comporte à la fois des formes zymogènes et des formes activées de la caspase-8 (Muzio et al., 1996). Ainsi, l'activation du récepteur Fas permet de recruter FADD et la pro-caspase-8, puis la formation d'oligomères de pro-caspase-8 suffit à activer son auto-protéolyse et à libérer la sous-unité catalytique de la caspase-8 dans le cytoplasme (Martin et al., 1998 ; Salvesen et Dixit, 1999). La caspase-8 va alors cliver et activer la caspase-3 qui va initier une cascade de caspases effectrices. Ces dernières vont conduire de façon inéluctable à la mort de la cellule par apoptose (Slee et al., 1999). Il est important de noter que la caspase-8 est essentielle à la mort cellulaire induite par Fas (Varfolomeev et al., 1998).

L'ordre de la signalisation initiale de la voie de Fas a récemment été défini (Algeciras-Schimmich et al., 2002). Dans un premier temps, la fixation de FasL entraîne la formation de microagrégats du récepteur Fas. Le DISC est alors formé, selon un processus faisant intervenir les filaments d'actine, et la caspase-8 est activée, cependant avec trop peu d'efficacité pour la transduction d'un signal apoptotique. Néanmoins, l'obtention de caspase-8 activée permet la formation à la surface cellulaire de larges regroupements membranaires de protéines Fas, ce processus mettant en jeu la voie des sphingomyélinases (Gulbins et Grassme, 2002). Les regroupements membranaires de récepteurs Fas vont à leur tour augmenter le signal transmis ainsi que l'activation de la caspase-8 afin d'induire le signal apoptotique. Enfin, le complexe Fas/FasL est internalisé, grâce à la formation de vésicules d'endocytose, par un processus encore mal défini (Figure 16).

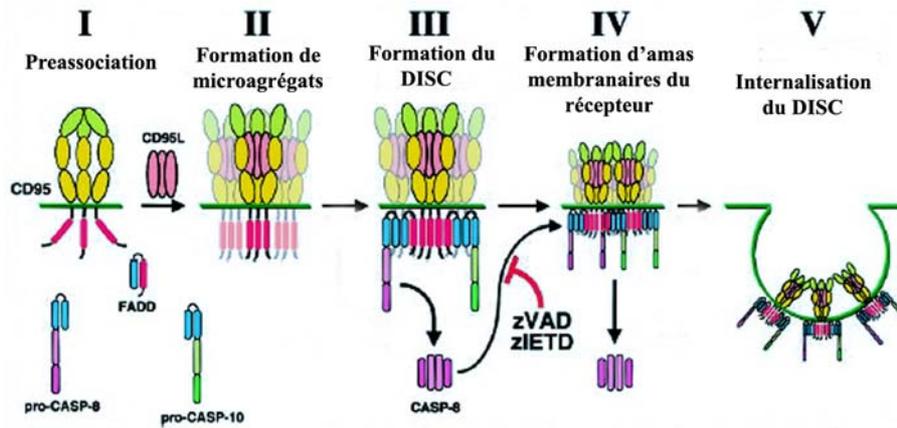


Figure 16. Modélisation du signal initial de l'activation de la voie Fas (Algeciras-Schimmich et al., 2002).

- Rôle de la voie mitochondriale : cellules de type I et de type II

L'importance de la voie mitochondriale a été démontrée dans la mort induite par Fas, au moins dans certaines cellules (Fulda et al., 1998). Deux types de cellules ont alors pu être définis en fonction de la voie apoptotique empruntée en aval du récepteur Fas (Scaffidi et al., 1998) (Figure 17).

Les cellules de type I (SKW6.4, H9...) (Scaffidi et al., 1998) fonctionneraient de façon indépendante de la signalisation apoptotique de la voie mitochondriale et utiliseraient uniquement l'activité directe des caspases-8 et -3, selon le processus décrit précédemment. L'apoptose survient alors rapidement.

Les cellules de type II (Jurkat, CEM...) (Scaffidi et al., 1998) feraient intervenir quant à elles l'activation de la voie apoptotique mitochondriale et le relargage du cytochrome c. Les quantités de pro-caspase-8 recrutée et clivée au niveau du DISC varient entre les deux types de cellules (faible dans les cellules de type II et importante dans les cellules de type I). L'apoptose survient, dans ce cas, moins rapidement que dans les cellules de type I. Ces deux types de cellules convergent cependant vers l'activation de la caspase-3.

Un membre de la famille de Bcl-2, la molécule Bid (Luo et al., 1998), constitue un des liens entre la voie du récepteur Fas et la voie mitochondriale (Li HL et al., 1998). Ainsi, la caspase-8 activée clive la protéine Bid et génère un fragment qui est transféré du cytoplasme à

la mitochondrie. Ce segment de Bid se lie à la protéine Bax, un autre membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 présent sous forme monomérique dans le cytosol, et entraîne son oligomérisation et son intégration dans la membrane externe mitochondriale. Ce processus déclenche l'ouverture de mégapores mitochondriaux qui vont être à l'origine de la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et de la libération du cytochrome c (Eskes et al., 2000). D'autre part, une seconde protéine faisant la jonction entre les deux voies a été identifiée. Il s'agit de la protéine régulatrice BAR ("bifunctional apoptosis regulator") (Zhang H et al., 2000), qui possède la capacité de s'associer à la fois aux molécules anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-xL (*via* un domaine d'interaction protéine-protéine SAM "sterile-alpha motif") et à la caspase-8 (*via* un domaine DED-like). Dans les cellules de type II, pour lesquelles une amplification du signal d'activation est nécessaire et met en jeu la voie mitochondriale, la mort induite par Fas serait modulée par des protéines de la famille Bcl-2.

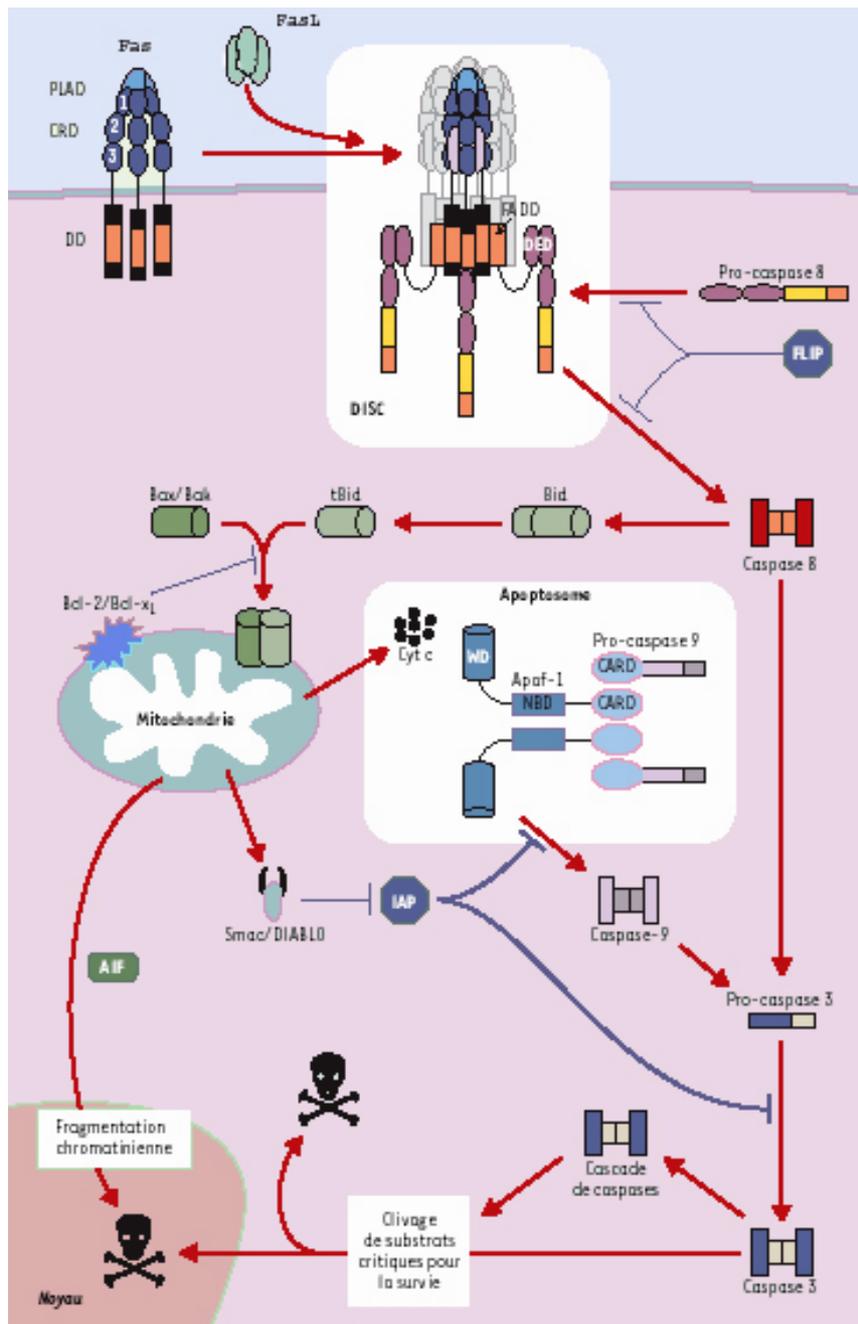


Figure 17. Voies d'activation de Fas dans les cellules de type I ou de type II (Couzinet et al., 2002).

V.2.B.b - Voie proliférative

L'activation du récepteur Fas peut également déclencher la prolifération de différents types cellulaires comme des cellules T stimulées par leur récepteur TCR, des thymocytes humains purifiés (Alderson et al., 1993) ou encore des fibroblastes humains de peau pour

lesquels la simple stimulation de Fas suffit à entraîner une prolifération significative (Freiberg et al., 1997 ; Jelaska et Korn, 1998). Néanmoins, même si FasL peut induire l'activation du facteur moléculaire de prolifération ERK1/2 sur des fibroblastes en privation de sérum (Ahn et al., 2001), selon les conditions utilisées, l'activation de Fas peut également induire l'apoptose des fibroblastes (Freiberg et al., 1997 ; Jelaska et Korn., 1998). A l'heure actuelle, les voies de signalisation empruntées après stimulation de Fas pour aboutir à la prolifération des cellules restent à déterminer mais il semble que FADD, FLIP, la caspase-8 et la voie de ERK interviennent (Zhang et al., 1998 ; Thome et Tschopp, 2001 ; Kennedy et al., 1999 ; Shinohara et al., 2000).

Cependant, l'étude de la prolifération de cellules T humaines purifiées et activées par la stimulation de Fas semble mettre en évidence l'implication d'une activation de caspases sans induction de l'apoptose (Miossec et al., 1997 ; Wilhelm et al., 1998 ; Alam et al., 1999 ; Kennedy et al., 1999). Ainsi, l'activation de caspases dans des cellules T polyclonales stimulées a pu être fonctionnellement reliée à la prolifération induite par le TCR (récepteur des cellules T) puisque celle-ci est bloquée en présence d'inhibiteurs de caspases à large spectre (Kennedy et al., 1999 ; Alam et al., 1999). Il a également été montré que la stimulation du TCR, entre autres conséquences, entraîne l'augmentation de l'expression de FasL (Nagata et Golstein, 1995). Ces différents résultats suggèrent qu'il pourrait exister une boucle autocrine d'activation de FasL et du récepteur Fas, régulée par le TCR, et conduisant à une voie de signalisation non apoptotique mais caspase dépendante, indispensable à la prolifération des cellules T activées (Kennedy et al., 1999).

De plus, un antagoniste de Fas, le Fas-Fc, peut bloquer la prolifération des cellules T stimulées par des quantités suboptimales d'un anticorps anti-TCR. Malgré tout, ce phénomène n'est pas observé avec de fortes concentrations d'anticorps anti-TCR, ce qui suggère que d'autres récepteurs de mort tels que TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3 ou DR6 peuvent se substituer à la voie de Fas (Kennedy et al., 1999). L'implication de ces autres récepteurs pourrait également expliquer pourquoi les souris déficientes en récepteur Fas (souris *lpr*) (Watanabe-Fukunaga et al., 1992) ou en FasL (souris *gld*) (Ramsdell et al., 1994) ne présentent pas de défaut de prolifération des cellules T.

Même si l'activation des caspases suite à la stimulation du TCR a été clairement établie (Kennedy et al., 1999 ; Alam et al., 1999), la nature de ces caspases et de leurs

substrats reste controversée. Le rôle de l'activation de la caspase-8 reste cependant important dans certains types cellulaires, comme cela a été démontré pour les lymphocytes T murins (O'Reilly et al., 2004). De plus, une étude a mis en évidence l'activation de la caspase-8 mais sans clivage de la caspase-3 ni de son substrat, la PARP (Kennedy et al., 1999), alors que d'autres travaux ont montré l'activation des caspases-3, -6, -7 et -8 ainsi que le clivage sélectif de quelques substrats de la caspase-3 tels que la PARP (Alam et al., 1999). Il reste néanmoins que l'ensemble de ces travaux montre que la prolifération des cellules T induite par la voie de Fas est initiée par la caspase-8, qui s'autoactive après avoir été recrutée par FADD.

V.2.C - Régulateurs de la transduction du signal de Fas

V.2.C.a - Fas et NF- κ B

L'activation de NF- κ B et l'induction de l'apoptose, en particulier par les récepteurs de mort, sont liées par des boucles de rétrocontrôle inhibitrices. Ainsi, la voie de signalisation NF- κ B régule négativement l'apoptose induite par les récepteurs de mort en augmentant l'expression de protéines anti-apoptotiques. De plus, l'apoptose interfère avec l'activation de NF- κ B par l'intermédiaire des caspases qui clivent plusieurs des composants de la voie de signalisation de NF- κ B (Wajant et al., 2003). En outre, l'inhibition de l'apoptose médiée par la voie de Fas augmente fortement l'activation de NF- κ B (Mandal et al., 1996 ; Wajant et al., 2000). Même si les mécanismes exacts de cette activation par le récepteur Fas demeurent mal connus, il semble qu'ils fassent intervenir la protéine FADD et la caspase-8 (Hu WH et al., 2000). Bien que cette voie d'activation soit masquée par la voie apoptotique de Fas, elle peut être observée lorsque cette dernière est bloquée : l'activation de NF- κ B est associée à une augmentation de l'expression de la protéine FLIP (Kreuz et al., 2001) qui empêche l'activation de la caspase-8 par FADD et inhibe puissamment la voie apoptotique de Fas. De plus, FLIP va augmenter l'activation de NF- κ B (Kataoka et al., 2000) formant ainsi une boucle d'autoactivation. Les protéines RIP peuvent également s'associer au DD de Fas mais aussi interagir avec FADD et FLIP. Elles permettent l'activation de NF- κ B par l'intermédiaire de NIK ("NF- κ B-inducing kinase), activation qui aboutit à la translocation de NF- κ B dans le noyau (Yu et al., 1999 ; Meylan et al., 2002).

V.2.C.b - Fas et les protéines kinases activées par la mitose

Les cascades des MAPK sont formées par 3 voies fonctionnellement distinctes : les kinases régulées par des voies ERK, la voie de la kinase p38 et la voie de la JNK.

Les protéines RIP ont une activité sérine/thréonine kinase. Ainsi, RIP2 peut phosphoryler ERK et ainsi activer la voie des ERK indépendamment de MEK (Lambert et al., 2003).

La protéine Daxx (Yang X et al., 1997) est un répresseur de la transcription dépourvue de DD mais qui est néanmoins capable de s'associer avec le DD de Fas, dans une région distincte de celle de FADD. Elle est préférentiellement exprimée dans le noyau mais peut être transloquée dans le cytoplasme grâce à ASK1 ("apoptosis signalling kinase 1"). *In vitro*, Daxx potentialise l'apoptose induite par Fas, mais ne permet pas de compenser l'absence de FADD dans des lignées cellulaires en étant dépourvues. Deux mécanismes de signalisation indépendants sont activés. Ce sont la voie de JNK et SAPK ("stress-activated protein kinase") qui participent à la régulation de la prolifération cellulaire (Chang et al., 1998) et la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'activation des caspases (Torii et al., 1999). La molécule Daxx intervient également lors de phénomènes de survie cellulaire et de prolifération induits par Fas (Michaelson et al., 1999; Michaelson, 2000). Enfin, la délétion de Daxx est létale pour des embryons de souris et est accompagnée d'une apoptose massive, prouvant que cette molécule est un facteur de survie, au moins durant le développement.

Dans le contexte de l'activation de la voie Fas, la voie des JNK a été particulièrement étudiée pour son effet pro-apoptotique. L'activation des JNK par la voie de Fas est régulièrement associée à l'apoptose et est probablement transmise par les caspases (Cardone et al., 1997 ; Deak et al., 1998 ; Widmann et al., 1997 et 1998). De plus, plusieurs études ont montré que l'inhibition des caspases bloque non seulement l'apoptose, mais également l'activation des JNK (Lenczowski et al., 1997 ; Deak et al., 1998 ; Low et al., 1999 ; Sabapathy et al., 1999 ; Wilson et al., 1999 ; Rochat-Steiner et al., 2000). Cependant, dans la plupart des cas, l'inhibition des JNK n'a aucun effet ou seulement un effet modéré sur l'apoptose induite par Fas, montrant que l'activation des JNK n'est pas une étape obligatoire dans la mort de la cellule par la voie de Fas.

V.2.C.c - Fas et Protéine Kinase C

Plusieurs études ont montré que l'activation de la PKC peut réprimer l'apoptose cellulaire, et notamment l'apoptose induite par la voie de Fas (Gomez-Angelats et al., 2000 ; Herrant et al., 2002 ; Busuttil et al., 2002). Ainsi, dans la lignée lymphocytaire T humaine Jurkat, l'activation de la PKC diminue dès les premiers stades de l'apoptose induite par le récepteur Fas par deux mécanismes distincts (Ruiz-Ruiz et al., 1997) : le premier utilise la voie des MAPK tandis que le second, majoritaire, est un mécanisme MAPK-indépendant (Ruiz-Ruiz et al., 1999). Cette modulation de la voie de Fas par la PKC est réalisée en amont du recrutement de FADD et de la caspase-8 par une modification de l'efficacité de formation du DISC (Gomez-Angelats, 2001).

V.2.C.d - Sphingomyélinases, céramides, et regroupements membranaires du récepteur Fas

L'activation du récepteur Fas induit l'hydrolyse des sphingomyélines par des sphingomyélinases acides et neutres, permettant la libération de céramides (Hetz et al., 2002). Cependant, plusieurs études ont également montré que la voie de Fas n'était pas affectée en cas de déficit en sphingomyélinase acide, que ce soit chez des patients atteints du syndrome de Niemann-Pick (Cock et al., 1998) ou chez des souris déficientes pour cette enzyme (Santana et al., 1996). Par conséquent, le rôle exact joué par les céramides dans la voie de Fas reste à déterminer clairement, même s'ils ne semblent pas directement impliqués dans l'apoptose induite par Fas (Hsu et al., 1998).

Plus récemment, des études ont mis en évidence le rôle crucial des céramides dans le regroupement membranaire et la polarisation des récepteurs Fas à la membrane cellulaire. Ainsi, la libération de céramides entraînée par l'activation de Fas permet la formation dans la membrane de larges domaines enrichis en céramides (Gulbins et Grassme, 2002). Ces domaines servent alors de support pour le regroupement membranaire et la polarisation des molécules de récepteur Fas (Gulbins, 2003), phénomènes indispensables pour la transmission optimale du signal apoptotique par la voie de Fas (Cremesti et al., 2001 ; Scheel-Toellner et al., 2002). L'intégration du récepteur Fas dans les radeaux lipidiques a de ce fait été recherchée et les résultats obtenus restent controversés selon les études réalisées, quant à la présence ou l'absence de Fas (Cremesti et al., 2001 ; Algeciras-Schimnich et al., 2002 ; Rotolo

et al., 2005). De plus, O'Reilly et collaborateurs (2004) ont montré que FADD et la caspase-8 ne sont pas présents au niveau des radeaux lipidiques, même après stimulation de la voie de Fas par FasL, alors que d'autres études ont démontré le contraire (Eramo et al., 2004). Les études les plus récentes semblent cependant confirmer la présence du récepteur Fas et des molécules composant le DISC au niveau des radeaux lipidiques.

V.3 - Rôles physiologique et pathologique

Le récepteur de mort Fas a initialement été identifié comme un antigène présent à la surface cellulaire de lymphocytes B et de fibroblastes humains (Trauth et al., 1989 ; Yonehara et al., 1989). Des études ultérieures ont montré que Fas est exprimé physiologiquement et de façon constitutive dans de nombreux types cellulaires : lymphocytes B et T activés, hépatocytes, cellules épithéliales du colon (Strater et Moller., 2000) et de l'endomètre utérin (Tanaka et al., 1999), cellules myocardiques (Aoyama et al., 2002) ou encore cellules endothéliales (Lidington et al., 1999). Il est également largement exprimé au niveau des cellules du système nerveux, que ce soit au niveau de neurones (corticaux, sensoriels, hippocampaux ou motoneurones) ou au niveau de cellules gliales (oligodendrocytes, astrocytes, cellules microgliales et cellules de Schwann).

V.3.A - Rôle dans le système immunitaire

V.3.A.a - Régulation des populations lymphocytaires

Les interactions Fas/FasL permettent de contrôler la survie périphérique des lymphocytes et participent ainsi fortement au maintien de la tolérance immunitaire aux autoantigènes (Green, 1994 ; Ju et al., 1995). L'implication du récepteur Fas dans l'élimination périphérique des lymphocytes autoréactifs a été largement mise en évidence par l'étude des souris *lpr* et *lpr^{cg}* dont le gène Fas est invalidé (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Ces animaux présentent différents désordres auto-immuns liés à une prolifération lymphocytaire anormale, dont notamment une prolifération anarchique des lymphocytes T ainsi que leur accumulation dans la rate et les ganglions lymphatiques (hyperplasie). De plus,

le défaut d'élimination des lymphocytes B autoréactifs conduit à des anomalies auto-immunes liées à la production d'autoanticorps similaires à ceux observés au cours du lupus érythémateux systémique humain. Chez l'homme, différentes mutations de Fas ont été mises en évidence, associées à un syndrome immunoprolifératif auto-immun et, plus rarement, à une lymphadénopathie massive (Fisher et al., 1995 ; Rieux-Laucat et al., 1995). Ainsi, le récepteur Fas joue un rôle capital dans l'homéostasie des populations lymphocytaires B et T : il permet non seulement l'élimination des lymphocytes périphériques autoréactifs, mais induit également, après leur prolifération en réponse à un antigène, l'apoptose des lymphocytes activés (Krammer, 2000).

V.3.A.b - Elimination des cellules pathogènes

En plus de son implication dans le maintien de l'homéostasie des populations lymphocytaires, le récepteur Fas joue un rôle capital dans l'élimination des cellules tumorales, ou infectées par un virus. Ces cellules sont éliminées par les cellules T cytotoxiques activées qui expriment à leur surface FasL, leur permettant d'induire le suicide des cellules infectées ou en voie de tumorigenèse qui expriment physiologiquement le récepteur Fas (Figure 18). Néanmoins, un grand nombre de cellules tumorales parviennent à échapper à cette induction d'apoptose par le système immunitaire par deux types de mécanismes : l'inhibition de l'expression de Fas à leur membrane (Muschen et al., 2000) ou l'expression de FasL (Whiteside, 2002) qui déclenche l'apoptose des lymphocytes activés spécifiques exprimant Fas. D'autres cellules, tumorales ou infectées par un virus, échappent à ce suicide provoqué par le système immunitaire en développant une résistance à l'apoptose induite par la voie de Fas grâce à la surexpression de FLIP ("FLICE inhibitory protein", un inhibiteur de la voie des caspases), de Bcl2 ou de récepteurs tronqués ("decoy receptor") (Whiteside, 2002).

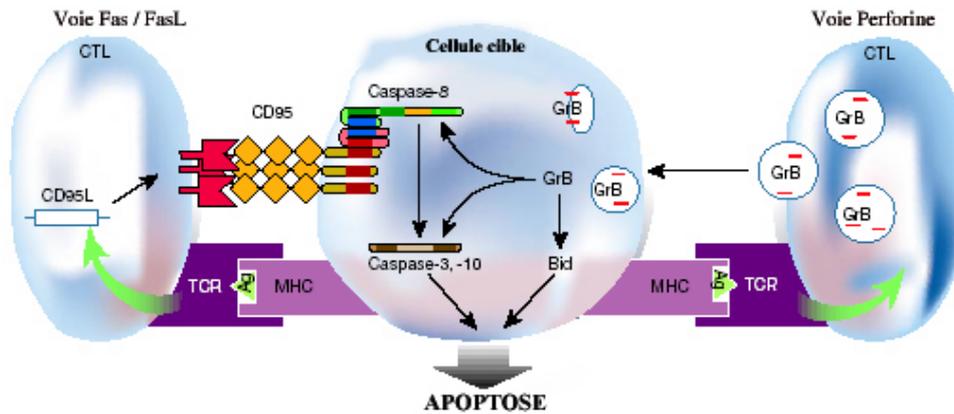


Figure 18. Elimination des cellules pathogènes par les lymphocytes T CD8+ (Bobe, 2002).

V.3.B - Fas et système nerveux

L'apoptose est aussi un mécanisme important intervenant de façon physiologique au cours de la formation du système nerveux embryonnaire, permettant l'élimination des neurones surnuméraires qui n'établissent pas de connexions synaptiques fonctionnelles (Oppenheim, 2000). Chez l'adulte, une augmentation de l'apoptose neuronale a été décrite dans un certain nombre de maladies neurodégénératives, telles que la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Alzheimer ou lors des accidents vasculaires cérébraux ischémiques (Honig et Rosenberg, 2000).

V.3.B.a - Fas et neurones

Bien que la voie du récepteur Fas soit la principale voie d'apoptose décrite dans de nombreux systèmes, l'expression de Fas par les neurones reste très peu documentée.

L'expression du récepteur Fas par des neurones a été mise en évidence dans différentes conditions pathologiques. Ainsi, il a été détecté dans les neurones de rats au cours de l'ischémie expérimentale (Sakurai et al., 1998). De plus, Fas est exprimé au niveau de neurones dans des conditions pathologiques humaines, comme la maladie d'Alzheimer (De la Monte et al., 1997), ou après exposition à l'interféron gamma (IFN- γ) (Rensing-Ehl et al., 1996). Enfin, chez le rat, les motoneurones embryonnaires coexpriment Fas et FasL et rentrent rapidement en apoptose par la voie de Fas lorsqu'ils sont cultivés en absence de

facteur trophique (Raoul et al., 1999) alors que d'autres travaux ont montré que Fas était présent au niveau de motoneurones en culture sans conditions de privation de SVF (Yi et al., 2000).

Le récepteur Fas est également exprimé dans des conditions normales. En effet, le récepteur Fas est exprimé transitoirement par des neuroblastes dans le cortex de rat et de façon plus importante à des stades plus différenciés dans des cultures primaires murines (Cheema et al., 1999). Des études immunohistochimiques réalisées *ex vivo* ont permis de détecter l'expression neuronale de Fas dans le cerveau de souris juvéniles normales, sans précision cependant sur la population de neurones impliquée (Park et al., 1998). En revanche, le récepteur Fas n'est pas détectable dans des cultures de cellules issues de cerveaux de fœtus humains à 12-16 semaines de gestation (Becher et al., 1998) alors que des travaux réalisés au laboratoire ont montré que Fas est exprimé constitutivement uniquement par les motoneurones humains fœtaux en culture et sur coupes *ex-vivo*. Le rôle de Fas dans les motoneurones est discuté. Son activation par son ligand naturel, FasL, n'induit que 30 % d'apoptose des motoneurones et implique la caspase-8 (Lautrette et al., 2003) (Voir en Annexe la publication n° 1). De ce fait, plusieurs hypothèses sont émises afin d'expliquer la survie des neurones soumis à un activateur de la voie de Fas. Ainsi, des travaux récents suggèrent que les fonctions non apoptotiques de Fas joueraient un rôle important dans le système nerveux. En effet, les souris *lpr* présentent une atrophie progressive des dendrites des neurones pyramidaux du système nerveux central (SNC) (Sakic et al., 1998). Plus récemment, l'étude de la lignée neuroblastique humaine SH-SY5Y et de cultures primaires de neurones sensitifs murins a mis en évidence que Fas induisait la croissance neuritique, par une voie indépendante de la caspase-8, liée à l'activation des ERK (Desbarat et al., 2003).

V.3.B.b - Fas et cellules gliales

Des études réalisées chez la souris ont montré une expression constitutive de Fas par les astrocytes cultivés et la microglie isolée du cerveau néonatal (Lee SJ et al., 2000) alors que, chez l'homme, l'expression de Fas par les cellules gliales est controversée. Ainsi, des travaux sur des cultures primaires de cellules gliales de fœtus humain ou de cerveau adulte ont mis en évidence une expression constitutive de Fas limitée aux astrocytes et pouvant être

augmentée par l'IL-1, l'IL-6, l'IFN- γ et le TNF- α (Choi et al., 1999). Cependant, dans une autre étude, Fas n'a été détecté qu'au niveau des oligodendrocytes dans le cerveau adulte (D'Souza et al., 1996), son expression étant également inductible par l'IFN- γ (Pouly et al., 2000). Enfin, une troisième étude, réalisée avec des cultures primaires de système nerveux central de fœtus humains (12-16 semaines de gestation), a permis de détecter l'expression de Fas uniquement au niveau des astrocytes (Becher et al., 1998). Cependant, le récepteur Fas a été détecté au niveau de lignées gliales et notamment au niveau de glioblastomes (Frankel et al., 2002).

VI - TRAIL-R

Parmi les derniers récepteurs identifiés comme appartenant à la superfamille des TNF récepteurs, les récepteurs au TRAIL ("tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand") ou TRAIL-R ont été identifiés.

VI.1 - Structure des récepteurs de TRAIL

Il existe 5 TRAIL-R (Figure 19) : deux d'entre eux possèdent un domaine de mort intracytoplasmique capable de transmettre le signal d'apoptose (DR4/TRAILR-1 et DR5/TRAILR-2). Les trois autres récepteurs [DcR1/TRAILR-3, DcR2/TRAILR-4, ostéoprotégérine (OPG)], agissent comme des récepteurs leurres et inhibent l'apoptose induite par TRAIL par une action compétitive avec les récepteurs de mort. TRAILR-3 et TRAILR-4 n'ont respectivement pas de DD et un DD tronqué non fonctionnel, et tous deux présentent des homologies avec les domaines extra-cellulaires de DR4 et DR5. L'OPG est un récepteur sécrété et soluble ayant une faible affinité pour TRAIL à température physiologique (Kimberley et Screaton, 2004).

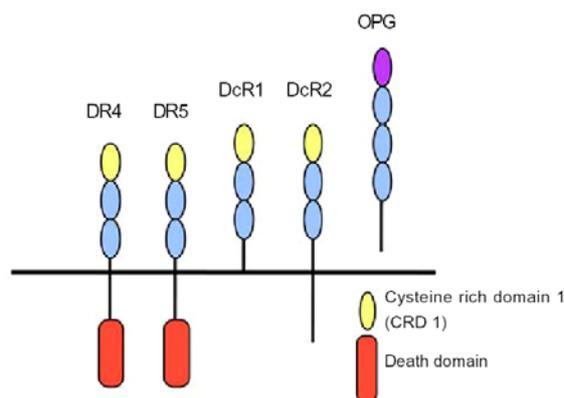


Figure 19. Représentation schématique de la structure des 5 TRAIL-R (Kimberley et Screaton, 2004).

VI.2 - Le ligand TRAIL

TRAIL (Apo2L) est une protéine transmembranaire de type II de 281 acides aminés qui a été identifiée et clonée par homologies de séquences avec Fas L (28%) et TNF (23%) (Wiley et al., 1995). Son domaine extra-cellulaire peut être clivé de la surface cellulaire par des métalloprotéases et donner des formes solubles ou intra-vésiculaires (Mariani et Krammer, 1998). Contrairement aux autres membres de la superfamille des TNF dont l'expression est transitoire et régulée par les cellules activées, TRAIL est exprimé constitutivement chez l'homme dans les lymphocytes circulants, la rate, le thymus, la prostate, les ovaires, l'intestin grêle, le colon et le placenta mais pas dans le cerveau, le foie ni les testicules (Wiley et al., 1995).

VI.3 - Voies de signalisation induites par les récepteurs TRAIL

Il existe de nombreuses similitudes entre les voies des récepteurs TRAIL et Fas. En effet, les voies d'induction de l'apoptose par les récepteurs TRAIL comprennent également la voie intrinsèque mitochondriale et la voie extrinsèque des récepteurs membranaires.

Comme pour le système Fas/FasL, TRAIL forme des homotrimères fixant trois molécules de récepteurs associées grâce aux PLAD (Figure 20) (Hymowitz et al., 1999). Un

atome de zinc fixant des cystéines de l'homotrimère est essentiel pour sa stabilité et son activité biologique optimale (Bodmer et al., 2000).

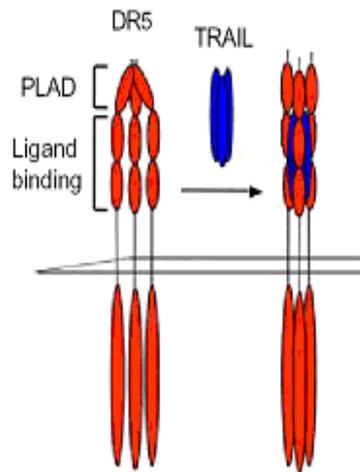


Figure 20. Implication de PLAD dans la trimérisation des TRAIL-R (d'après Kimberley et Screaton, 2004).

Comme pour FasL, l'interaction de TRAIL avec ses récepteurs TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 se traduit par la trimérisation des récepteurs et le recrutement des protéines adaptatrices FADD qui contiennent un DD et un DED qui va interagir avec une pro-caspase initiateur (-8 ou -10). Le complexe de signalisation DISC ainsi formé induit l'activation de la caspase-8 par clivage protéolytique de la pro-caspase-8. Cette caspase initiateur active ensuite une caspase effectrice, la caspase-3, qui à son tour va être impliquée dans une cascade de signalisation aboutissant à la mort cellulaire (Figure 21).

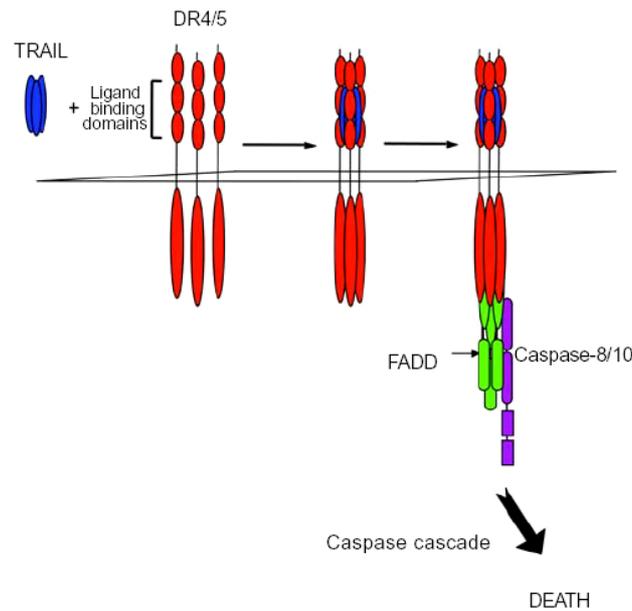


Figure 21. Schéma d'activation de la voie des caspases par les récepteurs de TRAIL (Kimberley et Screaton, 2004).

Il peut exister une interaction entre la voie des récepteurs membranaires et la voie intrinsèque mitochondriale. Elle dépend également de la caspase-8 qui active la voie mitochondriale par le clivage de la protéine Bid. Cette dernière permet ensuite la libération de cytochrome c et d'une protéine pro-apoptotique Apaf-1, responsable du clivage d'une autre caspase initiatrice, la pro-caspase-9 (activée lors de sa liaison avec Apaf-1). La caspase-9 recrute des caspases effectrices (caspase-7 et caspase-3) dont l'activation aboutit à la mort de la cellule. Cette interaction, retrouvée dans l'apoptose induite par FasL, est présente seulement dans certains types cellulaires (Scaffidi et al., 1998 ; Walczak et al., 2000) et permet une amplification du signal apoptotique induit par TRAIL (Ozoren et al., 2000 ; Ozoren et El-Deiry, 2002).

Finalement, d'autres voies de signalisation sont induites à la suite de la fixation du ligand TRAIL sur un de ses récepteurs. Ces voies de signalisation sont les mêmes que celles observées lors de l'activation du récepteur Fas (Figure 22) :

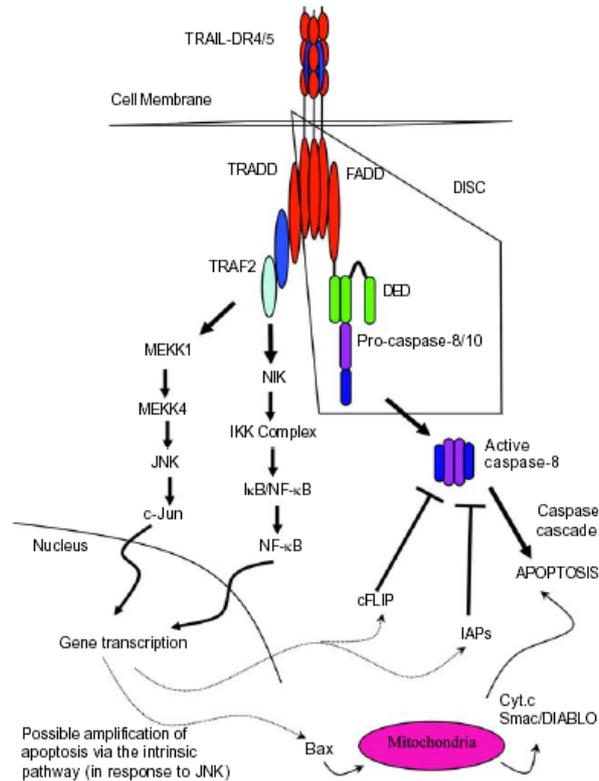


Figure 22. Voies de signalisation majeures activées par les récepteurs de TRAIL (Kimberley et Screaton, 2004).

VI.4 - Rôles physiologique et pathologique

Bien que la principale fonction attribuée à TRAIL semble être l'induction de l'apoptose, le rôle physiologique de ce ligand reste à déterminer chez l'homme. Les souris invalidées pour le gène codant TRAIL sont viables, fertiles et ne présentent pas d'anomalies hématologiques, suggérant que TRAIL ne serait pas essentiel pour le développement embryonnaire (Cretney et al., 2002). D'autres études réalisées chez la souris montrent que TRAIL pourrait intervenir dans la régulation du système immunitaire. En effet TRAIL est exprimé constitutivement au niveau des cellules "natural killer" (NK) hépatiques de la souris mais pas au niveau des NK circulantes ou des lymphocytes T. Le blocage partiel de TRAIL par des anticorps neutralisants empêche la cytotoxicité hépatique des cellules NK et accroît la survenue de métastases hépatiques *in vivo*. L'expression de TRAIL au niveau des cellules NK hépatiques de la souris et leur potentiel anti-métastatique semblent être régulés par l'IFN- γ qui est sécrété de manière autocrine par ces cellules NK (Takeda et al., 2001). Par ailleurs TRAIL

semble inhiber l'inflammation auto-immune chez un modèle de souris développant une arthrite auto-immune (Song et al., 2000) ou une encéphalomyélite allergique expérimentale (Hilliard et al., 2001).

Du fait de sa capacité à induire l'apoptose des cellules cancéreuses tout en préservant les cellules saines (Gura, 1997 ; Pollack et al., 2001), TRAIL est très vite apparu intéressant en cancérologie : tout d'abord sur des lignées cellulaires issues de tumeurs solides comme les tumeurs coliques, pulmonaires, mammaires, prostatiques, rénales, pancréatiques, thyroïdiennes et du système nerveux central puis sur des hémopathies comme le myélome multiple et certaines leucémies (Griffith et Lynch, 1998 ; Ashkenazi et Dixit, 1999). De plus, des études réalisées chez des souris porteuses de xénogreffes de lignées cellulaires humaines de tumeurs coliques, mammaires, de myélome multiple ou de gliome montrent une efficacité antitumorale remarquable de TRAIL (Ashkenazi et Dixit, 1999 ; Walczak et al., 1999 ; Roth et al., 1999 ; Mitsiades et al., 2000). Par ailleurs l'association de TRAIL à une drogue cytotoxique ou à la radiothérapie semble montrer une efficacité antitumorale synergique sur des lignées cellulaires de cancer du colon ou du sein (Gliniak et Le, 1999 ; Chinnaiyan et al., 2000).

Cependant, la plupart des cellules normales ainsi que certaines lignées cellulaires cancéreuses de mélanomes, de cancers coliques, ou de tumeurs du système nerveux central sont résistantes à l'apoptose induite par TRAIL (Griffith et Lynch, 1998 ; Zhang et al., 2000). Les mécanismes qui sous-tendent cette résistance restent à déterminer, certaines études argumentant en faveur de la modulation de l'expression des récepteurs de mort ou des récepteurs tronqués (Sheridan et al., 1997 ; Kim et al., 2000 ; Hersey et Zhang, 2001), d'autres émettant l'hypothèse de la surexpression de facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2/XL, IAP ou de c-FLIP (Walczak et al., 2000 ; Burns et El-Deiry, 2001). Les rôles respectifs de NF- κ B, de la p53, de la PPAR- γ ("peroxisome proliferator-activated receptor- γ ") ainsi que de certaines protéines kinases impliquées dans la modulation de la sensibilité de l'apoptose ont été discutés (Degli-Esposti et al., 1997; Griffith et Lynch, 1998 ; Göke et al., 2000).

L'ensemble des récepteurs de la famille des TNF-R participe donc à la régulation de l'homéostasie cellulaire et de ce fait peut être impliqué lors de l'apparition de tumeurs. En

effet, ils peuvent contribuer à la lutte anti-tumorale ou, au contraire, suite à la dérégulation de leur activation, conduire à l'apparition de tumeurs. Des cellules tumorales du système nerveux, telles que les neuroblastomes et les glioblastomes, peuvent exprimer ces récepteurs. Ainsi, leur activation interviendrait lors de la régulation de l'apoptose ou de la prolifération de ces cellules tumorales.

VII - Neuroblastomes et glioblastomes

VII.1 - Les neuroblastomes

Les neuroblastomes sont des précurseurs neuronaux issus de la division des cellules neuroépithéliales. Ce sont des neurones embryonnaires immatures qui peuvent encore se diviser contrairement aux neurones matures qui ne peuvent entrer en mitose.

Le neuroblastome, également appelé sympathoblastome, est une tumeur maligne développée aux dépens des cellules de la crête neurale, qui donnent naissance au système nerveux sympathique. Il s'agit de la tumeur solide la plus fréquente chez l'enfant (8 à 10 % des cancers avant 15 ans) et en particulier de l'enfant très jeune (moyenne d'âge 4 ans avec 90 % qui ont moins de 5 ans). Son incidence est de 1 à 3 cas pour 100 000 enfants âgés de 0 à 14 ans. Il n'y a pas de causes ni de facteurs reconnus qui favorisent la survenue d'un neuroblastome.

Le neuroblastome est découvert à partir de symptômes dus à la tumeur primitive (masse tumorale, en particulier abdominale, ou compression d'un organe voisin, telle la moelle épinière), à des métastases ou à une sécrétion endocrine (altération de l'état général, diarrhée, hypertension artérielle...).

Le neuroblastome peut se développer à partir d'une quelconque partie du système nerveux sympathique, le plus souvent au niveau abdominal. Au moment du diagnostic, la

tumeur peut être localisée au niveau d'un seul organe, au niveau local ou régional, ou être d'emblée disséminée. Les sites métastatiques les plus fréquents sont l'os, la moelle osseuse, le foie et la peau. Ainsi, la plupart des tumeurs localisées ont un pronostic excellent. Il en est de même pour celles des enfants de moins d'un an, indépendamment du stade de la tumeur. Certaines de ces tumeurs régressent même spontanément. Au contraire, environ 60 % des enfants de plus de un an présentent un neuroblastome d'emblée métastatique de mauvais pronostic.

La variété de la présentation clinique est en relation avec l'expression de certains marqueurs biologiques et moléculaires (ADN ploïdie, amplification de l'oncogène *n-myc*, expression des récepteurs Trk, perte du chromosome 1p, excès du 17q...). Ainsi, les tumeurs diffuses survenant chez l'enfant de plus d'1 an et surexprimant l'oncogène *myc* sont souvent chimiorésistantes et ont un mauvais pronostic (Berthold et al., 1990 ; Schweigerer et al., 1990). De même, l'expression du récepteur TrkB et de BDNF permet un système de survie autocrine des cellules neuroblastiques et induit la croissance neuritique. Elle est également associée à l'amplification de N-MYC et donc à un mauvais pronostic (Nakagawara et al., 1994). Au contraire, l'expression des récepteurs TrkA, qui induit la différenciation des neuroblastomes (Borrello et al., 1993 ; Eggert et al., 2000), et TrkC (Yamashiro et al., 1996) est plutôt associée à un bon pronostic. Ainsi, il est commun de dire que l'expression du récepteur TrkA est inversement corrélée à l'amplification de l'oncogène *n-myc*.

Les récepteurs de la superfamille des TNF-R ont été étudiés dans les cellules neuroblastiques. Ainsi, le récepteur Fas a pu être mis en évidence au niveau de certaines cellules neuroblastiques (Gross et al., 2001), cellules qui peuvent être (Barthlen et al., 1999 ; Riffkin et al., 2001) ou non (Bian et al., 2004) résistantes à l'apoptose induite par Fas. La sensibilité des cellules neuroblastiques ne dépend pas uniquement de l'expression du récepteur Fas mais de la présence ou non de la caspase-8 dans les cellules (Kisenge et al., 2003). Les récepteurs de TRAIL sont également exprimés dans les cellules neuroblastiques. Cependant, ces cellules sont en général résistantes à l'apoptose induite par TRAIL seul, du fait de l'absence d'expression de la caspase-8 (Eggert et al., 2001 ; Cui et Ding, 2005) alors qu'il peut être pro-apoptotique lorsqu'il est associé à d'autres molécules, comme l'IFN- γ ou l'acide betulinique (Fulda et al., 2004 ; Johnsen et al., 2004). Enfin, le récepteur p75^{NTR} peut être exprimé au niveau de cellules neuroblastiques associé ou non aux récepteurs Trk (Zhao et

Zhou, 2002). Ainsi, comme nous l'avons expliqué précédemment, l'action de ce récepteur sur les cellules varie selon les NT présentes dans le milieu environnant et selon l'expression différentielle des récepteurs Trk (Plo et al., 2004). C'est ainsi qu'il induit la survie de cellules LAN5 (Lachyankar et al., 2003) ou au contraire l'apoptose de cellules SK-N-BE transfectées pour exprimer le récepteur p75^{NTR} (Bunone et al., 1997).

VII.1 - Les glioblastomes

Au cours du développement, les précurseurs gliaux donnent naissance aux astrocytes, oligodendrocytes, cellules microgliales, cellules choroïdiennes et cellules épendymaires dans le SNC, et aux cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique. Ainsi, les cellules gliales jouent un rôle essentiel dans la différenciation (Lemke, 2001) et la survie des neurones (Bar, 2000). Ces cellules assurent la nutrition des neurones, gèrent les connections inter-neuronales, régulent les neurotransmetteurs.

Les glioblastomes sont les tumeurs astrocytaires malignes (grade IV selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé) les plus indifférenciées du SNC et ils sont retrouvés le plus souvent au niveau des hémisphères cérébraux. Chez l'adulte, ce sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes (20 % de toutes les tumeurs intracrâniennes) avec une incidence de l'ordre de 3 nouveaux cas par an et pour 100 000 habitants, soit environ 2400 nouveaux cas par an en France. Ils surviennent à tout âge mais dans 70 % des cas entre 45 et 70 ans.

Les glioblastomes forment des masses molles, riches en vaisseaux sanguins, de 3 à 10 cm de diamètre, de couleur vineuse, hétérogènes avec des zones compactes actives et des zones de nécrose étendues, parsemées de vaisseaux thrombosés et qui infiltrent le tissu cérébral. Cependant, ces tumeurs ne sont pratiquement jamais associées à l'apparition de métastases. Ils s'entourent d'un œdème qui augmente la souffrance du cerveau. Typiquement, ils s'expriment par des signes d'hypertension intracrânienne qui s'associe souvent à des changements du comportement, à des crises comitiales, à des déficits neurologiques focaux.

Cette tumeur évolue rapidement, en 2-3 mois, et même après chirurgie, radiothérapie puis chimiothérapie, son pronostic reste sombre sauf si le glioblastome provient de la

transformation maligne d'un astrocytome de bas grade (glioblastome secondaire). La survie ne dépasse pas 1 à 2 ans après le diagnostic. Le traitement associe habituellement la chirurgie et la radiothérapie. La chimiothérapie est peu efficace en raison de problèmes de diffusion des molécules à travers la barrière hémato-encéphalique et surtout dans la zone tumorale. L'étoposide a cependant été étudié (Lavicka et al., 2001) et augmente légèrement la survie grâce à son effet cytotoxique. Lorsque la lésion est découverte chez un sujet relativement jeune et que l'accès est raisonnable, ces malades sont opérés puis soumis à une radiothérapie externe conventionnelle. Une rémission de très bonne qualité peut alors être obtenue pendant quelques mois. Si la tumeur est profonde chez un sujet âgé présentant un déficit neurologique peu susceptible de régresser, on se contente d'une radiothérapie palliative ou seulement de traitements combattant l'oedème cérébral à base de corticoïdes, comme par exemple la dexaméthasone. La dexaméthasone est un glucocorticoïde très souvent administré en association avec les chimiothérapies et il semble posséder un léger effet anti tumoral sur les cellules gliales, comme par exemple sur la lignée gliale humaine U-87 MG (Wang et al., 2004). Après un traitement complet, la moitié des malades de 50 ans vivent plus de 15 à 18 mois (survie médiane) tandis que la moitié de ceux de 70 ans meurent avant 5-6 mois.

Les anomalies génétiques des tumeurs semblent différentes selon qu'il s'agit d'un glioblastome primaire (*de novo*) ou d'un glioblastome secondaire (développé à partir d'une tumeur astrocytaire bénigne). En effet, parmi les quatre gènes suppresseurs de tumeurs (p53, Rb, p16/CDKN2 et PTEN/MMAC1) et les deux oncogènes (MDM2 et CDK4) fréquemment altérés dans les gliomes, la mutation du gène p53 semble plutôt associée à des tumeurs astrocytaires qui évoluent progressivement vers la malignité, alors que l'amplification de l'EGFR est plutôt associée aux glioblastomes *de novo* (Hoang-Xuan et al., 1999). De plus, l'expression de certaines protéines peut être associée à la malignité des cellules. Ainsi, la présence du récepteur Notch-1 est plutôt corrélée à un mauvais pronostic (Purow et al., 2005).

Comme c'est le cas pour les cellules neuroblastiques, les gliomes peuvent également être influencés par les récepteurs de mort. En effet, le récepteur Fas peut être exprimé au niveau d'astrocytomes ou de glioblastomes et induire l'apoptose de ces cellules (Kwon et al., 2001 ; Tani et al., 2001 ; Ciusani et al., 2002) ou avoir un effet pro-inflammatoire (Choi et al., 1999 et 2003) lorsqu'elles sont stimulées par FasL ou au contraire activer la prolifération selon un système d'activation autocrine des cellules co-exprimant Fas et FasL (Shinohara et

al., 2000). De même, les gliomes expriment différents récepteurs de TRAIL, selon le type cellulaire, mais leur ligand, TRAIL, induit de manière générale l'apoptose des cellules (Shinohara et al., 2001 ; Choi et al., 2002 ; Ciusani et al., 2005). Enfin, le récepteur p75^{NTR} a également été détecté au niveau de gliomes comme un récepteur qui régule leur apoptose (Weis et al., 2002 ; Bhakar et al., 2003).

VIII - Objectif des travaux

La détection et la caractérisation des récepteurs de la famille des TNF-R au niveau des cellules tumorales est un élément important qui pourrait permettre d'une part d'appréhender les mécanismes de survenue des tumeurs et d'autre part d'envisager des méthodes de lutte anti-tumorale.

L'objectif de ces travaux est d'étudier l'expression puis le rôle des récepteurs p75^{NTR}, Fas et TRAIL-R sur deux lignées cellulaires humaines issues du système nerveux : une lignée neuroblastique (SH-SY5Y) et une lignée de glioblastome (U-87 MG).

Dans un premier temps, l'effet de l'activation concomitante des récepteurs Fas et p75^{NTR} sur l'apoptose de cellules neuroblastiques a été étudié. Certaines voies de signalisation communes aux deux récepteurs et susceptibles de réguler leurs interactions ont également été recherchées.

Le récepteur Fas a ensuite été étudié dans la lignée de glioblastome humain, U-87 MG. L'effet de FasL associé à l'étoposide a tout d'abord été testé *in vitro* puis *in vivo* sur la lignée. En effet, l'étoposide (VP-16) est un inhibiteur des topoisomérases II fréquemment utilisé comme molécule anti-cancéreuse capable d'augmenter l'effet pro-apoptotique induit par l'activation du récepteur Fas dans différentes lignées cellulaires (Zhu et al., 2002 ; Akiyamam et al., 2003 ; Shimada et al., 2003).

L'hétérogénéité morphologique des cellules U-87 MG a ensuite été étudiée. Ainsi, des corrélations entre l'expression de différents marqueurs, dont le récepteur Fas, et les différentes sous populations cellulaires triées ont été recherchées.

Les récepteurs de TRAIL ont également été recherchés dans les lignées cellulaires neuroblastique et gliale humaines afin d'envisager l'étude de l'effet de TRAIL sur l'apoptose de ces cellules.

Enfin, dans une dernière partie, l'expression du récepteur p75^{NTR} a été recherchée dans la lignée gliale humaine U-87 MG.

Matériels et méthodes

I - Cultures cellulaires

I.1 - Lignée neuroblastique SH-SY5Y

La lignée neuroblastique humaine SH-SY5Y est issue du sous-clonage d'une lignée hétérogène SK-N-SH (la lignée a été gracieusement fournie par le Pr JM Muller, Pôle Biologie Santé, Poitiers, Waschek et al., 1989). Le milieu de culture est composé de RPMI 1640 (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (Séromed, Gibco, Paislay, Scotland) décomplémenté (SVFd) par chauffage à 56°C pendant 30 minutes, 2 mM de L-glutamine, 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine, 1 mM de pyruvate de sodium et 0,1 % de fungizone (Gibco) (Yi et al., 2000).

I.2 - Lignée gliale U-87 MG

Les cellules U-87 MG sont des cellules tumorales issues de glioblastomes humains (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VI). Ces cellules sont cultivées dans du milieu MEM avec sels de Earles (Gibco BRL) supplémenté avec 10 % de SVFd, 1,5 g/l de bicarbonate de sodium, 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium, 1 % d'acides aminés non-essentiels, 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 0,1 % de fungizone (Gibco).

I.3 - Conditions de culture

Ces lignées cellulaires sont composées de cellules adhérentes entretenues dans des flasques de culture de 25 cm² et maintenues à 37°C dans un incubateur sous 5 % de CO₂ et en atmosphère humide (95 %). Les cellules sont décollées des flasques par un traitement de 10 minutes à 37°C au versène (Gibco) ou à la trypsine à 0,25 % dans du milieu de culture sans sérum. Après inactivation de la trypsine par addition de milieu supplémenté en SVF, les cellules sont centrifugées à 200 g pendant 5 minutes, puis ensemencées à différentes densités selon les expérimentations. Les cellules décollées sont maintenues en culture pendant 3 jours avant toute manipulation afin de permettre la synthèse des protéines de surface dégradées par la trypsine. D'autre part, le versène est utilisé lors des expériences nécessitant une réaction antigène/anticorps immédiatement après décollement des cellules.

I.4 - Ensemencement des cellules

Les cellules sont ensemencées dans des flasques de culture de 25 cm² (10⁵ cellules/flasques) afin d'entretenir la lignée cellulaire et dans des plaques 6 puits (Nunc) (10⁵ cellules/puits) pour les études d'incorporation du BrdU par cytométrie en flux.

Pour réaliser les immuno-marquages qui seront analysés par cytométrie en flux, 2x10⁵ cellules sont déposées dans chacun des puits de plaques 6 puits.

Afin de réaliser les tests immunoenzymatiques d'étude de l'apoptose par dosage des nucléosomes solubles intra-cytoplasmiques par ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") ou des tests de prolifération des cellules par dosage de l'activité de la succinate déshydrogénase grâce au 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium bromide (MTT), 10⁴ cellules ont été déposées dans des puits de plaques 96 puits (Nunc, VWR, France).

Pour les études en immunofluorescence indirecte ou d'apoptose par la méthode TUNEL ("TdT-mediated dUTP nick end labelling"), 2 x 10⁴ cellules sont ensemencées par puits dans des chambres de culture de 8 puits (Lab-Tek, Nunc).

I.5 - Conditions de stimulation des cellules

Toutes les études de prolifération ou d'apoptose ont été réalisées après différents temps d'exposition à différentes molécules (Tableau 4). Certaines voies de transduction du signal ont été étudiées après leur activation ou leur blocage par les molécules suivantes :

Noms	Nature	Concentrations finales d'utilisation	Fournisseurs	Temps d'exposition
β NGF	NGF recombinant humain	50 μ M	ICN Biomedical (Irvine , CA, USA)	48 heures
rhBDNF	BDNF recombinant humain	50 μ M	Promega (Charbonnières, France)	48 heures
rh Super FasLigand	"Super Fas ligand" recombinant humain	Variable	Diaclone (Besançon, France) ou Alexis Biochemicals (Coger S.A., Paris, France)	48 heures
Z-IETD-FMK (IC8)	Inhibiteur irréversible de la caspase-8	50 μ M	Calbiochem (San Diego, CA)	48 heures
Manumycin A (MA)	Inhibiteur de la voie des sphingomyélinases neutres	50 μ M	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France)	48 heures
Etoposide	Inhibiteur des topoisomérases II	Variable	Sigma-Aldrich	48 heures
Neurotrophin Receptor Ab-1, clone NGFR5	IgG1 de souris anti-p75 ^{NTR}	50 μ M	NeoMarkers (Fremont, CA, USA)	48 heures
Brefeldine-A (BFA)	Toxine qui dégrade l'appareil de Golgi	10 μ g/mL	Sigma-Aldrich	2 heures

Acide nordihydro-guaiaretique (NDGA)	Toxine qui dégrade l'appareil de Golgi	10 μ M	Sigma-Aldrich	24 heures
<i>Killer</i> TRAIL	TRAIL recombinant humain	Variables	Alexis Biochemicals	48 heures
Z-VAD-FMK (PAN)	Inhibiteur général des caspases	20 μ M	Promega	48 heures

Tableau 4. Liste des molécules déposées sur les cellules.

II - Mise en évidence de la présence de transcrits codant les récepteurs

Ces techniques ont pour but de mettre en évidence la présence de transcrits codant les récepteurs d'intérêt au niveau des deux lignées cellulaires.

II.1 - Extraction d'ARN totaux

Toutes les techniques faisant intervenir des ARN sont effectuées en absence totale de RNAses (produits et matériel sans RNase) et dans la glace.

L'extraction d'ARN totaux des cellules a été réalisée grâce au SV Total Isolation System (Promega) selon les indications du fournisseur sur des cellules dans différentes conditions de stimulation.

Le "Tripure Isolation Reagent" (Roche) a également été utilisé. Après avoir décollé les cellules, 5 à 10 x 10⁶ cellules sont lysées dans 1 mL de réactif et la solution est maintenue

pendant 5 minutes à température ambiante afin d'assurer la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Le phénol, un puissant agent déprotéinisant contenu dans le réactif "Tripure Isolation Reagent", permet la séparation des protéines et des acides nucléiques. Deux cents μL de chloroforme sont alors ajoutés et le mélange phénol/chloroforme est incubé 10 minutes à température ambiante. Le chloroforme permet d'éviter la présence de traces éventuelles de phénol dans la phase aqueuse. Les solutions sont ensuite centrifugées 15 minutes à 12000 g afin de séparer les différentes molécules. Trois phases distinctes sont observées : la phase inférieure qui contient le phénol et le chloroforme, une couche intermédiaire composée des protéines et la phase aqueuse supérieure qui contient les acides nucléiques. Après transfert de la phase supérieure dans un tube, 500 μL d'isopropanol sont ajoutés et incubés pendant 5 à 10 minutes à température ambiante afin de précipiter l'ensemble des ARN. Une centrifugation à 12000 g pendant 10 minutes puis un rinçage des culots nucléiques à l'éthanol à 75 % sont ensuite réalisés. Une dernière centrifugation est réalisée pendant 5 minutes à 7500 g et après élimination du surnageant, les culots sont séchés pendant 10 minutes afin d'évaporer totalement l'éthanol. Finalement, les ARN totaux sont repris dans de l'eau stérile et solubilisés pendant 10 minutes à 65°C.

Afin de conserver l'intégrité des ARN, ceux-ci sont conservés à - 80°C.

II.2 - Synthèse d'ADN complémentaire (Transcription inverse : RT)

La transcription inverse permet la synthèse du brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un brin d'ARN, aboutissant à la formation d'une molécule hybride ARN/ADN. Cette synthèse est réalisée à l'aide d'une enzyme, la transcriptase inverse, et nécessite l'apport d'une amorce permettant l'initiation. Lors de notre étude, la synthèse d'ADNc, réalisée à partir d'ARN messagers, a été possible grâce à l'utilisation d'une amorce s'hybridant uniquement à la séquence polyadénylée située en aval des ARN messagers, un oligo(dT).

II.2.A - Selon le protocole de SuperscriptTM II RNase H⁻ Reverse transcriptase

A 1 µg d'ARN total sont ajoutés 500 ng d'oligo(dT), 10 nmoles de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et de l'eau. La solution est ensuite déposée pendant 5 minutes dans un bain à 65°C. Le tampon de l'enzyme et 100 mM de 0,1 M DTT sont alors ajoutés et ce mélange est incubé 2 minutes à 42°C, température optimale d'activité enzymatique. 200 unités de l'enzyme, la SuperscriptTM II RNase H⁻ Reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France), sont alors ajoutées et la synthèse d'ADNc est réalisée à 42°C pendant 50 minutes. La réaction est enfin stoppée en chauffant à 70°C pendant 15 minutes.

II.2.B - Selon le protocole AMV reverse transcriptase

La réaction de transcription inverse est réalisée grâce à un mélange contenant le tampon de l'enzyme (1X final), 5 mM de MgCl₂, 1 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), 1,6 µg d'oligo(dT), 50 unités d'inhibiteur de RNase, 1 µg d'ARN totaux, au moins 20 unités de l'enzyme AMV reverse transcriptase (Boehringer, Mannheim, Allemagne) et de l'eau stérile pour compléter à 20 µL. Après une incubation de 10 minutes à 25°C, la synthèse d'ADNc est réalisée à 42°C pendant 60 minutes. Finalement, la réaction est arrêtée en dénaturant la transcriptase inverse à 99°C pendant 5 minutes.

Les solutions contenant l'ADNc sont ensuite stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

II.3 - Amplification de l'ADNc par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de PCR a permis d'amplifier les transcrits de plusieurs récepteurs au niveau des lignées neuroblastiques et gliales.

La réaction est réalisée dans un microtube à PCR dans lequel sont mélangés 2 µL d'ADNc matriciel à amplifier, 10 pmoles de chacune des deux amorces spécifiques (amorces dites 5' et 3'), les quatre dNTPs, chacun à 0,2mM de concentration finale, le tampon

enzymatique à 1X et 1 unité de Taq DNA polymérase (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), dans un volume final de 25 μ L.

La réaction de PCR est ensuite réalisée sur un automate programmable (Applied Biosystem gene Amp, Applied, Foster City, CA) pourvu d'un bloc chauffant permettant d'obtenir les températures spécifiques de chacune des étapes. Une première étape de dénaturation de l'ADN est tout d'abord réalisée par chauffage à 92°C pendant 30 ou 40 secondes. L'hybridation des amorces est ensuite effectuée pendant 30 ou 40 secondes à une température calculée selon la longueur, la spécificité et la séquence nucléotidique des amorces. La température optimale d'hybridation d'une amorce, ou T_m , se calcule selon la formule : $4x (G+C) + 2x (A+T) - 5^\circ\text{C}$ (Cf tableau pour les températures d'hybridation). Finalement, le temps de polymérisation à 72°C varie de 30 secondes à 2 minutes en fonction de la taille de l'ADN. Ces trois étapes sont répétées durant 35 ou 45 cycles.

Les séquences des amorces 5' et 3' utilisées pour chacune des amplifications réalisées par PCR sont précisées dans le tableau 5 suivant :

Séquence référence	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Taille de la séquence à amplifier	Programme utilisé
β -Actine Swiss-Prot : X00351	Actine sens	5' CGT TGA CAT CCG TAA AGA CC3'	Des nucléotides 899 à 1129 soit 231 bases.	(3 min à 92°C) ₁ + (40 sec à 92°C + 40 sec à 61°C + 50 sec à 72°C) ₃₅ + (8 min à 72°C) ₁
	Actine anti sens	5' TGC TAC TCC TGC TTG CTG AT5'		
p75 ^{NTR} Genbank : M14764	p75.1	5' GTT CTC CTG CCA GGA CAA GCA GAA3'	Des nucléotides 517 à 794 soit 277 bases.	(3 min à 92°C) ₁ + (40 sec à 92°C + 40 sec à 61°C + 50 sec à 72°C) ₃₅ + (8 min à 72°C) ₁
	p75.2	5' CGT GCT GGC TAT GAG GTC TTG TTC T3'		
Fas Genbank : M67454	Fas 1	5' ATC GTC CAA AAG TGT TAA TGC C3'	Des nucléotides 54 à 534 soit 480 bases.	(3 min à 92°C) ₁ + (40 sec à 92°C + 40 sec à 61°C + 50 sec à 72°C) ₃₅ + (8 min à 72°C) ₁
	Fas 2	5' ACA AAG CCA CCC CAA GTT AGA T3'		

TRAIL-R1 Genbank : NM003844	R1.1	^{5'} CTG AGC AAC GCA GAC TCGCTG TCC AC ^{3'}	Des nucléotides 963 à 1468 soit 506 bases.	(5 min à 92°C) ₁ + (30 sec à 92°C + 30 sec à 64°C + 45 sec à 72°C) ₄₅ + (8 min à 72°C) ₁
	R1.2	^{5'} CCA AGG ACA CGG CAG AGC CTG TGC CAT ^{3'}		
TRAIL-R2 Genbank : NM003842	R2.1	^{5'} GCC TCA TGG ACA ATG AGA TAA AGG TGG CT ^{3'}	Des nucléotides 1370 à 1871 soit 502 bases.	(5 min à 92°C) ₁ + (30 sec à 92°C + 30 sec à 66°C + 45 sec à 72°C) ₄₅ + (8 min à 72°C) ₁
	R2.2	^{5'} CCA AAT CTC AAA GTA GGC ACA AAC GG ^{3'}		
TRAIL-R3 Genbank : NM003841	R3.1	^{5'} GAA GAA TTT GGT GCC AAT GCC ACT G ^{3'}	Des nucléotides 652 à 1263 soit 612 bases.	(5 min à 92°C) ₁ + (30 sec à 92°C + 30 sec à 63°C + 45 sec à 72°C) ₄₅ + (8 min à 72°C) ₁
	R3.2	^{5'} CTC TTG GAC TTG GCT GGG AGA TGT G ^{3'}		
TRAIL-R4 Genbank : NM003840	R4.1	^{5'} CTTTCCGGCGGCGTTCA TGTCCTTC ^{3'}	Des nucléotides 854 à 1317 soit 464 bases.	(5 min à 92°C) ₁ + (30 sec à 92°C + 30 sec à 66°C + 45 sec à 72°C) ₄₅ + (8 min à 72°C) ₁
	R4.2	^{5'} GTT TCT TCC AGG CTG CTT CCC TTT GTA G ^{3'}		

Tableau 5. Tableau récapitulatif des informations concernant les amorces utilisées lors des réactions de PCR.

Lors de chaque réaction d'amplification, un contrôle négatif de la réaction est réalisé en remplaçant les ADNc par de l'eau. Un contrôle positif basé sur l'utilisation des amorces de β -actine, citées dans le tableau 5, est également réalisé, la β -actine étant un composé ubiquitaire du cytosquelette. Il permet de vérifier l'intégrité des ADNc synthétisés.

II.4 - Electrophorèse sur gel d'agarose

Afin d'observer les résultats obtenus après chaque PCR, les séquences amplifiées sont séparées grâce à des gels d'agarose dilué à 1,5 % dans du tampon Tris Borate EDTA (Ehylène Diamine Tetraacétique Acide disodium) 1X (TBE 1X : Tris 50 mM, acide borique 50 mM, EDTA 1,25 mM, Sigma-Aldrich) et additionnés de 10 µg/mL final de bromure d'éthidium (BET, Sigma-Aldrich). Après polymérisation du gel, l'électrophorèse des échantillons de PCR additionnés de tampon de charge (bleu de bromophénol 2,5%, xylène cyanol 0,25% dans du glycérol, Sigma-Aldrich), est réalisée dans une cuve horizontale remplie de TBE 1X. Parallèlement, un marqueur de masse moléculaire (100 paires de bases, Promega) est déposé et permet de déterminer la taille des fragments obtenus. L'ADN est enfin visualisé sous éclairage UV après électrophorèse.

II.5 - Clonage

Après avoir vérifié leur pureté et leur taille par électrophorèse sur un gel d'agarose, les ADNc amplifiés par PCR sont clonés dans un vecteur, pGEM-T Easy Vector (Promega) (Figure 23) ou pCRII-TOPO (Invitrogen) (Figure 24). Ces deux plasmides contiennent, entre autre, le gène de résistance à l'ampicilline ainsi que le gène de la β-galactosidase (*lacZ*) dans lequel est cloné le fragment d'intérêt.

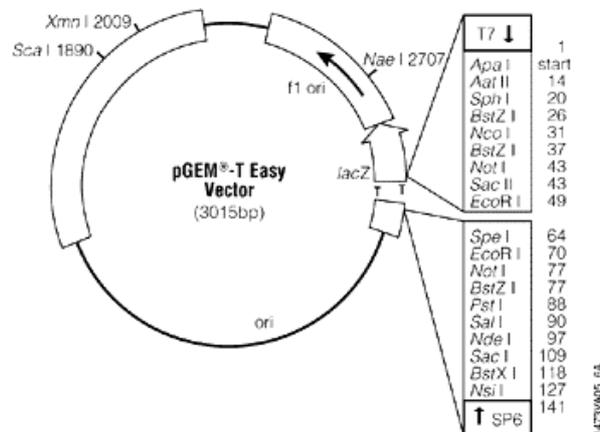


Figure 23. Carte de la composition du vecteur pGEM-T Easy Vector.

Pour le vecteur pGEM-T Easy, 5 μL de tampon de l'enzyme, 50 ng de vecteur pGEM-T Easy, 3 μL de l'ADNc amplifié par PCR et 3 unités de T4 DNA ligase sont mélangés dans un tube. La solution est délicatement mélangée à la pipette et la ligation réalisée à 16°C pendant 14 heures.

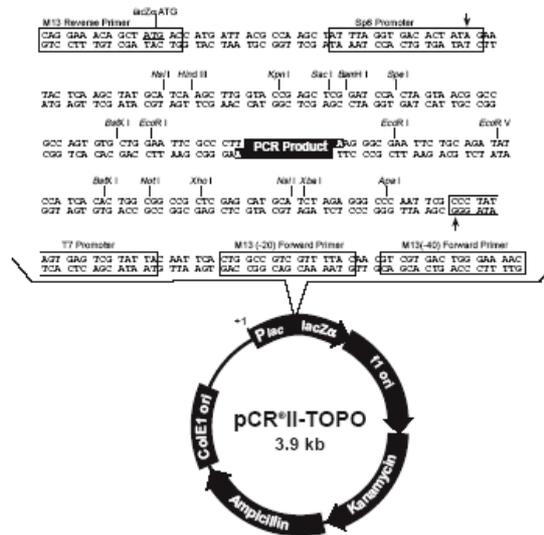


Figure 24. Carte de la composition du vecteur pCR II-TOPO.

Pour le vecteur pCR II-TOPO, 1 μL de solution contenant le vecteur, 1 μL de solution saline et 4 μL de produit de PCR sont délicatement mélangés et laissés 10 minutes à température ambiante.

II.6 - Transformation de bactéries thermocompétentes par les plasmides

Cinq μL de la solution de ligation contenant le plasmide pGEM-T Easy et l'insert sont ajoutés à un tube contenant 20 μL de bactéries thermocompétentes JM 109 (Promega). Le plasmide est alors introduit dans la bactérie par choc thermique : après 20 minutes dans la glace, le tube contenant le plasmide et les bactéries est transféré pendant 1 minute dans un bain-marie à 42°C puis immédiatement remis dans la glace pendant 3 minutes minimum.

Aux 6 μL de solution contenant le plasmide TOPO et l'insert sont ajoutés 50 μL de suspension de bactéries compétentes. Un choc thermique est également réalisé selon le même protocole que pour pGEM-T Easy. 250 μL de SOC sont ensuite ajoutés et la suspension est incubée pendant 1 heure à 37°C sous agitation.

Les bactéries transformées sont alors étalées sur un milieu gélosé (15 g d'agar pour 1 litre de milieu LB : NaCl 1%, Bactotryptone 1%, Extrait autolytique de levure 0,5%, pH ajusté à 7,4 avec NaOH 10 N, Sigma-Aldrich). Dans le milieu gélosé sont ajoutés de l'ampicilline (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Promega) et de l'X-Gal (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Promega) pour sélectionner les bactéries transformées par les plasmides pGEM-T Easy et TOPO et de l'IPTG (0,5 mM, Promega) afin de sélectionner les bactéries transformées par le plasmide pGEM-T Easy.

L'ampicilline contenue dans la gélose permet de sélectionner les bactéries résistantes à cet antibiotique, c'est-à-dire les bactéries contenant un plasmide. Le gène de la β -galactosidase, lacZ, permet de sélectionner les bactéries transformées par un plasmide contenant le fragment d'intérêt. L'IPTG agit alors comme inducteur du gène lacZ tandis que le X-Gal permet de mettre en évidence la présence d'une activité β -galactosidase en donnant une réaction colorée.

Ces boîtes de gélose sont alors placées dans une étuve à 37°C pendant au moins 12 heures. Les colonies bactériennes blanches sont composées de bactéries qui contiennent le plasmide et dont le gène lacZ n'est pas fonctionnel, c'est-à-dire dont le gène lacZ est coupé par le fragment d'intérêt.

II.7 - Mise en culture de bactéries transformées par un plasmide

Cette étape permet, par l'intermédiaire de la prolifération des bactéries sélectionnées, d'augmenter la quantité des plasmides d'intérêts.

Chaque colonie blanche composée de bactéries résistantes à l'ampicilline, et ayant donc intégré un plasmide, est déposée dans 2 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline. L'amplification des clones est réalisée sous agitation, 6 à 12 heures et à 37°C.

II.8 - Purification des plasmides amplifiés

La purification des plasmides contenus dans les bactéries a été réalisée selon le kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Après centrifugation et élimination du surnageant, les bactéries sont remises en suspension puis lysées dans un tampon de lyse. De la phosphatase alcaline est également ajoutée à la fin de l'étape de lyse. Elle permet l'inactivation des endonucléases qui pourraient dégrader l'ADN et la dégradation des protéines présentes dans le milieu. Une étape de neutralisation permet d'arrêter la lyse et diminue l'activité de la phosphatase alcaline. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et l'ADN plasmidique solubilisé est accroché sur la membrane d'une mini colonne lors du passage de la phase aqueuse. Après deux rinçages, l'ADN est élué de la membrane par simple ajout d'eau.

II.9 - Digestion enzymatique des plasmides purifiés

Cette étape de digestion par des enzymes de restriction permet de confirmer que les plasmides purifiés contiennent bien le fragment d'intérêt.

L'ADN plasmidique est digéré en présence d'un tampon 10 X adapté à chaque enzyme et de la quantité d'enzyme adéquate (il faut compter 1 unité d'enzyme pour 1 µg d'ADN à digérer). La digestion est alors réalisée à température optimale pour l'activité de l'enzyme pendant 2 heures et le résultat de la digestion observé par électrophorèse sur un gel d'agarose (comme décrit dans la partie II.4).

L'enzyme de restriction *Eco RI* (Gibco) est dans ce cas utilisée. En effet, des sites de restriction situés de chaque côté de l'insert permettent de séparer le plasmide et le fragment d'intérêt.

II.10 - Séquençage de l'ADN

Lors de cette étude, le séquençage a permis de vérifier que la séquence des fragments clonés dans les différents plasmides correspondait bien à la séquence attendue des récepteurs.

Le séquençage est réalisé selon la méthode des didésoxynucléotides de Sanger (Sanger et al., 1977) sur un séquenceur automatique (système ABI Prism 310, Perkin Elmer, Applied Biosystems). Cette méthode est basée sur l'interruption de la polymérisation d'un brin d'ADN grâce à la substitution du groupement hydroxyle en 3' du sucre par un atome d'hydrogène sur un désoxynucléotide. La formation de liaison phosphodiester est alors bloquée.

La réaction de séquence est réalisée par PCR unidirectionnelle avec de la Taq polymérase. Une solution contenant 400 à 700 ng (selon la taille de l'ADN) d'ADN plasmidique matriciel double brin, 3,2 pmoles d'amorce et de l'eau pour un volume final de 20 µL est tout d'abord dénaturée par chauffage à 100°C pendant 2 minutes 30 secondes et puis immédiatement déposée sur glace pendant 2 minutes 30 secondes. Dans un tube PCR sont mélangés l'ADN dénaturé et 3 µL de Big Dye (mélange réactionnel constitué de Taq polymérase, des quatre désoxynucléotides et des quatre didésoxynucléotides, chacun marqué avec une molécule fluorescente différente, Perkin Elmer) et le tampon de l'enzyme à la concentration de 1X finale.

Une réaction de PCR est alors réalisée. Celle-ci comporte 30 cycles de 5 secondes de dénaturation à 96°C, 10 secondes d'hybridation à 55°C et 4 minutes d'élongation à 60°C.

La précipitation des produits de PCR est réalisée avec 80 µL d'éthanol 80 % pendant 20 minutes sur la glace puis centrifugation à 14000 tour/min pendant 20 minutes à 4°C. L'ADN est ensuite lavé avec 200 µL d'éthanol 70 % puis à nouveau centrifugé pendant 20 minutes. Finalement, l'ADN est repris dans 17 µL de formamide désionisé, dénaturé pendant 2 minutes 30 secondes à 100°C puis immédiatement déposé sur glace pendant au moins 2 minutes. La lecture de la séquence est réalisée par un séquenceur automatique (ABI 310 Perkin-Elmer, Branchburg, NJ). Celui-ci est composé de capillaires contenant un gel d'acrylamide. Les fragments amplifiés par PCR sont donc séparés selon leur taille, passent devant un faisceau laser et l'émission renvoyée par la molécule fluorescente est captée par le séquenceur. Un système logiciel couplé au système optique permet l'analyse du signal émis et

détermine la nature de la molécule fluorescente et donc du didésoxynucléotide auquel elle correspond.

III - Etude des variations d'expression d'ARN par la technique de Northern-blot

Cette technique permet de transférer des acides ribonucléiques séparés selon leur taille dans un gel d'agarose sur une membrane de nitrocellulose dans le but de réaliser un appariement de ces acides nucléiques avec une sonde d'ADN spécifique et complémentaire. La présence ou l'absence d'ARN d'intérêt peut alors être déterminée et il est également possible d'étudier les variations quantitatives de ces ARN.

III.1 - Séparation des ARN par électrophorèse

Les extractions d'ARNs (réalisées selon le protocole "Tripure Isolation Reagent" décrit dans la partie II.1) ont dans ce cas été réalisées à partir de cellules à l'état basal ou après ajout de BDNF ou de Fas L pendant 24 heures.

Dix μg d'ARN totaux sont dénaturés dans un bain à 100°C , mélangés à du tampon de charge et séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% (1 % d'agarose, 2,2 M de Formaldehyde, du MOPS 1 X(200 mM MOPS, 50 Mm acétate de sodium, 10 mM d'EDTA, pH 7) et 1 mg/mL de BET, Sigma-Aldrich). La migration s'effectue en tampon MOPS 1X à voltage constant de 40 Volts pendant 14 heures. Après migration, il est possible de distinguer sous éclairage UV les deux types d'ARN les plus abondants dans les cellules humaines : les ARN ribosomiques 28S et 18S, respectivement de 5 et 2 kilobases.

III.2 - Transfert des ARN séparés par électrophorèse sur membrane de nitrocellulose

L'ARN étant monobrin, aucune dénaturation n'est nécessaire. En revanche, afin de débarrasser le gel du formaldéhyde qui pourrait gêner l'hybridation ultérieure de la sonde radiomarquée, le gel contenant les ARN est rincé à deux reprises pendant 20 minutes dans des bains de tampon salin sodium citrate (SSC) 10X, neutre (Chlorure de sodium 1,5M, citrate de sodium 0,15M, pH 7, Sigma-Aldrich).

Le transfert est dans ce cas un transfert passif réalisé par capillarité dans du tampon SSC 10X (Figure 25). Une plaque de verre est posée sur un bac contenant le tampon SSC 10X. Le gel contenant les ARN à transférer est déposé sur un pont de papier Whatman préalablement imbibé de tampon de transfert et dont les extrémités baignent dans ce même tampon. Une pièce de membrane découpée aux dimensions exactes du gel et imbibée de tampon est ensuite déposée sur le gel. Il est primordial de ne laisser aucune bulle d'air dans le montage, que ce soit entre le pont de papier Whatman et le gel ou entre le gel et la membrane. Sur la membrane sont ensuite appliqués un morceau de papier Whatman imbibé de tampon puis 2 morceaux secs. Une pile de papier absorbant est enfin déposée sur le haut de ce montage. Un poids permet de faciliter le transfert des acides nucléiques sur la membrane.

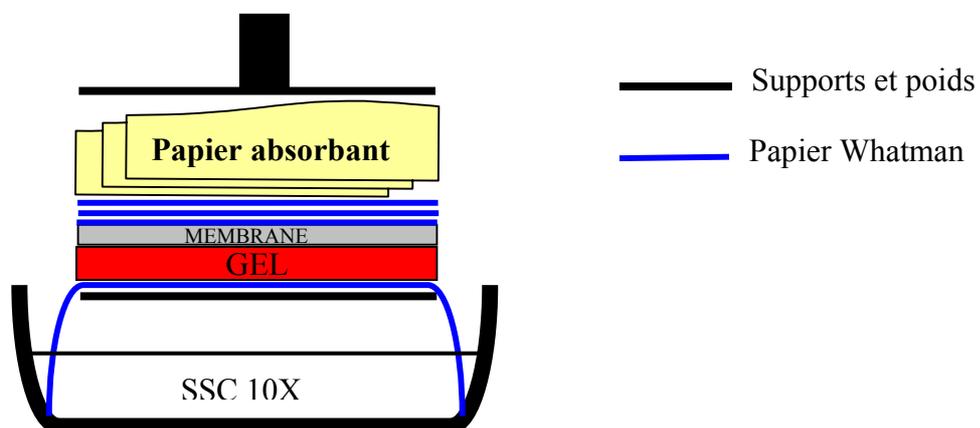


Figure 25. Schéma de la construction du système de transfert passif utilisé en Northern-blot.

Après un minimum de 6 heures de transfert passif, la membrane est lavée 20 minutes dans du SSC 5X. Les ARN sont fixés à la membrane par chauffage durant 2 heures à 80°C.

Les membranes peuvent alors être conservées dans un endroit sec et à l'obscurité.

Si les membranes sont destinées à être hybridées avec une sonde radioactive, celles-ci sont mises au contact de tampon d'hybridation (100 g/L Dextran Sulfate, 40 % formamide, 20 % SSC 20X, 1 % Tris 2M pH 7,5, 1 % Denhardt's 100 X et 20 mg/L d'ADN de sperme de saumon).

III.3 - Synthèse de la sonde radioactive

Les sondes radioactives sont réalisées par "random priming" avec incorporation d'un désoxynucléotide comportant un atome de phosphore 32 sur le carbone α , du dCTP-³²P.

III.3.A - "Random priming"

L'ADN qui servira de matrice à la synthèse de la sonde est tout d'abord extrait d'un plasmide par digestion enzymatique grâce à l'enzyme *Eco RI*. Le fragment obtenu est dénaturé 2 minutes 30 secondes à 100°C puis immédiatement déposé dans la glace. Une solution contenant 30 à 100 ng d'ADN matriciel, 1 à 5 μ g d'hexanucléotides (amorces pour la polymérisation) et 14 μ L d'eau est dénaturée à 100°C pendant 3 minutes et mise dans la glace afin de ramener la température du tube à 37°C. 2,5 μ L d'un mélange de dATP, dGTP et dTTP à 0,5 mM, 2,5 μ L du tampon 10 X de l'enzyme Klenow, 5 μ L de dCTP-³²P à 3000 Ci/mM et 1 μ L de polymérase, fragment de Klenow de la DNA polymérase I, sont ensuite ajoutés à la solution précédente. La polymérisation est réalisée pendant 1 heure à température ambiante puis 1 heure à 30°C. Finalement, l'enzyme est inactivée en chauffant pendant 1 minute à 68°C.

III.3.B - Purification de la sonde

Dans le tube contenant la sonde radioactive sont ajoutés 185 μ L d'EDTA à 10 mM et 0,1 % de sodium dodécyl sulfate (SDS, Sigma-Aldrich) afin de dénaturer la polymérase, puis

30 μL de NaCl 5 M, 10 μL de tRNA à 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et 250 μL de phénol chloroforme isoamyl alcool (Sigma-Aldrich) pour précipiter les sondes. Les solutions sont alors mélangées puis centrifugées 3 minutes à 13000 rpm. La phase aqueuse supérieure contenant la sonde est alors transférée dans un tube propre et additionnée de 2 volumes d'éthanol absolu. Après 30 minutes de précipitation à -20°C , les solutions sont centrifugées pendant 20 minutes à 13000 rpm et le surnageant est éliminé. Les culots sont alors rincés 2 fois avec 1 mL d'éthanol à 70 %, séchés 10 minutes à l'air, dilués dans 1 mL d'eau puis dissous pendant 5 minutes à température ambiante.

III.4 - Hybridation des membranes

A la solution de sonde purifiée sont ajoutés 500 μL d'ADN de sperme de saumon et 50 μL de NaOH 10 N. Après mélange de la solution par inversion du tube, la soude est neutralisée avec 500 μL d'HCl 1 N et sont ajoutés 140 μL de Tris 2 M (Sigma-Aldrich) et 20 mL de tampon d'hybridation. Le mélange est déposé dans un sac à hybrider contenant la membrane. Après avoir chassé les bulles d'air et scellé le sac, l'hybridation de la sonde est réalisée durant 14 heures à 40°C .

III.5 - Lavages des membranes et révélation

Les lavages permettent d'éliminer les excès de sonde radioactive ainsi que les brins radiomarqués accrochés non spécifiquement sur les membranes.

Une fois la sonde hybridée, la membrane est rincée 4 fois 15 minutes dans une solution contenant 0,1 % de SDS et du SSC 2 X à température ambiante puis dans une solution contenant 0,5 % de SDS et du SSC 0,1 X à 52°C . Finalement, la membrane est séchée puis exposée sur un film autoradiographique pendant plusieurs heures à -80°C .

IV - Détection de protéines par la méthode de Western-Blotting

Cette technique a été utilisée afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de protéines au niveau des deux lignées cellulaires.

IV.1 - Préparation des protéines

IV.1.A - Lysat cellulaire total

Pour chaque lignée, après un lavage en tampon salin phosphate (PBS), les cellules sont lysées dans du tampon de lyse (50 mM Tris HCl, 1 % NP-40, 0,25 % deoxycholate de sodium, 150 mM NaCl, 1mM EDTA (Sigma-Aldrich), 1mM de phényl méthyl sulfonyl fluoride, 2µg/mL de cocktail anti-protéase (Protease inhibitor cocktail set III, Calbiochem)) pendant 5 minutes à 4°C. Le lysat cellulaire est alors homogénéisé par aspiration et refoulement puis centrifugé à 14000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines cellulaires totales est séparé du culot lipidique et conservé à - 20°C.

IV.1.B - Dosage de la concentration protéique

La concentration en protéines totales est déterminée selon un dosage colorimétrique basé sur l'utilisation du réactif de Bradford (Sigma). La gamme étalon de la réaction est réalisée à l'aide d'une solution d'Albumine Sérique Bovine (BSA, Sigma) de concentration connue. Les densités optiques obtenues pour chaque solution sont mesurées grâce à un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.

IV.2 - Séparation des protéines par électrophorèse

Vingt à 25 µg de protéines ont été diluées au ½ dans du tampon de Laemmli modifié adapté pour les études électrophorétiques [Tris 0,25 M, pH 6,8 ; SDS 4 % ; glycérol 10 % ; bleu de bromophénol 0,006 % et β-mercaptoéthanol 2 %]. Elles ont ensuite été dénaturées à 100°C pendant 5 minutes.

Dans différents puits du système de migration sont déposés les lysats totaux de protéines, SH-SY5Y, U-87 MG et H4 (lysat de neurogliome humain, témoin positif d'expression des récepteur TrkB, H4, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) et un marqueur de poids moléculaire (Sigma-Aldrich) est utilisé comme référence pour déterminer les poids moléculaires.

La séparation protéique est réalisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide contenant du SDS ou SDS-PAGE. Les gels de résolution utilisés sont composés de 1,850 M de Tris HCl pH 8,8, de SDS à 10 %, de Temed à 0,05 %, d'ammonium persulfate à 10 % (Sigma-Aldrich) et d'une concentration variable en acrylamide (Sigma-Aldrich). Les concentrations d'acrylamide utilisées sont de 7,5, 10, 12 et 15 % et varient selon le poids moléculaire des protéines recherchées. L'électrophorèse est réalisée à ampérage constant, 40 mA, dans du tampon de migration (Tris 190 mM, glycine 150 mM, SDS 0,1 %, pH 8,5, Sigma-Aldrich).

IV.3 - Transfert sur membrane des protéines

Un transfert sur membrane de nitrocellulose (HAHY 0,45 µM, Millipore, St Quentin-Yvelines, France) est ensuite effectué (transfert semi-sec, Biométra, Polylabo, Strasbourg, France) pendant 45 minutes pour chaque gel à 12 volts dans du tampon de transfert (Tris 250 mM, glycine 200 mM, méthanol 20 %, pH 8,2).

Après transfert, la membrane de nitrocellulose est plongée dans une solution de rouge Ponceau (Sigma-Aldrich) afin de vérifier la qualité de l'électrophorèse et de s'assurer que les protéines ont bien été transférées.

IV.4 - Détection des protéines d'intérêts grâce à des anticorps spécifiques

Afin de bloquer les sites éventuels de fixation non spécifique des anticorps primaires sur la membrane et afin d'éviter toute réaction antigène/anticorps non spécifique, les membranes sont plongées dans une solution de PBS contenant 5 % de lait écrémé pendant 2 heures à température ambiante (TA).

Les bandes de nitrocellulose sont ensuite incubées pendant 14 h à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire, un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine recherchée, dilué dans du PBS contenant 3 % d'albumine bovine sérique (BSA, Jacques Boy Institute S.A., Reims, France).

Les anticorps primaires utilisés en Western-blot sont récapitulés dans le tableau 6 suivant :

Nom ou clone	Antigène	Hôte	Dilution	Fournisseur	Concentration en acrylamide du gel
NGFR5	Acides aminés 1 à 160 du domaine extra-cellulaire du récepteur p75 ^{NTR}	IgG1 souris	1/500	NeoMarkers (Fremont, CA, USA)	10 %
C-20	Partie C-terminale de la protéine Fas humaine	Polyclonal lapin	1/200 ou 1/300	Santa Cruz Biotechnology	12 %
H-181	Acides aminés 160 à 340 du domaine extra-cellulaire de la protéine Trk B humaine	Polyclonal lapin	1/200	Santa Cruz Biotechnology	7,5 %
H-137	Acides aminés 29 à 165 du domaine extra-cellulaire du récepteur p75 ^{NTR}	Polyclonal lapin	1/200	Santa Cruz Biotechnology	10 %

H-92	Acides aminés 266 à 357 du domaine intracellulaire du récepteur p75 ^{NTR}	Polyclonal lapin	1/800	Santa Cruz Biotechnology	10 %
440 10E 7B9	TRAIL-R1	Ig souris	1/100	Diaclone	12 %
B-K29	TRAIL-R2	IgG1 souris	1/100	Diaclone	12 %
434 9B9	TRAIL-R3	Ig souris	1/100	Diaclone	12 %
441 4E9	TRAIL-R4	Ig souris	1/100	Diaclone	12 %
B-Z1	Contrôle isotypique IgG1	IgG1 souris	Même concentration que l'anticorps primaire	Diaclone	
B-Z2	Contrôle isotypique IgG2a	IgG2a souris	Même concentration que l'anticorps primaire	Diaclone	
	Immunoglobulines irrelevantes de lapin	Polyclonal lapin	Même concentration que l'anticorps primaire	Dako Cytomation (Trappes, France)	

Tableau 6. Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés en Western-blot.

Après 3 lavages en PBS, la membrane est plongée dans une solution contenant des anticorps secondaires, anti-immunoglobulines (Ig) totales de souris ou de lapin couplés à la peroxidase (Dako Cytomation) fabriquées chez la chèvre, dilués au 1/1000 ou au 1/2000 dans du PBS pendant 1 heure. La révélation est effectuée en utilisant un réactif chémoluminescent (Abcys, France).

V - Détection des récepteurs membranaires par cytométrie en flux

La technique de cytométrie en flux a été utilisée afin de mettre en évidence la présence de protéines au niveau des lignées cellulaires mais également pour étudier les variations d'expressions de récepteurs dans différentes conditions de stimulation.

Les cellules SH-SY5Y ou U-87 MG sontensemencées dans des plaques de 6 puits (Nunc) à 2×10^5 cellules par puits. Après adhésion des cellules, celles-ci sont mises en présence de différentes molécules, FasL et BDNF, pendant 24 heures.

Les cellules sont tout d'abord décollées de leur support de culture par ajout de versène (Gibco BRL), rincées au PBS puis comptées. Chacune des centrifugations intermédiaires est réalisée à 250 g pendant 5 minutes.

Deux protocoles différents ont alors été utilisés :

a) Les cellules (2×10^5) sont transférées dans des tubes de cytométrie puis sont saturées en PBS contenant 1,5 % de BSA pendant 15 minutes. L'anticorps primaire, un anticorps monoclonal anti-p75^{NTR} (Clone NGFR, NeoMarkers) dilué au 1/40, ou un anticorps isotypique anti-IgG1 de souris (B-Z1, Diaclone ou Immunotech, Marseille, France), sont ensuite incubés pendant 15 minutes avec les cellules à 4°C et sont révélés par un anticorps anti-Ig de souris conjugué à l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC) (Dako Cytomation) dilué au 1/10 pendant 10 minutes à 4°C. Finalement, les cellules sont centrifugées et remises en suspension dans du PBS.

b) Les cellules (2×10^5), remises en suspension dans du versène contenant 10 % de SVF (V/SVF), sont déposées dans des tubes de cytométrie. Après perméabilisation des cellules grâce à du Triton X100 (Sigma-Aldrich) dilué à 0,1 % dans du PBS pendant 5 minutes et à 4°C, les anticorps primaires sont incubés pendant 30 minutes, à 4°C (Tableau 7) :

Nom	Spécificité	Hôte	Isotype	Dilution	Fournisseur
B-Z1	Contrôle isotypique	souris	IgG2a	Variable (même concentration que celle de l'anticorps primaire correspondant)	Diaclone
B-Z2	Contrôle isotypique	souris	IgG1	Variable (même concentration que celle de l'anticorps primaire correspondant)	Diaclone
	Contrôle isotypique	lapin		Variable (même concentration que celle de l'anticorps primaire correspondant)	Dako Cytomation
NGFR5	p75 ^{NTR} humain	souris	IgG1	1/40	NeoMarkers
Trk B (H-181)	Trk B humain	lapin	Polyclonal	1/100	Santa Cruz Biotechnology
Trk A (763)	Trk A humain	lapin	Polyclonal	1/100	Santa Cruz Biotechnology
440 3D5	TRAIL-R1	souris	Ig	1/10	Diaclone
B-K29	TRAIL-R2	souris	IgG1	1/10	Diaclone
B-D44	TRAIL-R3	souris	IgG1	1/10	Diaclone
441 4D9	TRAIL-R4	souris	Ig	1/10	Diaclone
UB2 couplé PE (Phyco-Erythrine)	Fas	souris	IgG1	1/5	Immunotech (Marseille, France)

NKH-1 couplé PE	N-CAM	souris	IgG1	1/5	Dako Cytomation
-----------------	-------	--------	------	-----	--------------------

Tableau 7. Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux.

Les cellules sont alors lavées en ajoutant 500 μ L de V/SVF puis incubées dans du V/SVF contenant un anticorps de porc anti-Ig de lapin couplé au FITC (Dako Cytomation) dilué au 1/100, pendant 30 minutes à 4°C. Finalement, les cellules sont rincées au V/SVF, centrifugées puis fixées dans du V/SVF contenant 1 % de paraformaldéhyde (PFA).

Des contrôles isotypiques et des contrôles d'accrochages non spécifiques de l'anticorps secondaire ont été réalisés lors de chaque manipulation.

L'analyse des marquages est réalisée grâce à un cytomètre en flux Epics XL-MCL Coulter (HIALEAH, Floride, USA). Chaque analyse a été réalisée sur au moins 20 000 cellules. Les résultats obtenus sont représentatifs de 3 manipulations indépendantes et ont permis de déterminer les intensités moyennes de fluorescence (IMF).

VI - Etude immunocytochimique par immunofluorescence indirecte

L'expression de protéines, à l'état basal ou dans différentes conditions de stimulation, a été étudiée par immunofluorescence sur les lignées cellulaires SH-SY5Y et U-87 MG.

Les cellules, à raison de 10^4 ou 10^5 par puits, ont étéensemencées dans des puits de plaques 8 puits Lab-Tek (Nunc). Après adhésion des cellules, celles-ci sont mises en présence de différents effecteurs pendant 24 ou 48 heures. Le milieu de culture est alors retiré et les cellules sont fixées grâce à une solution de PFA à 4% dans du PBS pendant 30 minutes à TA. Les cellules sont alors lavées 3 fois en PBS et, afin de permettre la détection d'antigènes intra-

cellulaires, elles sont perméabilisées par une solution d'alcool/acétone (V/V, Sigma-Aldrich) ou de Triton X-100 à 0,1 % dans de l'eau pendant 5 minutes à 4°C. Trois rinçages en PBS sont à nouveau réalisés et une étape de saturation visant à bloquer les sites de fixation non spécifiques est réalisée par incubation des cellules avec une solution de sérum d'agneau (Sigma-Aldrich) dilué à 10 % dans du PBS pendant 90 minutes ou 2 heures et à TA.

Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps primaires dilués dans la solution de saturation pendant 90 minutes à TA. Les anticorps primaires utilisés au cours de cette étude, leur spécificité, leur dilution et leur fournisseur sont indiqués dans le tableau 8 suivant :

Nom	Spécificité	Hôte et isotype	Dilution	Fournisseur	Propriétés
B-Z1 (couplé PE ou non couplé)		souris IgG2a	Variable (même concentration que celle de l'anticorps primaire correspondant)	Diaclone	Contrôle isotypique
B-Z2		souris IgG1	Variable (même concentration que celle de l'anticorps primaire correspondant)	Diaclone	Contrôle isotypique
		lapin	Variable (même concentration que celle de l'anticorps primaire correspondant)	Dako Cytomation	Contrôle isotypique
B-G27	Fas humain	souris IgG2a	1/20	Diaclone	
NGFR p75 (H- 137)	p75 ^{NTR} humain	lapin	1/50 ou 1/100	Santa Cruz Biotechnology	Reconnaît la partie extra- cellulaire du récepteur
2F11	Neurofila -ment	souris IgG1	1/50	Dako Cytomation	Marqueur des cellules neuronales

	(68 kDa)				
GFAP	Protéine gliale fibrillaire acide	lapin	1/50	Dako Cytomation	Marqueur des astrocytes
k _i -M7	CD-68	souris IgG1	1/50	Berhing (Rueil- Malmaison)	Marqueur des cellules microgliales
W6/32	HLA-ABC	souris IgG2a	1/50	Hybridome	Molécules du CMH de classe I humain
NGFR5	p75 ^{NTR} humain	souris IgG1	1/100	NeoMarkers	Reconnaît la partie extra- cellulaire du récepteur
NGFR p75 (H- 92)	p75 ^{NTR} humain	lapin	1/50	Santa Cruz Biotechnology	Reconnaît la partie intra- cellulaire du récepteur
Mannosi- dase II	Mannosi- dase II	Lapin	1/200	Chemicon International	Marqueur de l'appareil de Golgi
439 26H4H7	TRAIL-R1	souris	1/10	Diaclone	
B-D37	TRAIL-R2	souris	1/10	Diaclone	
B-F41	TRAIL-R3	souris IgG1	1/10	Diaclone	
441 4D9	TRAIL-R4	souris	1/10	Diaclone	
Trk A (763)	Trk A humain	lapin	1/100	Santa Cruz Biotechnology	
NKH-1 couplé PE	N-CAM	souris IgG1	1/5	Dako	Coulter, Fullerton, CA, USA

Tableau 8. Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence.

Après 3 lavages de 10 minutes en PBS, un anticorps secondaire anti-Ig de souris ou de lapin couplé à un fluorochrome (le type d'anticorps secondaire utilisé dépend de l'espèce et de l'isotype de l'anticorps primaire), dilué dans du PBS est déposé pendant 30 minutes sur les cellules à température ambiante. La liste des anticorps secondaires utilisés est indiquée dans le tableau 9 suivant :

Spécificité	Hôte	Conjugué	Fournisseur	Dilution
Ig totales de souris	Chèvre	Alexa Fluor 488	Molecular Probes (Leiden, Netherlands)	1/4000 ou 1/9000
Ig totales de souris	Chèvre	Alexa Fluor 594	Molecular Probes	1/4000 ou 1/9000
Ig totales de lapin	Chèvre	Alexa Fluor 488	Molecular Probes	1/4000 ou 1/9000
Ig totales de lapin	Chèvre	Alexa Fluor 594	Molecular Probes	1/4000 ou 1/9000

Tableau 9. Liste des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte.

Les radeaux lipidiques ont été détectés grâce à leur fixation avec la sous-unité B de la toxine cholérique couplée au FITC (Sigma-Aldrich), incubée pendant 20 minutes à 4°C et diluée au 1/200 dans du PBS.

Finalement, les cellules sont lavées en PBS, 3 fois 20 minutes, rapidement rincées à l'eau, séchées puis fixées au glycérol-gélatine (Gibco BRL) entre lame et lamelle. Les observations sont réalisées grâce à un microscope confocal (Carl Zeiss S.A.S, LSM 510, Jena, Allemagne).

Un contrôle systématique de chaque anticorps secondaire a été effectué afin de vérifier que cet anticorps ne se fixe pas de façon non spécifique sur les cellules. Pour cela, les cellules

sont incubées avec l'anticorps secondaire, sans exposition préalable à un anticorps de première couche.

De même, un contrôle isotypique est effectué pour chaque anticorps primaire, avec selon les cas, des Ig irrelevantes IgG1 ou IgG2a purifiées chez la souris ou une fraction purifiée d'IgG de lapin.

VII - Analyse de la polarisation des récepteurs

Les cellules ont été décollées des flacons de culture grâce à du versène (Gibco BRL) déposé sur les cellules pendant 10 minutes. Après trois lavages en PBS froid, 3 échantillons différents ont été incubés avec ou sans anticorps primaires pendant 30 minutes à 4°C et dilués dans du PBS contenant 0,5 % de BSA. Le premier échantillon ne contenait aucun anticorps alors que l'échantillon 2 contenait un anticorps monoclonal de souris anti-Fas (B-G27, Diaclone) dilué au 1/20 et l'échantillon 3 un anti-sérum de lapin dirigé contre la protéine p75^{NTR} (H-137, Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/25. Après trois lavages en PBS froid, la polarisation des récepteurs a été induite en incubant les cellules 1 heure à 37°C dans du milieu de culture. Les cellules des trois échantillons ont à nouveau été mises en présence des anticorps primaires, selon les mêmes conditions expérimentales : l'échantillon 1 a été incubé avec les deux anticorps (anti-Fas et anti-p75^{NTR}), l'échantillon 2 avec l'anticorps anti-p75^{NTR} et l'échantillon 3 avec l'anticorps anti-Fas pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont alors été fixées en présence de méthanol froid pendant 5 minutes et à 4°C puis saturées pendant 1 heure dans du sérum de chèvre dilué à 10 % dans du PBS. Les anticorps primaires ont été détectés grâce à des anticorps de chèvre anti-Ig de lapin conjugués à de l'Alexa Fluor 488 ou à des anticorps de chèvre anti-Ig de souris conjugués à de l'Alexa Fluor 594 (1/4000, Molecular Probes).

La révélation et les contrôles isotypiques ont été réalisés selon le protocole déjà décrit pour l'immunofluorescence.

VIII - Immunopurification des protéines Fas et p75^{NTR}

VIII.1 - Préparation des colonnes d'immunopurification

La protéine A couplée à des billes (Protein A Ceramic HyperD F, Biosepra, Life Technologies) est lavée trois fois dans du tampon borate 0,1M pH 8,2 (Sigma-Aldrich). L'accrochage de 150 µg d'anticorps anti-Fas (B-G27, Diaclone), d'anticorps anti-p75^{NTR} (H-137, Santa Cruz Biotechnology) ou d'IgG irrelevantes de souris (Sigma-Aldrich) sur 1 mL de billes de protéine A est réalisé pendant 3 heures à TA sous agitation légère dans du tampon borate 0,1M pH 8,2. Après un lavage en tampon borate, puis un lavage en tampon triéthanolamine 0,2 M pH 8,2 (Sigma-Aldrich), les anticorps sont accrochés de façon covalente sur les billes de protéine A par une incubation dans du tampon triéthanolamine 0,2 M à pH 8,2 contenant 15 mM de diméthylpimélimidate (Sigma-Aldrich) pendant 45 minutes à TA sous agitation lente. La réaction est arrêtée par une incubation dans du tampon éthanolamine 0,2 M pH 8,2 (Sigma-Aldrich) durant 5 minutes. Les billes de protéine A couplées aux anticorps sont ensuite lavées 3 fois en tampon borate avant de pouvoir être utilisées.

VIII.2 - Purification des protéines

Dans un premier temps, des lysats cellulaires totaux ont été réalisés selon le protocole décrit pour le Western blot, sur les cellules SH-SY5Y à l'état basal ou après 24 heures d'exposition à FasL ou au BDNF. Chacun des lysats a été incubé dans des colonnes contenant uniquement la protéine A puis la protéine A associée à une IgG de souris irrelevante afin d'éliminer toutes les protéines qui se lient de façon non spécifique avec la protéine A ou avec les IgG. Les protéines Fas et p75^{NTR} ont ensuite été extraites des lysats en incubant ceux-ci avec des billes de protéine A couplée aux anticorps durant une nuit à 4°C sous agitation lente : les colonnes contenant la protéine A couplée à l'anticorps anti-Fas ont été incubées avec les lysats de cellules à l'état basal ou après traitement avec du BDNF alors que les colonnes contenant la protéine A couplée à l'anticorps anti-p75^{NTR} ont été incubées avec les lysats de

cellules à l'état basal ou après traitement avec du FasL. Après un lavage en PBS-0,1 % NP40 (Sigma-Aldrich) puis un lavage en PBS-0,1 % NP40 avec 1 M de NaCl (Sigma-Aldrich), les protéines sont éluées par une solution de glycine 100 mM pH 2,5 (Sigma-Aldrich) et rapidement transférées dans un volume équivalent de tampon Tris-base 1M pH 8,9 (Sigma-Aldrich). Une dialyse (Spectra/pore, 12000 Da, VWR) est réalisée pendant 14 heures à 4°C dans du PBS. Les protéines sont alors concentrées par centrifugation (vivaspin 5 kDa, VWR) pour être ramenées à un volume final de 200 µl. Après un dosage par le méthode de Bradford, les protéines purifiées sont séparées par SDS-PAGE (gels à 12 % pour le récepteur p75^{NTR} et à 15 % pour le récepteur Fas), transférées sur membrane de nitrocellulose puis détectées grâce à un antisérum de lapin anti-Fas (C-20, 1/200, Santa Cruz Biotechnology) ou un anticorps monoclonal anti-p75^{NTR} (Clone NGFR5, 1/500, NeoMarker) selon le protocole détaillé en IV.

IX - Détection de l'apoptose

IX.1 - Mise en évidence de la mort cellulaire grâce au DAPI

Le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dihydrochloride (Sigma-Aldrich) est une molécule fluorescence qui peut spécifiquement s'intercaler au niveau de l'ADN. Le DAPI, à 10 µg/mL, est mis en présence des cellules pendant 30 minutes à l'obscurité et les cellules sont ensuite fixées pendant 30 minutes grâce à du PFA dilué à 4 % dans du PBS. Après trois lavages en PBS et un lavage à l'eau, les marquages sont observés grâce à un microscope à fluorescence (Leica DMRX, Rueil-Malmaison, France) et les cellules sont comptées (au moins 3 champs et 300 cellules par essai). Pour toutes les mesures d'apoptose, l'index apoptotique des cellules est déterminé pour chacune des conditions par rapport à l'état basal qui est arbitrairement fixé à 1.

IX.2 - Mise en évidence de l'apoptose par la méthode TUNEL

Les cellules ont étéensemencées dans des puits de plaques 8 puits (LabTek, 10⁵ cellules/puits) et laissées pendant 72 heures dans leur milieu de culture avant d'être stimulées pendant 48 heures avec différentes molécules.

La présence d'apoptose est évaluée par la méthode TUNEL selon les instructions du fournisseur (Promega, Charbonnières, France). Les cellules sont fixées au PFA dilué à 4 % dans du PBS et perméabilisées grâce à du Triton X100 dilué à 0,1 % dans de l'eau pendant 5 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées au PBS. Après 10 minutes en présence du tampon d'équilibration fourni dans le kit, les cellules sont incubées 1 heure à 37°C et à l'obscurité avec une solution de polymères nucléotidiques conjugués à la fluorescéine contenant la terminale deoxynucléotidyl transférase. Cette enzyme va catalyser la liaison à l'extrémité 3'OH libre de polymères nucléotidiques fluorescents des brins d'ADN générés au cours de l'apoptose. La réaction est arrêtée par incubation pendant 10 minutes dans une solution de SSC 2X puis les cellules sont lavées en PBS. Une contre-coloration au bleu-Evans (Sigma- Aldrich) pendant 5 minutes permet de colorer la membrane de l'ensemble des cellules. Après plusieurs lavages en PBS et un lavage à l'eau, les cellules sont fixées entre lame et lamelle.

Les cellules en apoptose sont alors comptées (au moins 3 champs et 300 cellules par essai) sous un microscope à fluorescence (x 200, Carl Zeiss S.A.S). Pour toutes les mesures d'apoptose, l'index apoptotique des cellules est déterminé pour chacune des conditions par rapport à l'état basal qui est arbitrairement fixé à 1.

IX.3 - Détection de la libération des nucléosomes solubles par ELISA

La proportion de cellules en apoptose a également été évaluée par le dosage des nucléosomes solubles générés au cours de l'apoptose. Ce dosage a été réalisé par la technique ELISA selon les instructions du fournisseur (Cell Death Detection ELISA Plus ; Roche Diagnostic, Meylan, France).

Les cellules sont ensemencées dans des puits de plaques 96 puits à 10^4 cellules/puits et mises en culture au minimum 72 heures dans leur milieu de culture. Après 48 heures d'incubation en présence des différentes molécules étudiées, les plaques contenant les cellules sont centrifugées à 200 g pendant 10 minutes et le surnageant est remplacé par 200 μ L de tampon de lyse. Après 30 minutes de lyse, une nouvelle centrifugation est réalisée et 20 μ L du surnageant de chaque condition sont ajoutés dans des puits sensibilisés à la peroxydase et contenant deux anticorps, un anti-histone couplé à la biotine et un anti-DNA couplé à la POD. L'ensemble des composants est incubé 2 heures à température ambiante sous agitation. Trois lavages sont réalisés puis le substrat est ajouté. Lorsque le substrat est métabolisé par l'enzyme, une coloration apparaît. La coloration, et donc le niveau d'apoptose des cellules, est mesurée grâce à un spectrophotomètre à 405 nm.

Pour toutes les mesures d'apoptose, l'index apoptotique des cellules est déterminé pour chacune des conditions par rapport à l'état basal qui est arbitrairement fixé à 1. Chaque expérimentation a été réalisée au moins 3 fois.

X - Analyse de la prolifération cellulaire

L'analyse de la prolifération cellulaire a été réalisée après exposition des cellules à différentes molécules pendant 48 heures.

X.1 - Détection de la prolifération des cellules par dosage de l'activité cellulaire

Ce test colorimétrique consiste en la mesure de la capacité des cellules vivantes à réduire un sel de tétrazolium jaune et hydrosoluble, le MTT (Sigma-Aldrich), en un formazan bleu-violet insoluble en milieu aqueux. C'est au niveau des mitochondries qu'une enzyme, la

succinate deshydrogénase, effectue cette réduction. Le but de ce test est de déterminer la cytotoxicité d'un produit, ou de quantifier la prolifération cellulaire.

Les cellules ont été ensemencées dans les puits de plaques 96 puits (10^4 cellules/puits). Après 3 jours en culture, les cellules ont été traitées pendant 48 heures avec différentes molécules à différentes concentrations. Le milieu de culture a alors été délicatement retiré et remplacé par 100 μ L de milieu de culture additionné de MTT (50 μ g). Après 4 heures d'incubation à 37°C et 5 % de CO₂, la réaction a été stoppée en dénaturant les protéines cellulaires pendant 3 heures grâce à du SDS (Sigma-Aldrich) dilué à 10 % contenant 0,01 M d'HCl dans de l'eau. La lecture est réalisée grâce à un spectrophotomètre (Packard Instruments) à une longueur d'onde de 550 nm. La viabilité cellulaire a été calculée en proportion des longueurs d'onde mesurées.

X.2 - Détection de la prolifération des cellules par incorporation de BrdU

Le bromodeoxyuridine (BrdU, 20 μ M, Sigma-Aldrich) a été ajouté au milieu de culture en même temps que les molécules à tester et laissé 48 heures.

Les cellules sont décollées de leur support de culture par ajout de versène puis elles sont perméabilisées grâce à du PBS contenant 0,1 % de Triton X100 et 1 % de citrate de sodium (Sigma-Aldrich) pendant 2 minutes sur glace. Leur ADN est dénaturé par un traitement d'1 heure dans de l'HCl 2 M (Sigma-Aldrich) puis l'HCl est neutralisé pendant 10 minutes grâce à du tampon borate 0,1 M, pH 8,5. Après deux rinçages en PBS, les cellules sont mises en suspension dans du V/SVF, comptées, et 2×10^5 cellules de chaque condition sont transférées dans des tubes de cytométrie. Le marquage est ensuite réalisé comme décrit dans le paragraphe V b avec un anticorps de souris anti-BrdU (Sigma-Aldrich) et un anticorps secondaire anti-immunoglobuline de souris couplé au FITC produit chez la chèvre (Dako Cytomation). Des contrôles isotypiques et des contrôles d'accrochages non spécifiques de l'anticorps secondaire ont été réalisés lors de chaque manipulation.

L'analyse des marquages est réalisée grâce à un cytomètre en flux Epics XL-MCL Coulter (HIALEAH, Floride, USA). Chaque analyse a été réalisée avec au moins 20 000 cellules et les résultats obtenus, sont représentatifs de 3 manipulations indépendantes.

XI - Xénogreffes de cellules

Toutes les manipulations réalisées sur les animaux ont été effectuées selon les règles édictées par le Comité d'expérimentation animale.

Cette étude a été réalisée afin de déterminer l'effet antitumoral de molécules sur les lignées cellulaires greffées dans des cerveaux de rats immunodéprimés. Les rats utilisés sont des rats Nude athymiques, femelles, âgées de deux mois (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) nourris et abreuvés à volonté et maintenus dans des cages individuelles dans une atmosphère stérile.

Toutes les interventions chirurgicales ont été réalisées dans des conditions optimales de stérilité.

XI.1 - Détermination de la zone de greffe des cellules

La localisation choisie pour l'implantation des cellules dans le cerveau est le putamen caudal droit. Afin de localiser précisément la région anatomique choisie chez chaque sujet d'étude, le putamen caudal est repéré grâce à ses coordonnées stéréotaxiques par rapport au bregma (zone d'union de deux sutures), coordonnées déterminées grâce à l'atlas de Paxinos et Watson (1982) (Figure 26) :

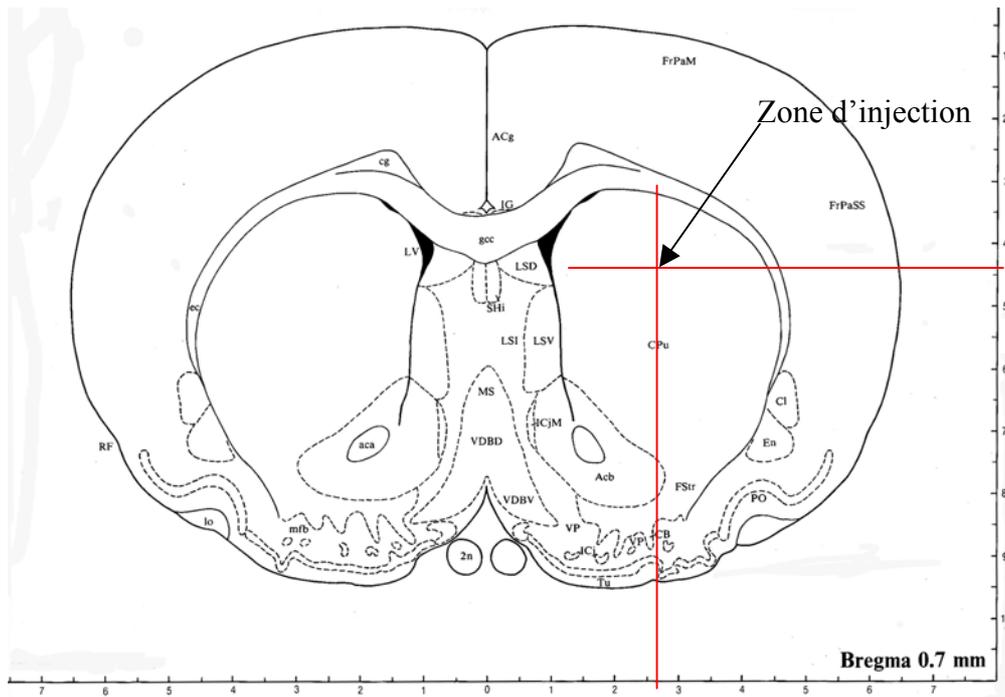


Figure 13

2n	optic nerve	FStr	fundus striati	SHi	septohippocampal nu
aca	ant commissure, ant	gcc	genu corpus callosum	Tu	olf tubercle
Acb	accumbens nu	ICj	islands of Calleja	VDBD	nu vertical limb diagonal band, dors
ACg	ant cingulate cortex	ICjM	islands of Calleja, major island	VDBV	nu vertical limb diagonal band, vent
CB	cell bridges between caudate putamen and olf tubercle	IG	induseum griseum	VP	vent pallidum
cg	cingulum	lo	lat olf tr		
Cl	claustrum	LSD	lat septal nu, dors		
CPu	caudate putamen	LSI	lat septal nu, intermediate		
ec	ext capsule	LSV	lat septal nu, vent		
En	endopiriform nu	LV	lat ventricle		
FrPaM	frontoparietal cortex, motor area	mbf	med forebrain bundle		
FrPaSS	frontoparietal cortex, somatosensory area	MS	med septal nu		
RF	rhinal fissure	PO	primary olf cortex		

Figure 26. Planche de l'atlas de Paxinos et Watson.

Selon les informations apportées par cette planche, nous avons pu déterminer les coordonnées stéréotaxiques du lieu d'injection par rapport au bregma :

- Antéro-postérieure (AP) : + 0,5 mm
- Latéral (L) : - 2,7
- Dorso-ventral (DV) : - 4,4

La localisation exacte de l'implantation a ensuite été adaptée aux rats greffés et au matériel utilisé. Les coordonnées ont ainsi été vérifiées en administrant 1 μ L de bleu de méthylène (Sigma-Aldrich) dans les cerveaux de trois rats. Après injection, les rats ont été sacrifiés, leur cerveau congelé puis sectionné. Des coupes coronales de 12 μ m d'épaisseur sont réalisées grâce à un cryostat (Leica CM3050) et le lieu de l'injection est repéré grâce à la présence de bleu de méthylène.

XI.2 - Anesthésie des rats

Une semaine après leur arrivée dans l'animalerie, les rats sont pesés puis anesthésiés. Une première injection de midazolam (0,5 mg/100 g, i.m., Merck, Lyon, France) a été effectuée et l'anesthésie est réalisée grâce à de la Kétamine 500[®] (5 mg/100 g, i.p., Virbac SA, CA, USA).

L'euthanasie des rats a été réalisée après anesthésie (selon le protocole décrit précédemment) suivie de la décapitation grâce à une guillotine.

XI.3 - Préparation des cellules

Les cellules, U-87 MG, sont tout d'abord décollées de leur support de culture grâce à du versène, comptées sur lame de Malassez, puis resuspendues dans du liquide céphalo rachidien (LCR) de synthèse (147 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 0,85 mM MgCl₂, Sigma-Aldrich) à une concentration de 10⁶ cellules dans 4 μ L.

La viabilité des cellules a été déterminée après une heure dans le LCR grâce à du bleu de Trypan (Sigma-Aldrich).

XI.4 - Protocole de greffes des cellules

Les greffes ont été réalisées en utilisant un appareil d'implantation stéréotaxique (Figure 27) (David Kopf instruments, CA, USA) :



Figure 27. Photo de l'appareil de stéréotaxie.

La tête des rats est fixée sur l'appareil à stéréotaxie grâce aux dents et par l'intermédiaire de barres d'oreilles qui entrent dans le conduit auditif de l'animal. Après avoir vérifié la fixité de la tête et après un nettoyage chirurgical, une incision sagittale de la peau du crâne est réalisée et l'os du crâne est bien dégagé afin de visualiser la position exacte du bregma, le point 0 des coordonnées. La pointe d'une seringue Hamilton, fixée à l'appareil de stéréotaxie, est positionnée précisément sur le bregma, et les coordonnées antéro postérieures (AP = 0,5 mm) et latérales (L = - 2,5 mm) sont modifiées sur l'appareil à stéréotaxie en fonction des coordonnées déterminées grâce à l'atlas de Paxinos et Watson. La boîte crânienne est alors perforée au niveau de la pointe de la seringue Hamilton et celle-ci est enfoncée dans le cerveau des rats selon les coordonnées dorso-ventrales (DV = - 4,4 mm) (Figure 28).



Figure 28. Système d'injection des cellules lors des xénogreffes.

Les cellules sont alors injectées à raison de $0,5 \mu\text{L}$ toutes les minutes, afin de ne pas léser le cerveau par une surpression du liquide, et l'aiguille est lentement retirée 2 minutes après la fin de l'injection afin d'éviter que les cellules soient entraînées avec l'aiguille lorsque celle-ci est enlevée.

L'orifice d'injection dans le crâne est ensuite rebouché grâce à de la cire à os (Horsley wax, B Braun Medical, Boulogne, France), la boîte crânienne est nettoyée au sérum physiologique stérile, la plaie est suturée et un antibiotique local est déposé.

Un groupe de 5 rats, le groupe appelé contrôle sain, a subi le même protocole de greffe mais le LCR injecté ne contenait aucune cellule.

XI.5 - Traitement de la tumeur par perfusion corticale chronique

Quinze jours après la greffe des cellules, des pompes osmotiques ont été implantées et ont permis d'administrer un traitement aux rats greffés de façon continue pendant 14 jours.

XI.5.A - Principe de la pompe

Une pompe osmotique Alzet (Alzet, modèle 1002, Charles River Laboratories) est utilisée pour délivrer la solution de traitement au niveau de la zone où se développe la tumeur (Figure 29). Cette pompe osmotique dispose d'un réservoir de 90 μL et permet une distribution constante et continue de substance pendant 14 jours avec un débit de 0,25 μL par heure. Le réservoir de la pompe osmotique est associé à une canule par l'intermédiaire d'un cathéter flexible.

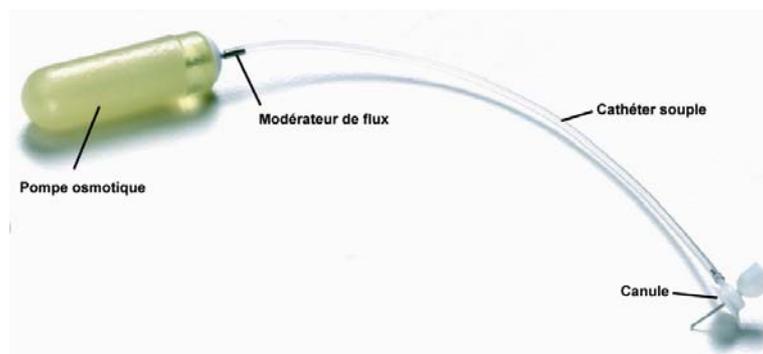


Figure 29. Structure des pompes osmotique Alzet.

Lorsque le liquide physiologique, provenant du rat, pénètre dans la pompe au travers de la membrane semi-perméable extérieure selon le gradient osmotique, il comprime le réservoir flexible imperméable situé à l'intérieur de la pompe contenant la substance, et permet la diffusion de celle-ci dans le cathéter (Figure 30). La solution est ainsi délivrée au niveau de la canule.

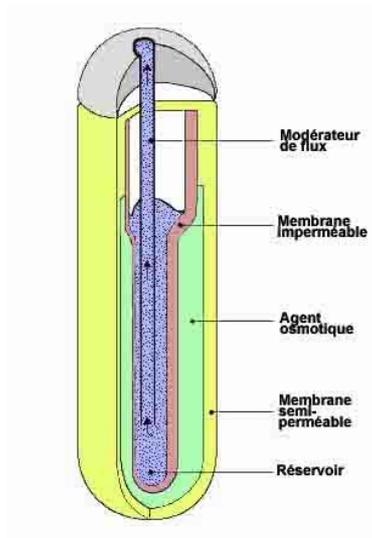


Figure 30. Coupe schématique des pompes osmotiques Alzet.

XI.5.B - Préparation de la pompe osmotique

Les pompes osmotiques sont préparées dans un environnement entièrement stérile selon les consignes du fabricant. La profondeur de la canule de la pompe est de 5 mm. Un espaceur de 0,5 mm est donc ajouté afin d'ajuster la profondeur de la canule à 4,5 mm, profondeur à laquelle ont été injectées les cellules (Figure 31).



Figure 31. Ajustement de la profondeur des canules par des espaceurs.

Le réservoir de chaque pompe a été rempli de LCR seul (contrôle sain, $n = 5$) ou de LCR contenant du FasL (0,47 ng/h) et de l'étoposide (75 ng/h) ($n = 5$) ou de LCR contenant du FasL, de l'étoposide et de la dexaméthazone (0,66 ng/h) ($n = 5$).

XI.5.C - Implantation de la pompe osmotique

L'intervention chirurgicale est réalisée en conditions aseptiques sous anesthésie générale, selon les conditions décrites précédemment. Les rats sont à nouveau installés sur l'appareil à stéréotaxie et leur crâne fixé. Après un nettoyage chirurgical, une incision sagittale est réalisée, l'os bien nettoyé et la cire à os retirée. La canule est alors placée, grâce à l'appareil de stéréotaxie, dans le trou réalisé lors de l'injection des cellules et le réservoir de la pompe inséré dans une poche sous-cutanée entre les deux omoplates. La canule est alors scellée sur le crâne des rats grâce à une vis d'ancrage vissée dans le crâne du rat, et grâce à du ciment dentaire (Pr scell glass-ionomer, Pierre Roland, Merignac, France) fixant en un seul bloc la vis et la canule. Finalement, la boîte crânienne est nettoyée au sérum physiologique stérile, la plaie est suturée et un antibiotique local est déposé.

Quatre groupes de 5 rats ont ainsi été étudiés :

- les contrôles sains qui ont reçus 4 μ L de LCR à la place des cellules et dont les pompes implantées contenaient du LCR.
- les rats greffés avec des cellules et non traités.
- les rats greffés avec des cellules et traités avec FasL et étoposide.
- les rats greffés avec des cellules et traités avec FasL, étoposide et dexaméthazone.

XI.6 - Suivi clinique

Un examen clinique a été réalisé chaque jour après chaque opération. Une recherche systématique de symptômes cliniques a ainsi été réalisée avant et après la pose de la pompe osmotique ainsi que sur les contrôles sains. Les principaux symptômes recherchés ont été l'apathie, l'anorexie, la perte de poids, l'épistaxie, la paresie, la perte d'équilibre, des perturbations de la proprioception, la paralysie et le port de tête penché.

L'euthanasie des animaux a été réalisée 30 jours après la greffe des cellules ou l'injection des 4 μ L de LCR selon les protocoles éthiques. Dans le cas d'apparition de sévères

symptômes cliniques, les animaux ont été euthanasiés prématurément. Les pompes ont été vérifiées et une autopsie a systématiquement été réalisée. Les cerveaux prélevés de leur boîte crânienne ont été rapidement congelés et conservés à - 80°C.

XII - Etudes immunohistochimiques par immunofluorescence indirecte

Des coupes coronales de 12 µm d'épaisseur sont réalisées grâce à un cryostat (Leica CM3050), déposées sur des lames portes objet, séchées et conservées à - 80°C.

Des colorations standard en hématoxyline (Sigma-Aldrich) ou en hématoxyline-éosine-safran (HES) ont tout d'abord été réalisées sur les coupes.

Dans un second temps, des immunomarquages ont été réalisés selon le protocole suivant. Les cryosections sont décongelées pendant 10 minutes à TA et fixées 10 minutes à l'acétone (Sigma-Aldrich), à - 20°C. Après trois lavages en PBS et une saturation d'une heure en SVF à 10 % dans du PBS à TA, les coupes sont incubées avec différents anticorps primaires (Tableau 10) pendant 2 heures à TA et dilués dans la solution de saturation :

Nom	Spécificité	Hôte	Isotype	Dilution	Fournisseur	Propriétés
B-Z1		souris	IgG2a	Variable	Diaclone	Contrôle isotypique
B-Z2		souris	IgG1	Variable	Diaclone	Contrôle isotypique
		lapin		Variable	Dako Cytomation	Contrôle isotypique

2F11	Neurofilament (68 kDa)	souris	IgG1	1/20	Dako Cytomation	Marqueur des cellules neuronales
GFAP	Protéine gliale fibrillaire acide	lapin	Poly -clonal	1/20	Dako Cytomation	Marqueur des astrocytes
k _i -M7	CD-68	souris	IgG1	1/20	Berhing	Marqueur des cellules microgliales
W6/32	HLA-ABC	souris	IgG2a	1/20	Hybridome	Molécules du CMH de classe I humain
B-G27	Fas humain	souris	IgG2a	1/20	Diaclone	

Tableau 10. Liste des anticorps primaires utilisés en immunohistofluorescence.

Après trois lavages en PBS, la révélation est réalisée grâce à l'exposition des coupes pendant 1 heure avec un antisérum de lapin couplé à de l'Alexa Fluor 594 (1/9000) ou avec un anticorps de lapin anti-Ig de souris couplé à de la biotine (absorbé sur tissus de rat pour éliminer les Ig qui reconnaissent des épitopes de rats, 1/100, Dako Cytomation) suivi d'une incubation de 30 minutes avec de la streptavidine couplée à de la phycoérythrine rouge cyanine-5 (1/100, Dako Cytomation). Les marquages immunofluorescents sont finalement fixés entre lame et lamelle et observés grâce à un microscope confocal (Zeiss).

XIII - Séparation des cellules par la technique de fractionnement par couplage flux - force de sédimentation (SdFFF)

XIII.1 - Principe de la SdFFF

La SdFFF permet en un temps limité, sans marquage préalable, et en respectant l'intégrité cellulaire, de séparer des cellules hétérogènes en fonction de leurs différentes propriétés physico-chimiques : taille, densité et forme. Ainsi, à densité égale, les particules de plus grande taille seront éluées avant les particules de plus faible diamètre.

Les conditions de séparation (force du champ externe appliqué et flux de phase mobile) doivent être déterminées spécifiquement dans nos conditions. Le respect de la viabilité cellulaire de cette technique a été montré au cours de l'étude de l'éluion de différents types cellulaires tels que des fibroblastes de plexus choroïdes de moutons ou des cellules neurales de cerveaux d'embryons de rat. Aucun accroissement spécifique de la mortalité cellulaire n'a été détecté après éluion en SdFFF.

Cette technique a été réalisée par le Dr S. Battu et Mlle G. Bégaud, dans le laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie du Pr P. Cardot à la Faculté de Pharmacie de Limoges.

XIII.2 - Préparation des cellules

Le système de séparation est décontaminé par une solution à 3 % d'hypochlorite de sodium, suivi d'un rinçage durant une nuit par de l'eau distillée stérile et apyrogène. Quelques heures avant utilisation, cette phase mobile est remplacée par une solution de PBS stérile additionné de 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 0,1 % de fungizone (PBSa).

Les cellules de la lignée neuroblastique U-87 MG ont été lavées une fois avec du PBS stérile, puis décollées grâce à du versène déposé sur les cellules pendant 10 minutes à 37°C. Les cellules sont remises en suspension dans du milieu de culture incomplet sans rouge de phénol. Une fraction est prélevée pour une numération à la cellule de Malassez. La viabilité cellulaire est réalisée par la méthode d'exclusion au bleu trypan ajouté à la suspension cellulaire, à la concentration finale de 0,1 %, les cellules colorées en bleu étant considérées comme mortes. La concentration cellulaire est ajustée à 10^6 cellules viables/mL et les cellules séparées par SdFFF.

XIV - Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce aux tests Anova, de contraste (pour l'analyse de la taille des tumeurs) et t de student.

Résultats

I - Le récepteur p75^{NTR} module l'apoptose induite par le récepteur Fas dans la lignée neuroblastique SH-SY5Y

I.1 - Les récepteurs Fas et p75^{NTR} sont exprimés dans les cellules neuroblastiques SH-SY5Y

L'étude de l'expression des récepteurs aux niveaux transcriptionnel et protéique a été réalisée par RT-PCR, clonage et séquençage sur des ARN totaux et par Western-blotting sur des lysats protéiques extraits de cellules de la lignée neuroblastique.

Un fragment de 277 paires de bases a été amplifié par PCR, cloné puis séquencé, montrant ainsi que le transcrit du récepteur p75^{NTR} est bien exprimé dans la lignée SH-SY5Y que ce soit au niveau de cellules à l'état basal (Ba) ou après activation par FasL (F). De même, une protéine de 75 kDa a pu être détectée par Western-blotting (WB), dans les mêmes conditions d'activation que précédemment, grâce à un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement la protéine (clone NGFR5) (Figure 32).

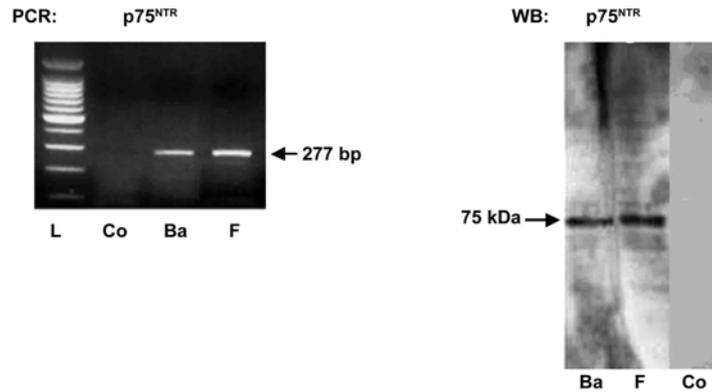


Figure 32. Mise en évidence de l'expression du récepteur p75^{NTR} dans les cellules SH-SY5Y.

L'expression du récepteur Fas a ensuite été recherchée et détectée (Figure 33), que ce soit au niveau transcriptionnel, avec l'amplification d'une séquence spécifique du récepteur Fas de 480 paires de bases, ou au niveau protéique, avec la détection d'une protéine de 45 kDa grâce à un anticorps polyclonal spécifique (C-20).

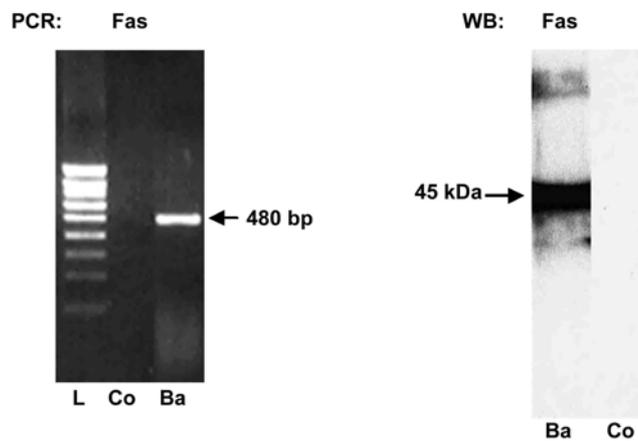


Figure 33. Détection de l'expression du récepteur Fas dans la lignée neuroblastique.

Des témoins négatifs de PCR ou des contrôles isotypiques (Co) ont systématiquement été réalisés.

I.2 - Le récepteur TrkB n'est pas détecté dans la lignée neuroblastique

Le récepteur de forte affinité pour le BDNF a été recherché grâce à l'utilisation d'un anticorps polyclonal de lapin anti-TrkB spécifique (Figure 34). Ce récepteur n'a pas pu être détecté dans la lignée SH-SY5Y par la technique d'analyse de cytométrie en flux, alors que les récepteurs TrkA, récepteurs spécifiques du NGF, ont été révélés par des anticorps polyclonaux de lapin spécifiques. Un contrôle isotypique (en gris), qui n'a jamais abouti à un marquage fluorescent des cellules, a été superposé sur chacun des histogrammes. Afin de vérifier que l'anticorps anti-TrkB est bien fonctionnel, un immuno marquage a été réalisé avec cet anticorps sur des cellules issues de cultures primaires d'épithélium olfactif de rat. Ces cellules, contenant des neurones qui expriment le récepteur TrkB, ont permis de mettre en évidence un décalage du pic de fluorescence et ont confirmé la fonctionnalité de l'anticorps anti-TrkB.

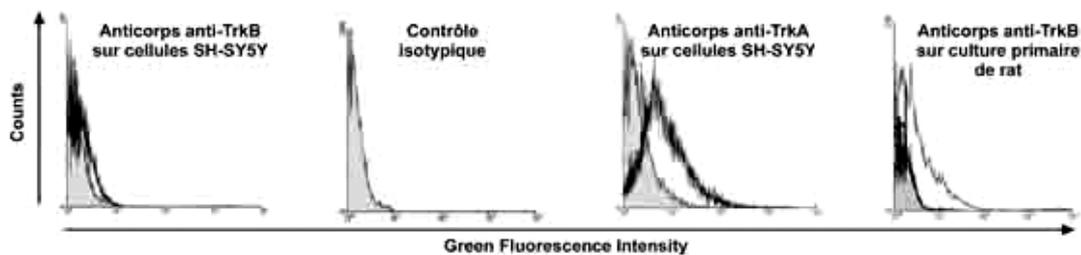


Figure 34. Analyse de l'expression du récepteur TrkB dans la lignée SH-SY5Y par la technique de cytométrie en flux.

Afin de confirmer l'absence d'expression du récepteur TrkB, une étude par Western-blotting a été réalisée (Figure 35). Alors qu'une protéine de 145 kDa, taille attendue pour le récepteur TrkB, a été détectée au niveau de la lignée H4 (lignée de neurogliome), aucune protéine de cette taille n'a été mise en évidence au niveau de la lignée SH-SY5Y, que ce soit à l'état basal (Ba) ou après stimulation par du BDNF ou du FasL (F). Le contrôle isotypique (Co) a permis de vérifier l'absence d'accrochage non spécifique des anticorps.

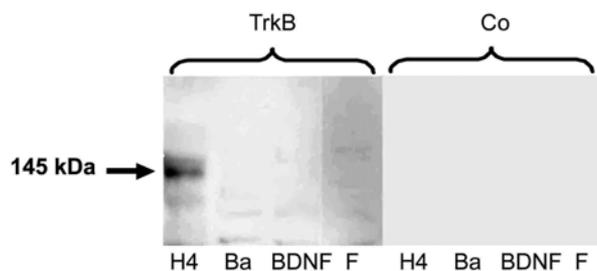


Figure 35. Mise en évidence de l'absence d'expression du récepteur TrkB dans les cellules SH-SY5Y par la méthode de Western-blotting.

H4 : lysat de cellules H4 ; Ba : lysat de cellules SH-SY5Y ; BDNF : lysat de cellules SH-SY5Y stimulées avec BDNF ; F : lysat de cellules SH-SY5Y stimulées avec FasL ; Co : contrôle isotypique.

I.3 - L'activation des voies de signalisation des récepteurs Fas et $p75^{NTR}$ ne modifie pas l'expression du récepteur $p75^{NTR}$

Les variations de la quantité d'ARN messager du récepteur $p75^{NTR}$, comparées à celles de la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, contrôle positif), ont été étudiées par Northern-blotting sur les cellules SH-SY5Y à l'état basal ou après 24 heures d'exposition à du BDNF ou à du FasL (F) (Figure 36). Les transcrits détectés ont une taille de 1283 bases pour le récepteur $p75^{NTR}$ et de 1007 bases pour la GAPDH, ces tailles étant celles attendues. Alors que les transcrits sont bien présents dans les cellules, aucune variation de la quantité de ces transcrits n'a été détectée, quelles que soient les conditions de stimulation.

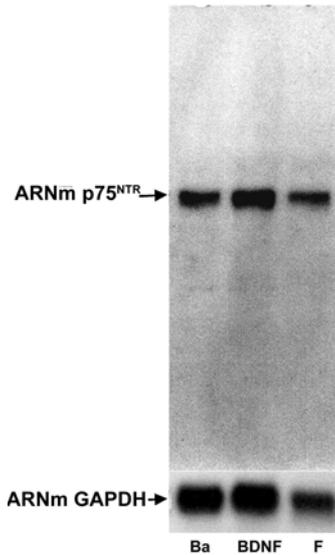


Figure 36. Absence de variation de l'expression des transcrits du récepteur p75^{NTR} au niveau de cellules de neuroblastome stimulées par BDNF et FasL.

Des analyses de cytométrie en flux ont ensuite été réalisées afin d'étudier les variations d'expression de la protéine p75^{NTR} (Figure 37). Un anticorps monoclonal (clone NGFR5) qui reconnaît spécifiquement le récepteur p75^{NTR} a été mis en présence de cellules neuroblastiques stimulées, ou non, pendant 24 heures, avec du BDNF ou du FasL. Le pic de fluorescence obtenu avec un anticorps isotypique (en gris) a été superposé aux pics de fluorescence obtenus pour chacun des marquages. Les résultats ont permis de confirmer que le récepteur est bien présent à la surface des cellules, mais qu'aucune variation d'expression de la protéine n'est détectable entre les cellules à l'état basal (IMF = $0,360 \pm 0,023$) et les cellules stimulées par FasL (IMF = $0,360 \pm 0,035$) ou par BDNF (IMF = $0,375 \pm 0,021$). Ceci confirme les résultats obtenus par Northern-blotting.

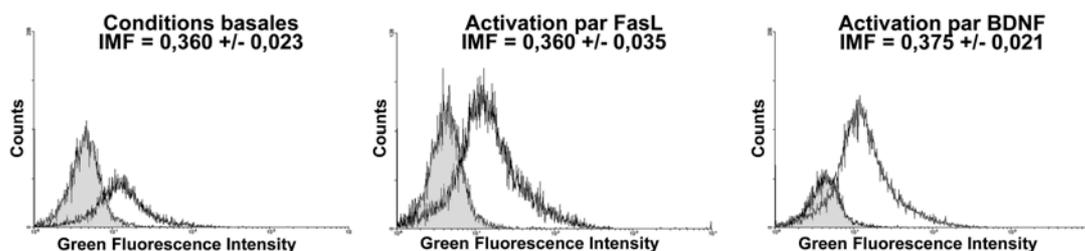


Figure 37. Analyse de l'expression du récepteur p75^{NTR} au niveau de cellules SH-SY5Y par cytométrie en flux.

I.4 - L'activation des voies de signalisation des récepteurs Fas et p75^{NTR} provoque la polarisation de ces deux récepteurs

Des études immunocytochimiques ont été réalisées (Figure 38) grâce à deux anticorps : un anticorps polyclonal de lapin anti-p75^{NTR} et un anticorps monoclonal de souris anti-Fas. Les doubles marquages réalisés sur les neuroblastes à l'état basal ont permis de mettre en évidence une répartition homogène des deux récepteurs à la surface des cellules. Au contraire, après exposition des cellules pendant 24 heures à FasL ou BDNF, la fluorescence est plutôt localisée à une extrémité de la cellule et cette polarisation des récepteurs a pu être détectée quel que soit le récepteur activé, Fas ou p75^{NTR}. Aucune fluorescence n'a pu être détectée lorsque les cellules ont été mises en présence d'anticorps isotypiques.

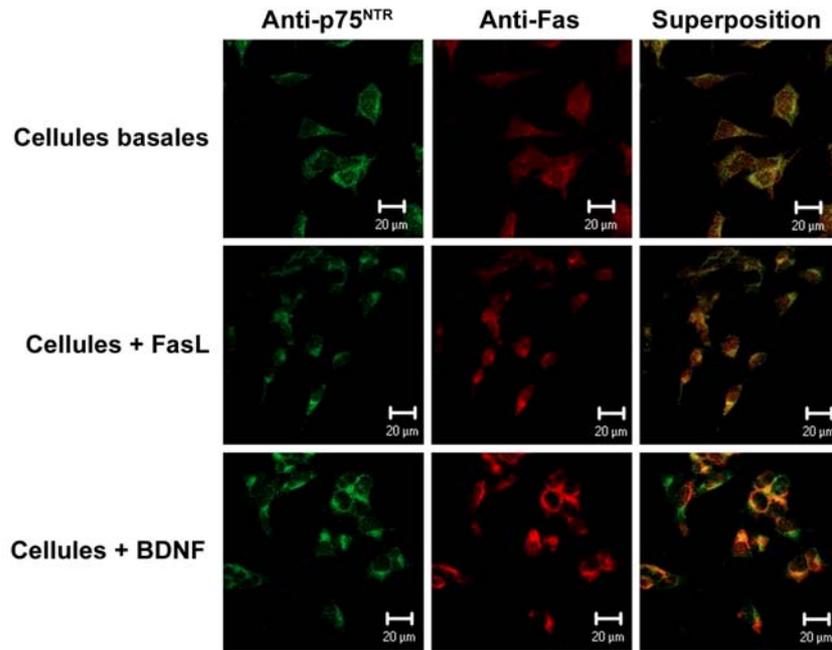


Figure 38. FasL et BDNF induisent une polarisation des récepteurs Fas et p75^{NTR}.

I.5 - Les récepteurs Fas et p75^{NTR} sont liés

Des analyses de co-polarisation ont permis de confirmer les résultats obtenus par immunofluorescence (Figure 39). En effet, la polarisation des deux récepteurs, Fas et p75^{NTR}, a été observée au niveau de la membrane cellulaire après leur liaison avec des anticorps agonistes spécifiques. Au contraire, aucune polarisation n'a pu être mise en évidence lorsque la fluorescence a été observée sur des cellules à l'état basal. Enfin, cette étude a permis de montrer que ces deux récepteurs sont non seulement polarisés à la surface des cellules, mais sont également co-localisés. En effet, quel que soit l'anticorps agoniste utilisé, les deux récepteurs ont toujours été détectés dans la même zone de la membrane cellulaire.

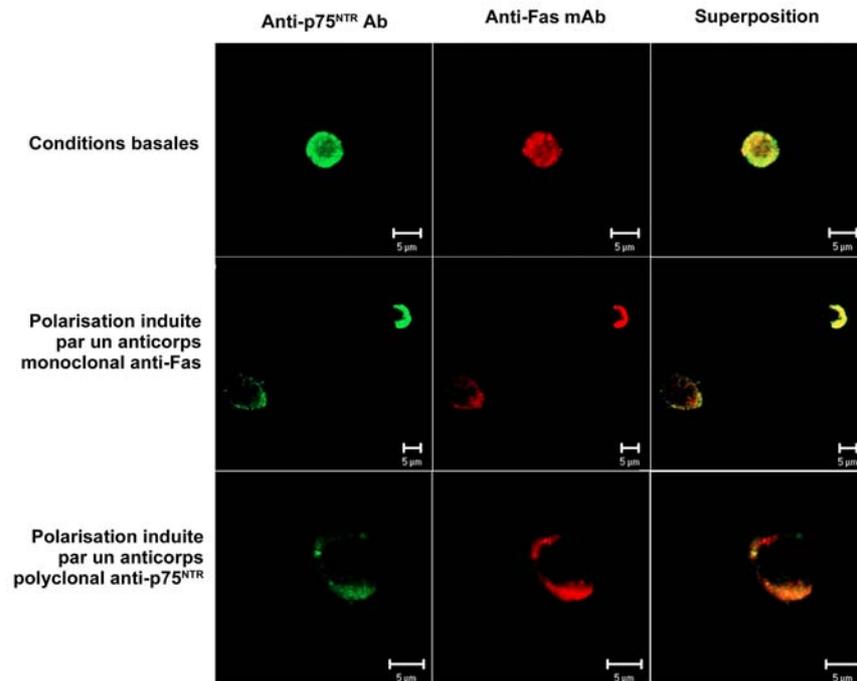


Figure 39. Les récepteurs p75^{NTR} et Fas sont co-localisés dans des cellules activées par des anticorps agonistes pendant 24 heures.

Afin de confirmer l'interaction de ces deux récepteurs, des analyses de co-immunoprécipitation ont été réalisées (Figure 40). Les immunoprécipitations protéiques ont été effectuées grâce à un anticorps polyclonal de lapin anti-p75^{NTR} (H-137, Anti-p75 Ab) sur des lysats de cellules à l'état basal (Ba) ou stimulées par FasL (F) ou grâce à un anticorps monoclonal de souris anti-Fas (B-G27, Anti-Fas mAb) sur des lysats de cellules à l'état basal ou stimulées par BDNF. Les protéines issues des quatre types de purifications ont été séparées par SDS-PAGE, transférées sur une membrane et détectées grâce à deux anticorps : un anticorps polyclonal de lapin anti-Fas (C-20, Anti-Fas Ab) et un anticorps monoclonal de souris anti-p75^{NTR} (clone NGFR5, Anti-p75 mAb). Quel que soit le type de purification ou d'anticorps utilisé, les récepteurs p75^{NTR} et Fas ont toujours été co-purifiés, confirmant que les deux récepteurs sont bien liés. Des contrôles (Co) d'accrochage non spécifique des anticorps ont été réalisés et se sont révélés négatifs.

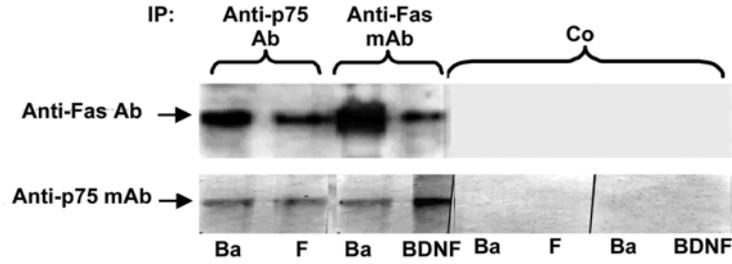
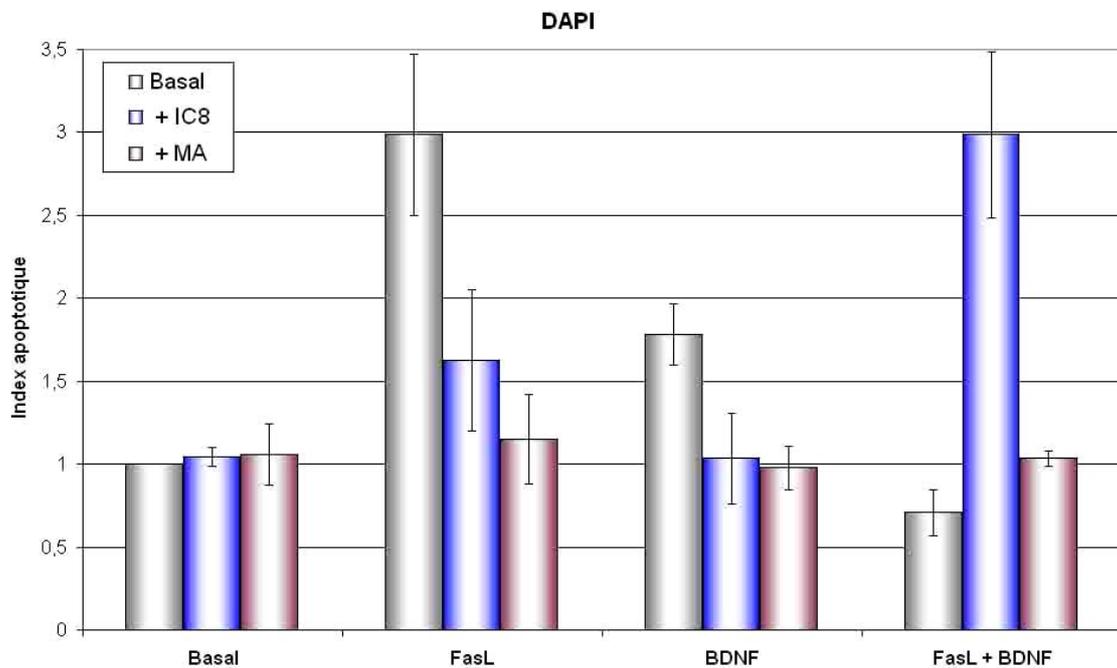


Figure 40. Les récepteurs p75^{NTR} et Fas sont co-immunoprécipités quelles que soient les conditions de culture des cellules SH-SY5Y.

I.6 - Analyse du taux d'apoptose des neuroblastes dans différentes conditions d'activations

L'analyse de l'apoptose cellulaire a été réalisée selon deux techniques, le DAPI et la méthode TUNEL, sur des neuroblastes à l'état basal ou stimulés pendant 48 heures avec différentes molécules (Figure 41). Les index apoptotiques ont été calculés en proportion du taux d'apoptose basal, arbitrairement fixé à 1.



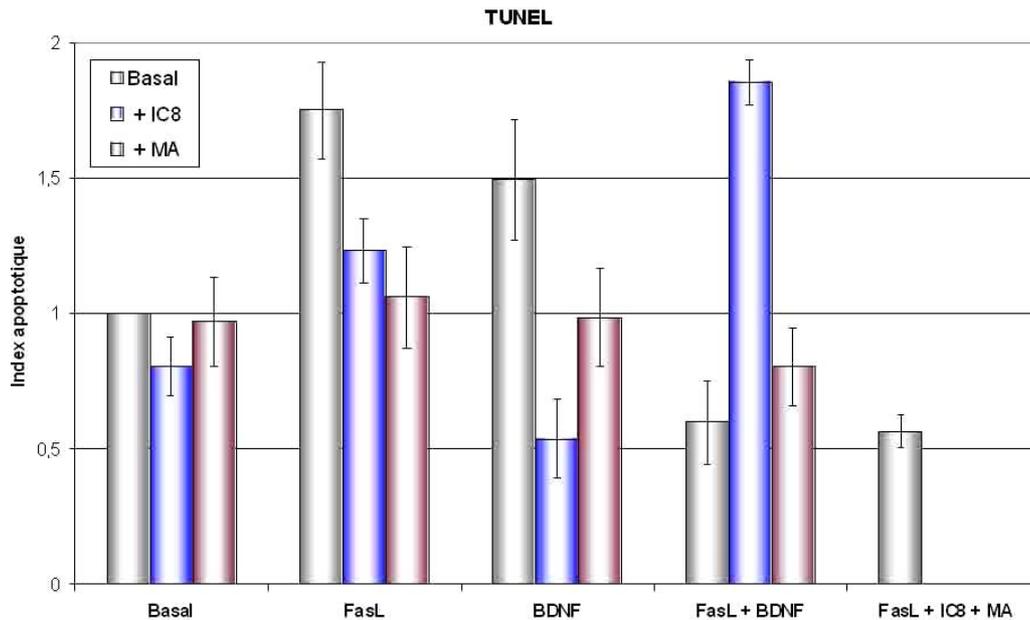


Figure 41. Mise en évidence des variations des index apoptotiques des cellules neuroblastiques, traitées avec différentes molécules, par les méthodes DAPI et TUNEL.

- L'activation des voies de signalisation des récepteurs Fas ou $p75^{NTR}$ augmente l'apoptose des cellules :

Que ce soit en présence de FasL ($2,99 \pm 0,48$, $p = 0,007$ pour la méthode DAPI et $1,75 \pm 0,181$, $p = 0,004$ pour la méthode TUNEL) ou de BDNF ($1,78 \pm 0,18$, $p = 0,005$ pour la méthode DAPI et $1,49 \pm 0,22$, $p = 0,04$ pour la méthode TUNEL), l'index apoptotique des cellules est augmenté par rapport à celui obtenu pour des cellules à l'état basal (1).

- La co-activation des deux récepteurs inhibe l'effet pro-apoptotique de FasL et BDNF :

L'effet pro-apoptotique de FasL, d'une part, et de BDNF, d'autre part, disparaît lorsque ces deux ligands sont administrés en association ($0,71 \pm 0,13$, $p = 0,005$ et $p = 0,003$ pour la méthode DAPI et $0,6 \pm 0,15$, $p = 0,001$ et $p = 0,008$ pour la méthode TUNEL en comparaison avec les taux d'apoptose obtenus respectivement avec FasL ou BDNF seul).

- Des inhibiteurs de la caspase-8 ou des sphingomyélinases neutres modifient l'apoptose induite par FasL ou BDNF :

Des expériences d'inhibition des voies de signalisation ont été réalisées avec un inhibiteur de la caspase-8 (IC8), inhibiteur qui bloque la voie apoptotique induite par le récepteur Fas, et un inhibiteur des sphingomyélinases neutres (N-SMAse, Dobrowsky et Carter, 1998), la manumycine A (MA). Les N-SMAse sont connues comme étant impliquées dans la voie des céramides induite par l'activation du récepteur p75^{NTR} (Dobrowsky et al., 1994 ; Brann et al., 1999 et 2002).

L'IC8, lorsqu'il agit seul, réduit spontanément le taux d'apoptose, si celui-ci est détecté par la méthode TUNEL ($0,80 \pm 0,11$, $p = 0,04$), alors qu'aucun effet ne peut lui être attribué si le niveau d'apoptose est étudié avec la méthode DAPI ($1,04 \pm 0,05$, $p > 0,05$). Associé à FasL, l'IC8 diminue logiquement l'effet pro-apoptotique de ce ligand ($1,63 \pm 0,42$ pour FasL associé à l'IC8 vs $2,99 \pm 0,48$ pour FasL seul, $p = 0,0014$ pour la méthode DAPI et $1,23 \pm 0,117$ vs $1,75 \pm 0,181$, $p = 0,005$ pour la méthode TUNEL). De même, l'apoptose induite suite à l'exposition des cellules avec du BDNF est diminuée par l'IC8 ($0,54 \pm 0,146$ vs $1,49 \pm 0,22$ sans IC8, $p = 0,0056$ avec la méthode TUNEL). Enfin, l'IC8 abolit l'effet anti-apoptotique observé lors de la co-stimulation des cellules par FasL et BDNF ($2,99 \pm 0,5$ pour FasL et BDNF associés à l'IC8 vs $0,71 \pm 0,13$ pour FasL et BDNF seuls, $p = 0,0008$ pour la méthode DAPI et $1,85 \pm 0,084$ vs $0,6 \pm 0,15$, $p = 0,0008$ pour la méthode TUNEL).

L'effet de la MA sur l'apoptose cellulaire a ensuite été étudié dans les mêmes conditions expérimentales que celles testées pour l'IC8. Alors qu'elle n'a pas d'effet sur le taux d'apoptose basal des cellules ($1,06 \pm 0,18$ pour la méthode DAPI et $0,97 \pm 0,167$, $p = 0,49$ pour la méthode TUNEL), la MA diminue de façon significative le taux d'apoptose due à l'exposition des cellules à FasL ($1,15 \pm 0,27$ vs $2,99 \pm 0,48$ sans MA pour la méthode DAPI et $1,06 \pm 0,187$ vs $1,75 \pm 0,181$, $p = 0,01$ pour la méthode TUNEL) et à BDNF ($0,98 \pm 0,13$ vs $1,78 \pm 0,18$ sans MA, $p = 0,04$ pour la méthode DAPI et $0,98 \pm 0,018$ vs $1,49 \pm 0,22$, $p = 0,03$ pour la méthode TUNEL). De plus, contrairement à l'IC8, la MA n'a pas d'action significative sur l'effet anti-apoptotique de la co-activation par FasL et BDNF ($1,03 \pm 0,04$ vs $0,71 \pm 0,13$ sans MA, $p = 0,28$ pour la méthode DAPI et $0,80 \pm 0,142$ vs $0,60 \pm 0,154$, $p = 0,17$ pour la méthode TUNEL).

Finalemment, un effet additif des actions anti-apoptotiques de l'IC8 et de la MA sur l'apoptose induite par FasL a pu être constaté ($0,57 \pm 0,061$ avec l'IC8 et la MA vs $1,23 \pm 0,117$ sans MA, $p = 0,005$ et $1,06 \pm 0,187$ sans IC8, $p = 0,035$ pour la méthode TUNEL).

II - L'effet pro-apoptotique de FasL est inhibé par le NGF dans les cellules SH-SY5Y et U-87 MG

II.1 - Les deux lignées cellulaires expriment le récepteur TrkA à leur surface

Le récepteur TrkA, récepteur de haute affinité pour le NGF, a été recherché par immunofluorescence et par cytométrie en flux, à la surface des cellules des lignées neuroblastique et gliale.

Un anticorps polyclonal anti-TrkA a été utilisé afin de détecter la protéine (Figure 42). Ainsi, un marquage fluorescent a été observé à la surface des cellules, quelle que soit la lignée étudiée. De même, un décalage du pic de fluorescence, par rapport au contrôle isotypique (superposé en gris), a pu être observé, que ce soit pour les cellules SH-SY5Y (IMF = $0,394 \pm 0,059$) ou pour les cellules U-87 MG (IMF = $1,123 \pm 0,09$), confirmant que ces deux types cellulaires expriment bien le récepteur TrkA.

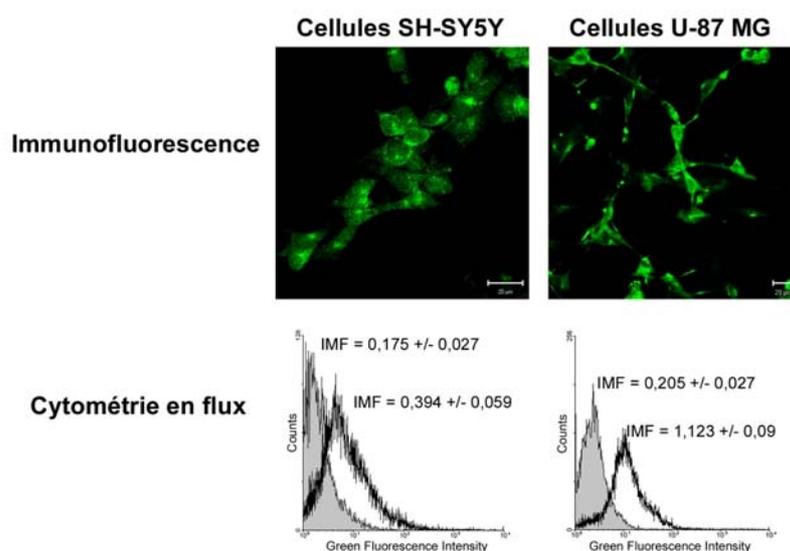


Figure 42. Détection de l'expression des récepteurs TrkA dans les lignées neuroblastique et gliale par immunofluorescence indirecte et cytométrie en flux.

II.2 - Analyse du taux d'apoptose cellulaire en présence de FasL, NGF, IC8 et MA

Les index apoptotiques des cellules (obtenus en comparaison des valeurs obtenues à l'état basal fixé à 1) ont été déterminés par la méthode TUNEL pour les cellules SH-SY5Y (Figure 43) et par la méthode ELISA pour les cellules U-87 MG (Figure 44).

Le NGF diminue le niveau d'apoptose des cellules SH-SY5Y en comparaison avec le taux d'apoptose basal, qu'il soit administré seul ($0,52 \pm 0,034$, $p = 0,036$), ou après activation par FasL ($0,66 \pm 0,13$ pour FasL associé au NGF comparé avec $1,75 \pm 0,181$ pour FasL seul, $p = 0,012$). Cependant, alors que l'IC8 diminue l'apoptose induite par FasL, il n'a aucune action sur l'effet anti-apoptotique du NGF seul ($0,58 \pm 0,025$ pour le NGF associé à l'IC8 vs $0,52 \pm 0,034$ pour le NGF seul, $p = 0,12$) ou sur l'effet du NGF associé à FasL ($0,44 \pm 0,075$ pour FasL + NGF + IC8 vs $0,66 \pm 0,132$ sans l'IC8, $p = 0,28$). Finalement, l'effet anti-apoptotique du NGF est supprimé en présence de MA ($1,21 \pm 0,142$, vs $0,52 \pm 0,034$ pour le NGF seul, $p = 0,049$) alors que la MA n'a pas d'effet lorsque le NGF est associé à FasL ($0,83 \pm 0,12$ en présence de MA vs $0,66 \pm 0,132$ sans MA, $p = 0,18$).

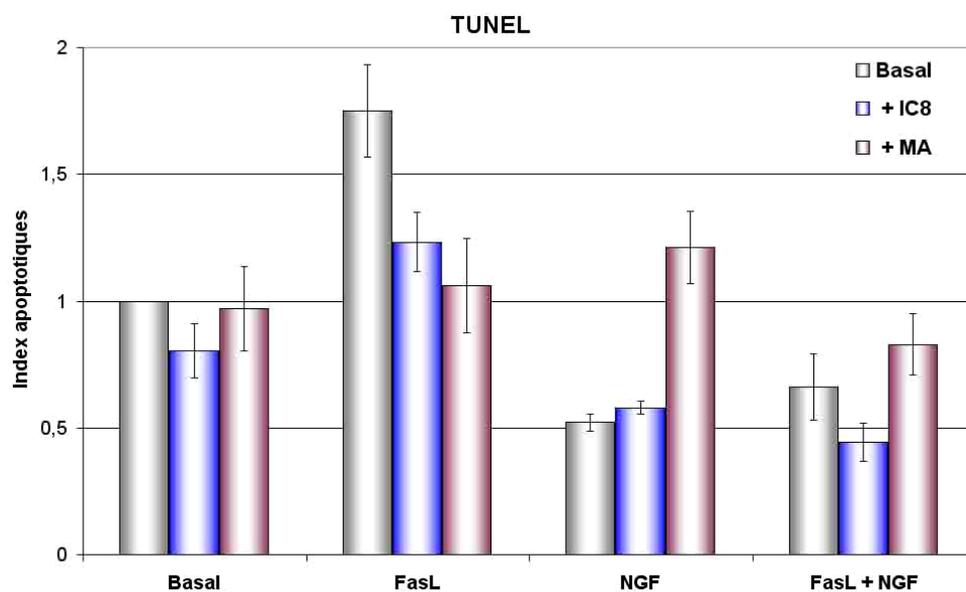


Figure 43. Etude des variations de l'apoptose des cellules SH-SY5Y, en présence de Fas, NGF, IC8 et MA, grâce à la méthode TUNEL.

Les variations du taux d'apoptose des cellules U-87 MG ont été étudiées par la méthode "Cell Death Detection ELISA Plus" (Figure 44). Comme pour le neuroblastome, le NGF diminue légèrement l'apoptose des cellules U-87 MG à l'état basal ($0,89 \pm 0,06$ avec du NGF vs 1 à l'état basal, $p = 0,15$) ou après activation par FasL ($1,03 \pm 0,17$ pour FasL plus NGF vs $1,52 \pm 0,06$ pour FasL seul, $p = 0,024$). L'IC8 n'a aucun effet sur les voies de signalisation induites par le NGF ($0,89 \pm 0,06$ avec du NGF vs $0,80 \pm 0,18$ pour NGF plus IC8, $p = 0,44$) alors qu'il diminue l'apoptose induite par FasL ($1,52 \pm 0,06$ pour FasL seul vs $0,76 \pm 0,19$ pour FasL plus IC8, $p = 0,018$).

Finalement, l'effet anti-apoptotique du NGF est augmenté en présence de MA ($0,89 \pm 0,06$ avec du NGF vs $0,61 \pm 0,03$ pour NGF plus MA, $p = 0,027$) et la MA diminue l'action protectrice du NGF associé à FasL ($1,03 \pm 0,17$ pour FasL plus NGF vs $1,41 \pm 0,10$ pour FasL plus NGF plus MA, $p = 0,13$).

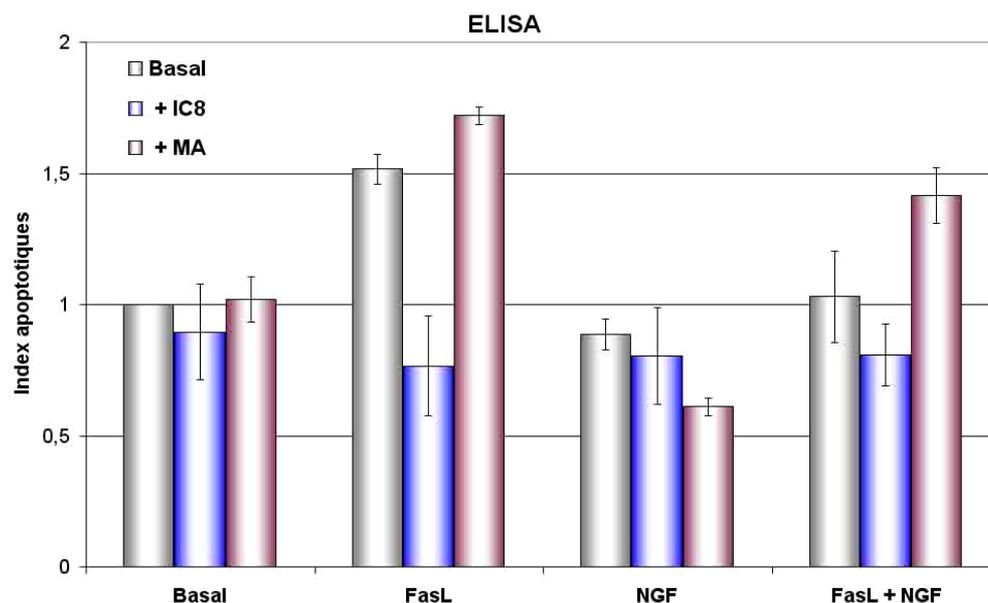


Figure 44. Etude des variations de l'apoptose des cellules U-87 MG, en présence de Fas, NGF, IC8 et MA, grâce à la méthode ELISA.

III - La combinaison de FasL, étoposide et dexaméthasone empêche le développement de tumeurs gliales *in vivo*

III.1 - Caractérisation des cellules U-87 MG

Afin de permettre la mise en évidence ultérieure des cellules U-87 MG xéno greffées dans des cerveaux de rats immunodéprimés, cette lignée gliale a tout d'abord été caractérisée (Figure 45).

Des anticorps spécifiques des différents types cellulaires présents dans le cerveau ont permis de montrer que la lignée U-87 MG exprime la GFAP (Anti-GFAP Ab), un marqueur des astrocytes, ainsi que CD68 (Anti-CD68 mAb), un marqueur exprimé par la microglie et certains astrocytes tumoraux (Zarate et Sampaolesi, 1999), alors que les neurofilaments (Anti-NF mAb), spécifiques des neurones, ne sont pas exprimés par les cellules tumorales.

Un dernier immunomarquage a montré l'expression, à la surface des cellules, du HLA de classe I (Anti-HLA mAb), un marqueur spécifique des cellules humaines.

Des contrôles isotypiques ont systématiquement été réalisés mais aucun marquage n'a jamais pu être détecté.

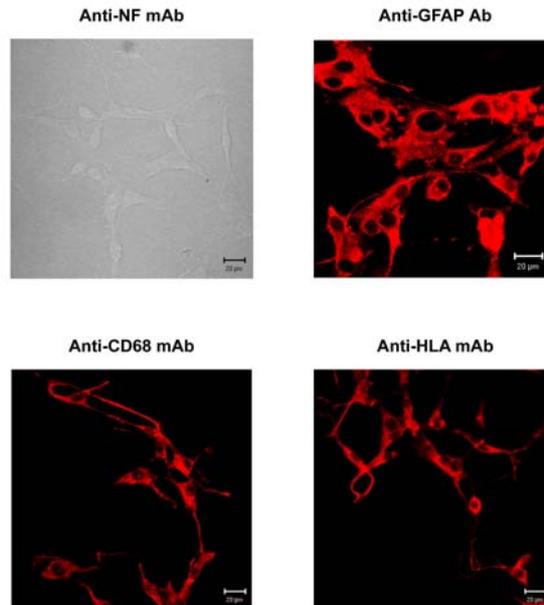


Figure 45. Analyse immunocytochimique des marqueurs exprimés par les cellules U-87 MG.

III.2 - Le récepteur Fas est exprimé à la surface des cellules U-87 MG, même après exposition à du FasL et de l'étoposide

L'étude de l'expression du récepteur Fas dans la lignée U-87 MG a tout d'abord été réalisée par Western-blotting (Figure 46). Les protéines des lysats cellulaires, obtenues à partir de cellules Jurkat (J, contrôle positif) et à partir de cellules U-87 MG à l'état basal (U-87) ou après exposition à FasL et étoposide (+F+E) ont été séparées par SDS-PAGE puis transférées sur une membrane. Quelles que soient les conditions d'activation, une protéine de 45 kDa a été détectée grâce à un anticorps polyclonal anti-Fas (C-20), montrant que le récepteur Fas reste exprimé dans la lignée cellulaire à l'état basal ainsi qu'après traitement des cellules avec FasL et étoposide.

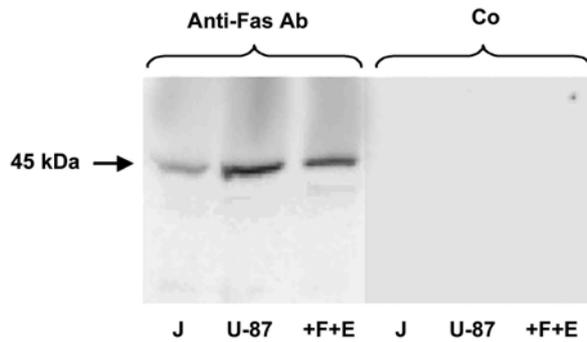


Figure 46. Détection par Western-blotting de l'expression du récepteur Fas au niveau de cellules gliales à l'état basal ou après exposition à FasL et étoposide.

Des marquages en immunofluorescence (Figure 47), réalisés à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-Fas (B-G27), ont confirmé que le récepteur Fas est bien exprimé à la surface des cellules, même après exposition à du FasL associé à l'étoposide.

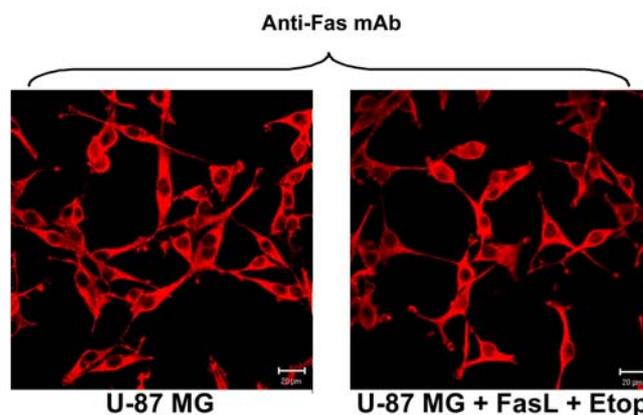


Figure 47. Etude immunocytochimique de l'expression de Fas au niveau de la lignée gliale U-87 MG à l'état basal ou après exposition à FasL et étoposide.

Lors des deux expérimentations, un contrôle (Co pour le Western-blotting), utilisant des anticorps isotypiques, a également été réalisé.

III.3 - Les cellules U-87 MG entrent en apoptose en présence de FasL et d'étoposide

Le taux d'apoptose des cellules U-87 MG après exposition aux molécules FasL et étoposide, à différentes concentrations, a été déterminé grâce aux techniques de dosage des nucléosomes solubles ("Cell Death Detection ELISA Plus") et TUNEL en immunofluorescence. Les index apoptotiques ont été calculés à partir du taux d'apoptose basal, arbitrairement fixé à 1.

Le taux d'apoptose des cellules U-87 MG a tout d'abord été déterminé par ELISA après exposition à des doses croissantes d'étoposide (5 à 80 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 48). Ainsi, quelle que soit la concentration en étoposide, le niveau apoptotique des cellules est significativement augmenté par rapport à celui obtenu pour des cellules non stimulées ($p < 0,013$ quelle que soit la concentration en étoposide testée). Le taux d'apoptose des cellules ne semble cependant pas corrélé avec l'augmentation de la concentration d'étoposide. Ainsi, la concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ d'étoposide a été choisie pour continuer l'étude. En effet, cette concentration induit le taux d'apoptose le plus élevé au niveau des cellules U-87 MG ($17,1 \pm 1,3$) et elle correspond à la concentration la plus couramment employée *in vitro* (Boesen-de Cock et al., 1998 ; Takahashi et al., 1998).

Les variations des taux d'apoptose ont ensuite été déterminées en présence de doses croissantes de FasL (5 à 80 ng/mL). Contrairement aux résultats obtenus précédemment pour l'étoposide, l'apoptose augmente avec la concentration de FasL et semble s'accroître de façon dose-dépendante. De plus, l'association de FasL (5 à 80 ng/mL) et de l'étoposide (10 $\mu\text{g/mL}$) augmente de façon synergique l'apoptose des cellules en comparaison avec la mort cellulaire obtenue pour des concentrations équivalentes de FasL seul (Figure 48 et Tableau 11).

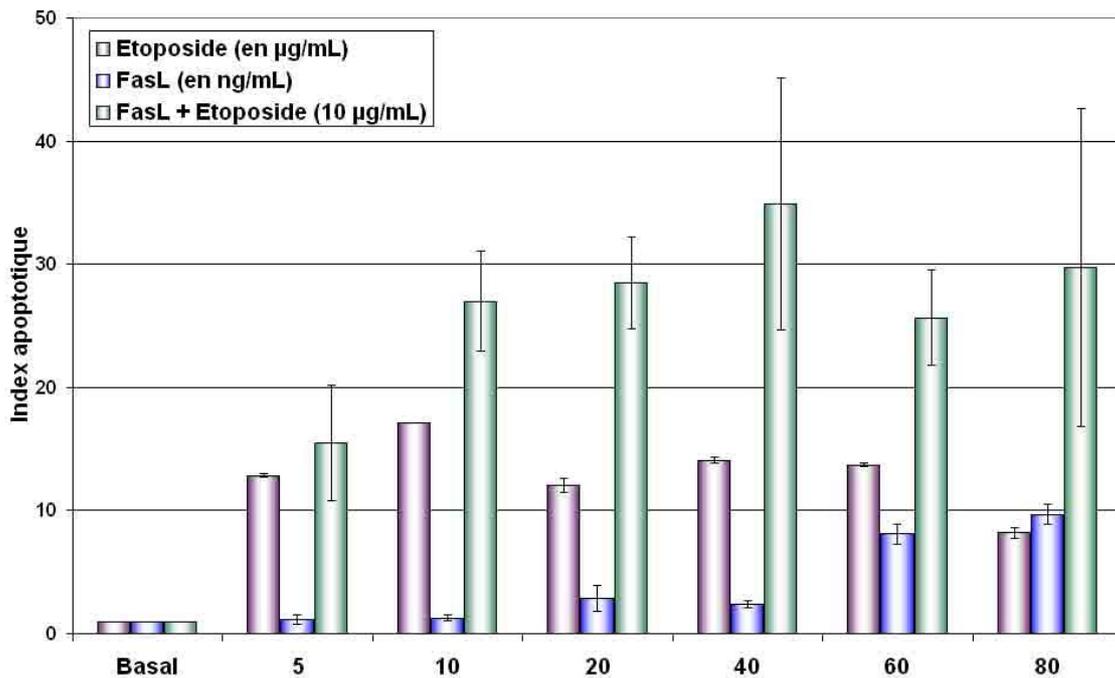


Figure 48. Etude des variations de l'index apoptotique des cellules U-87 MG par dosage des nucléosomes solubles.

Les cellules sont traitées avec de l'étoposide ou du FasL à des concentrations croissantes, ou avec des concentration croissantes de FasL associées à de l'étoposide à 10 µg/mL. L'association des deux molécules augmente de façon synergique l'effet pro-apoptotique des molécules testées séparément.

	Index apoptotique sans addition d'ètoposide	Probabilité de différences significatives	Index apoptotique après addition d'ètoposide à 10 µg/mL	Probabilité de différences significatives avec ou sans ajout d'ètoposide
FasL à 5 ng/mL	1,15 ± 0,39*	*, p = 0,0228 §, p = 0,0044 #, p = 0,003 ∞, p = 0,0004	15,47 ± 4,68	p = 0,007
FasL à 10 ng/mL	1,28 ± 0,22 [§]		26,98 ± 4,08	p = 0,001
FasL à 20 ng/mL	2,87 ± 1,04* [#]		28,5 ± 3,75	p = 0,001
FasL à 40 ng/mL	2,36 ± 0,29 ^{§∞}		34,86 ± 10,22	p = 0,0134
FasL à 60 ng/mL	8,09 ± 0,83 [#]		25,66 ± 3,85	p = 0,0011
FasL à 80 ng/mL	9,69 ± 0,83 [∞]		29,69 ± 12,90	p = 0,1095

Tableau 11. Analyse statistique des résultats obtenus lors de l'étude des variations de l'index apoptotique des cellules U-87 MG mises en présence de FasL à des concentrations croissantes, associées ou non à de l'ètoposide (10 µg/mL).

Le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé grâce à la méthode TUNEL (Figure 49). Les résultats obtenus confirment ceux obtenus par ELISA. L'association de FasL (40 ng/mL) et de l'ètoposide (10 µg/mL) augmente de façon synergique l'apoptose des cellules gliales, comparé au taux de mort cellulaire obtenu pour les cellules stimulées avec FasL seul ou l'ètoposide seul (*17,45 ± 3,8 pour FasL + ètoposide vs 2,09 ± 0,37 pour FasL seul et 3,78 ± 0,45 pour l'ètoposide seul, p = 0,0018 et p = 0,0033 respectivement*). De plus, des concentrations croissantes de FasL (40, 60 et 80 ng/mL) associées à l'ètoposide à 10 µg/mL augmentent le pourcentage de cellules en apoptose de façon dose dépendante (*p < 0,0175 quelles que soient les concentrations de FasL étudiées*).

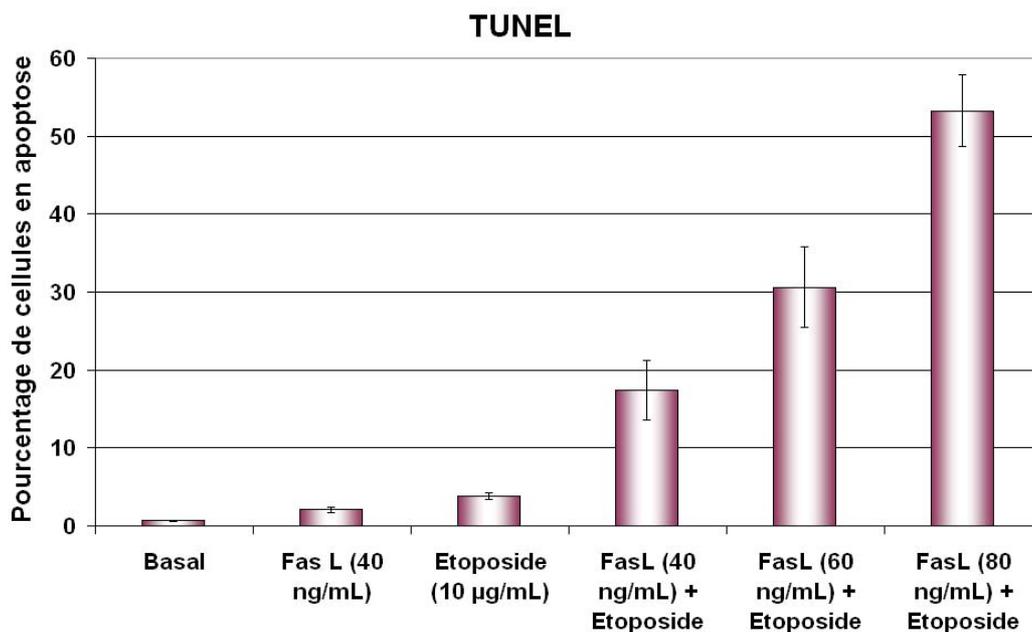


Figure 49. Détermination par la technique TUNEL du pourcentage de cellules U-87 MG en apoptose après traitement par FasL et étoposide.

Ces résultats ont permis de déterminer les doses de FasL (40 ng/mL) et d'étoposide (10 µg/mL) suffisantes pour induire l'apoptose des cellules. Ces concentrations ont ainsi été utilisées pour la suite de cette étude.

III.4 - FasL et étoposide diminuent la prolifération des cellules gliales

L'analyse de la survie et de la prolifération cellulaire a été réalisée selon deux méthodes, la première basée sur la réduction du MTT par une enzyme mitochondriale et la seconde sur l'incorporation du BrdU au niveau de l'ADN des cellules en division. Pour le test MTT, les valeurs de viabilité ont été calculées à partir du taux basal de viabilité des cellules, arbitrairement fixé à 1.

Les analyses de réduction du MTT (Figure 50) ont montré que FasL (40 ng/mL) augmente légèrement la viabilité des cellules par rapport à l'état basal ($1,08 \pm 0,05$ vs 1 , $p = 0,0034$), alors que l'étoposide (10 µg/mL) la diminue significativement ($0,80 \pm 0,06$, $p =$

0,0001). De plus, comparé aux valeurs obtenues avec FasL seul, l'association FasL/étoposide diminue significativement la viabilité cellulaire ($1,08 \pm 0,05$ pour FasL seul vs $0,68 \pm 0,06$ pour FasL plus etoposide, $p < 0,0001$). Il en est de même si l'on compare les valeurs obtenues avec l'étoposide seul ($0,68 \pm 0,06$ pour FasL plus etoposide vs $0,80 \pm 0,08$ pour l'étoposide seul, $p = 0,032$).

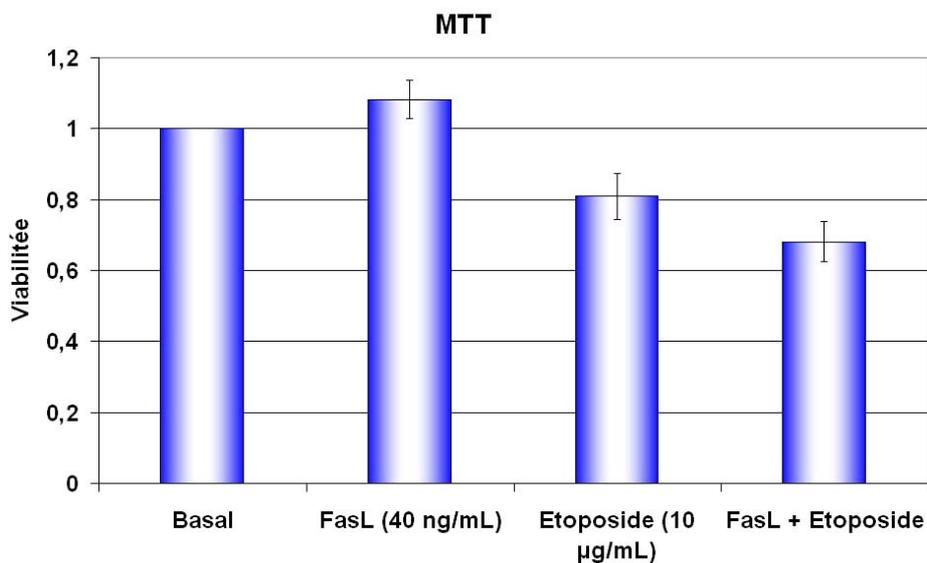


Figure 50. Etude de la viabilité des cellules gliales après exposition à FasL et étoposide par analyse de la réduction du MTT.

Les analyses d'incorporation du BrdU (Figure 51) ont ensuite montré que FasL ne modifie pas la division des cellules ($44,93 \pm 6,69$ pour FasL vs $51,93 \pm 5,89$ pour les cellules non stimulées, $p = 0,3841$) alors que l'étoposide la diminue fortement ($11,57 \pm 2,46$ vs $51,93 \pm 5,89$, $p = 0,0002$). Enfin, l'association FasL/étoposide diminue la prolifération des cellules par rapport à l'effet obtenu avec FasL seul ($5,66 \pm 1,92$ pour FasL et etoposide vs $44,93 \pm 6,69$ pour FasL, $p = 0,0024$) ou avec l'étoposide seul ($5,66 \pm 1,92$ pour FasL et etoposide vs $11,57 \pm 2,46$ pour l'étoposide seul, $p = 0,0626$).

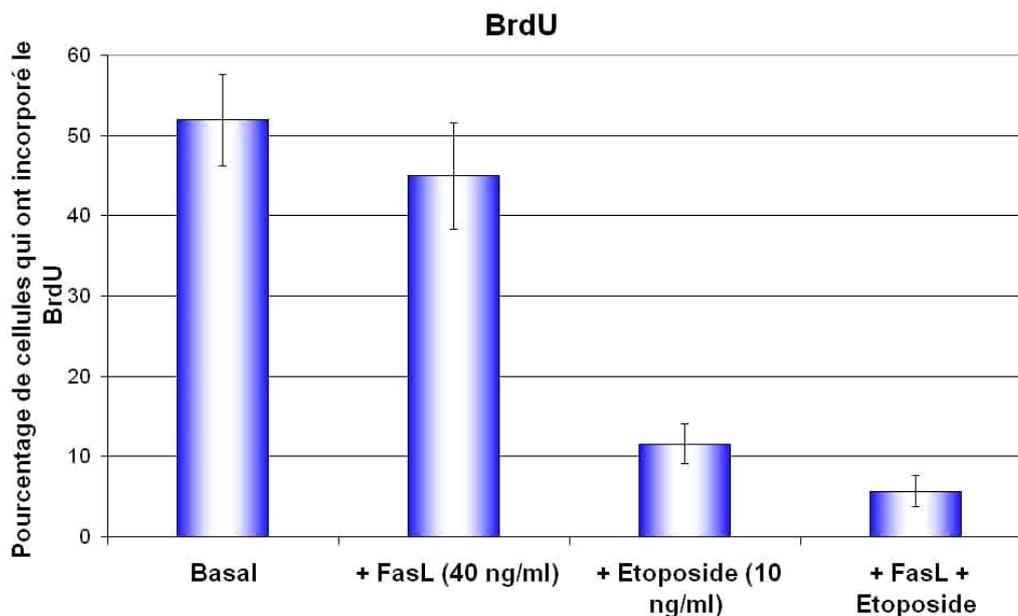


Figure 51. Analyse de la prolifération des cellules gliales, en présence de FasL et d'étoposide, par détection de l'incorporation du BrdU.

III.5 - Vérification des coordonnées de stéréotaxie

Les cellules U-87 MG ont ensuite été injectées dans des cerveaux de rats immunodéprimés afin de provoquer l'apparition d'une tumeur gliale.

Du bleu de méthylène a été utilisé afin d'adapter les coordonnées de stéréotaxie au matériel et aux rats greffés (Figure 52). Après avoir recherché les coordonnées stéréotaxiques du putamen caudal droit, 1 μ L de bleu de méthylène a été injecté selon les coordonnées déterminées dans des cerveaux de rat. Les rats ont alors été euthanasiés, leur cerveau congelé et coupé pour des observations au microscope. Le bleu de méthylène a été détecté au centre du putamen caudal droit et les coordonnées AP = 0,5 mm, L = - 2,7 mm et DV = 4,4, par rapport au bregma, ont, de ce fait, été respectées lors de chaque opération.



Figure 52. Vérification des coordonnées de stéréotaxie grâce à l'injection de bleu de méthylène.

III.6 - Les xénogreffes de cellules U-87 MG aboutissent à la formation d'une tumeur

L'analyse de la viabilité cellulaire, grâce au bleu de Trypan, des cellules incubées 1 heure dans du LCR (temps maximum entre le moment où les cellules ont été collectées et le moment où elles sont greffées), n'a pas montré une augmentation significative de la mortalité des cellules.

Les cellules U-87 MG ont été greffées à raison de 10^6 cellules par greffe dans des cerveaux de rats Nude ($n = 5$) et les animaux ont été observés quotidiennement après l'intervention. Des symptômes neurologiques sont apparus pour tous les rats entre le vingtième et le trentième jour après la greffe. Les examens cliniques ont montré une altération physique générale des animaux avec de signes récurrents comme la perte de poids, l'épistaxis, la perte d'équilibre, la diminution de la proprioception, la parésie et l'inclinaison de la tête.

L'euthanasie des animaux a été rapidement réalisée après l'apparition des symptômes afin de limiter leur souffrance. En absence de signes cliniques, tous les animaux ont été euthanasiés le 30^{ème} jour (Figure 53).

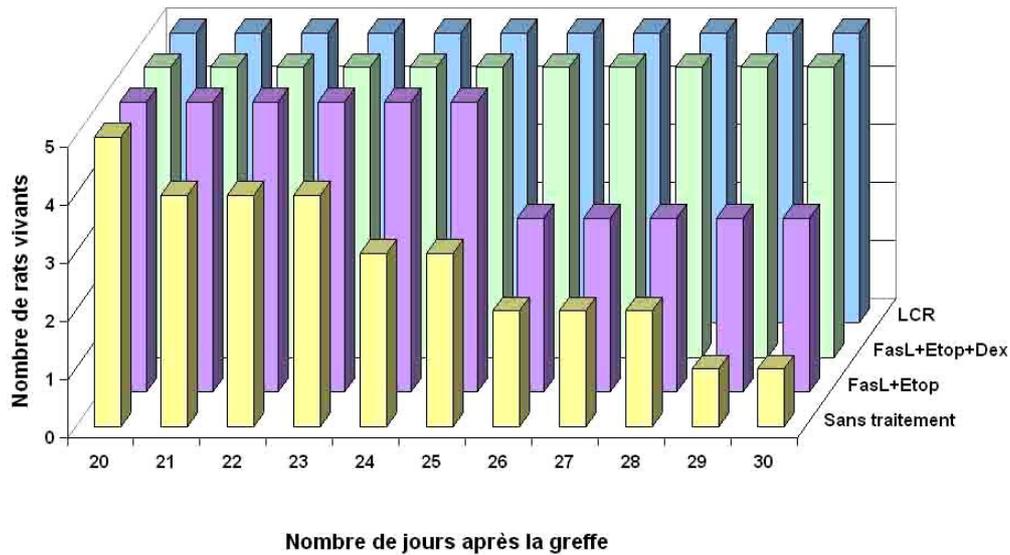


Figure 53. Représentation graphique des différents jours d'euthanasie des rats.

Après euthanasie des rats, des coupes de cerveaux ont été réalisées et colorées grâce à de l'hématoxyline (Figure 54).

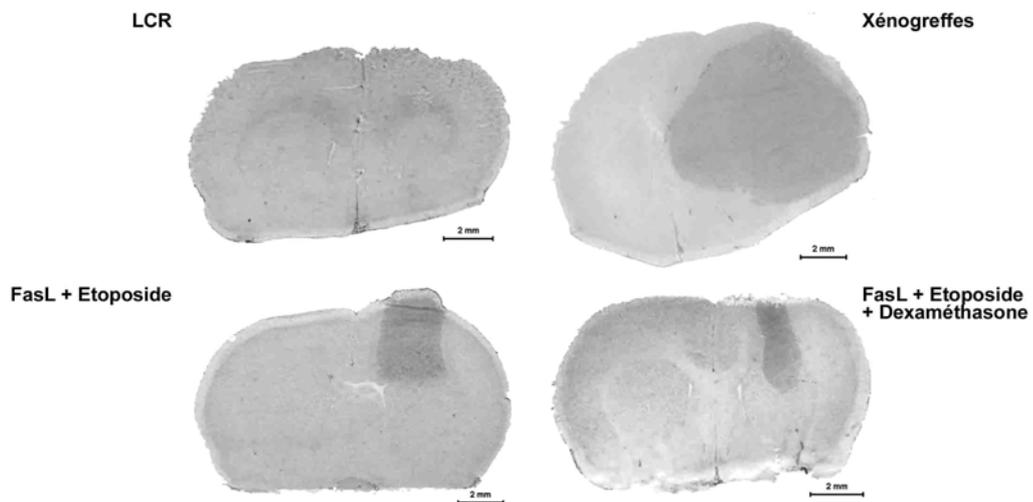


Figure 54. Coloration à l'hématoxyline de coupes des cerveaux de rats.

Une large masse tumorale dont la surface moyenne est de $40,64 \pm 6,41 \text{ mm}^2$, a ainsi pu être observée au niveau du putamen caudal droit (Xénogreffes), zone où les cellules ont été implantées (Figure 55).

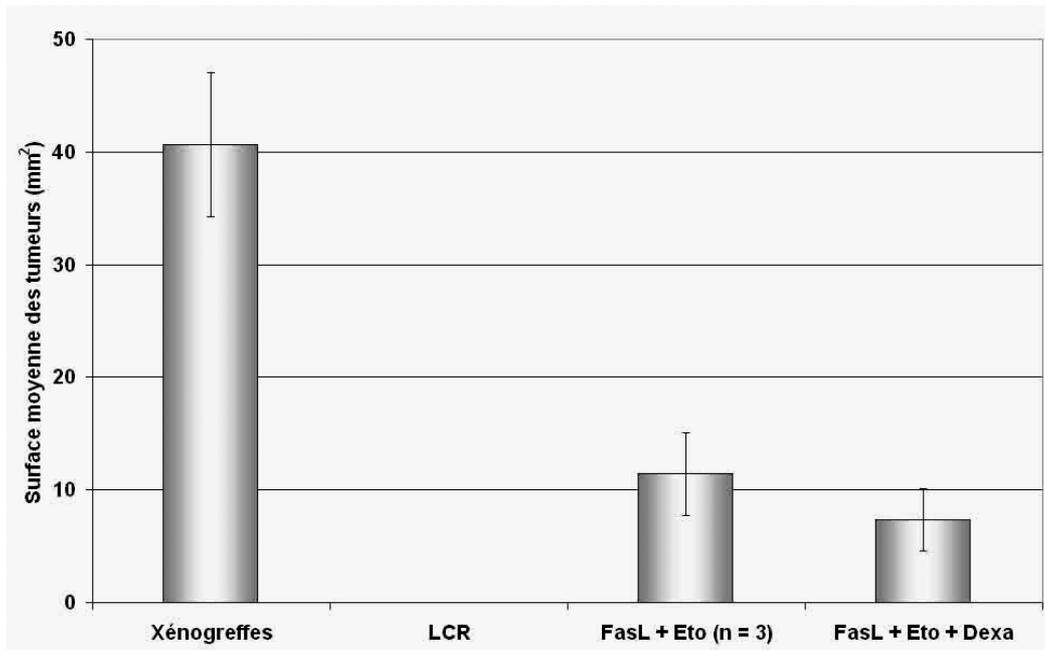


Figure 55. Valeurs de la surface moyenne des tumeurs.

Cette masse tumorale est composée de cellules présentant des morphologies anatomopathologiques différentes de celles des cellules des cerveaux des rats. De plus, aucune masse cellulaire n'a jamais pu être détectée au niveau du putamen caudal gauche ou au niveau des autres zones cérébrales examinées après coupes sériées.

Afin de démontrer que la tumeur provient bien de la prolifération des cellules U-87 MG, des marquages HES et immunohistochimiques ont été réalisés. Les observations des marquages HES au microscope ont confirmé que la morphologie des cellules est totalement différente de celle des cellules du cerveau (Figure 56). Les coupes des cerveaux ont ensuite été exposées aux anticorps utilisés en immunocytochimie pour caractériser les cellules U-87 MG. Les anticorps anti-CD68, anti-GFAP, anti-HLA et anti-Fas se sont fixés sur des protéines situées sur les cellules de la tumeur (T) alors que l'anticorps anti-NF n'a reconnu qu'une protéine exprimée en dehors de la zone tumorale, au niveau des tissus de cerveaux des rats (C). La masse tumorale est donc bien due à la prolifération des cellules U-87 MG, qui expriment le marqueur humain spécifique HLA, et non à la prolifération de cellules issues des tissus cérébraux de rats. Enfin, l'expression de la protéine Fas a été détectée au niveau de la

tumeur. Ce résultat est essentiel pour la suite des travaux puisque l'expression du récepteur Fas permet d'envisager l'analyse *in vivo* de l'effet de FasL sur les tumeurs gliales (Figure 56).

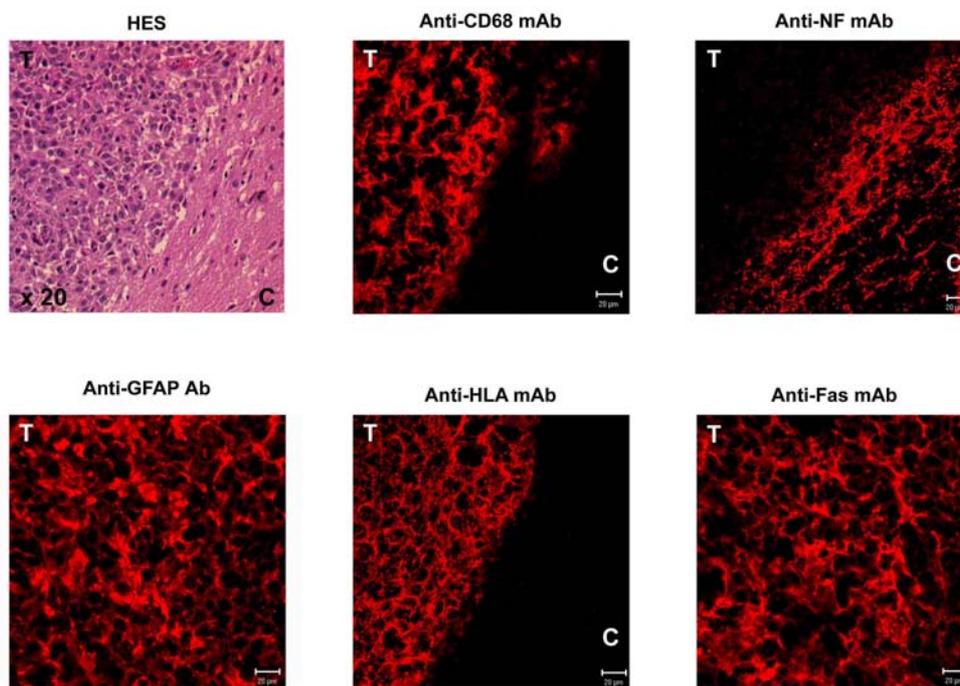


Figure 56. Analyse des marqueurs cellulaires exprimés au niveau des tumeurs de cellules U-87 MG xéno greffées.

III.7 - Les injections de LCR n'ont aucun effet sur des rats immunodéprimés

Afin de déterminer un éventuel effet du LCR sur les cellules des cerveaux de rat, 4 μ L de LCR sans cellules ont été injectés par stéréotaxie et les pompes osmotiques ont été uniquement remplies de LCR (contrôles sains, n = 5). Trente jours après l'injection de LCR, aucun des 5 rats ne présentait de symptômes neurologiques (Figure 53) et les animaux avaient gagné en moyenne 12,7 % de leur poids initial. Les rats ont alors été euthanasiés, leur cerveau congelé et coupé. Les colorations des coupes en hématoxyline n'ont jamais montré la présence d'une tumeur (Figure 54 et 55) et les analyses en immunohistochimie n'ont jamais mis en évidence l'expression des protéines CD68, ni des marqueurs HLA. Aucune tumeur ne

s'est donc développée après injection de LCR. Les tumeurs observées après xéno greffes sont donc bien dues à l'injection des cellules et non à un artefact dû au LCR.

III.8 – L'association de FasL et de l'étoposide a un effet anti-tumoral

Des pompes osmotiques contenant les molécules FasL et étoposide ont été implantées à des rats ($n = 5$) 15 jours après la greffe des cellules U-87 MG. Les molécules de traitement ont ainsi été administrées pendant 15 jours. Parmi les 5 rats greffés et traités, deux ont développé des signes neurologiques, 26 jours après la greffe (Figure 53). Les signes cliniques observés étaient semblables à ceux déterminés lors des observations réalisées sur des rats greffés mais non traités. L'analyse systématique des pompes osmotiques, après l'euthanasie des rats, a montré qu'une quantité importante de solution de traitement était encore présente dans les pompes osmotiques des deux rats malades. L'apparition des symptômes cliniques était donc vraisemblablement due à un défaut d'administration du traitement plutôt qu'à l'inefficacité des molécules. Finalement, une masse tumorale ($30,72 \pm 2,45 \text{ mm}^2$) de taille comparable à celle des tumeurs de rats greffés mais non traités était visible.

Les 3 autres rats du lot n'ont jamais montré de signes cliniques pendant les 30 jours qui ont suivi la greffe et ont gagné 15,9 % de leur poids initial. Des colorations à l'hématoxyline des coupes de cerveaux (Figure 54) ont mis en évidence la présence d'une tumeur ($11,43 \pm 3,66 \text{ mm}^2$) de volume significativement plus réduit que celui observé chez les rats greffés non traités ($p = 0,0222$ si les volumes des tumeurs qui correspondent aux deux rats dont la pompe osmotique était défectueuse ne sont pas pris en compte) (Figure 55). Les études immunohistochimiques ont montré que les protéines CD68, GFAP, HLA et Fas étaient encore exprimées au niveau des cellules de la tumeur. Finalement, les études anatomo pathologiques macroscopiques des coupes des cerveaux ont mis en évidence un aspect inflammatoire des cerveaux des rats au niveau de la tumeur, caractérisé par la présence d'oedèmes et de dépôts fibrineux.

III.9 - La dexaméthasone augmente l'effet anti-tumoral de FasL associé à l'étoposide

Afin de limiter le processus inflammatoire observé chez les animaux traités par FasL et étoposide, la dexaméthasone, un immunosuppresseur systémique prescrit dans les cas de pathologies cérébrales, a été ajoutée à FasL et étoposide lors de la préparation des pompes osmotiques (n = 5).

Trente jours après la greffe, aucun des 5 rats greffés et traités avec FasL, étoposide et dexaméthasone n'a présenté de symptômes cliniques (Figure 53). Cependant, une perte de 7,6 % de leur poids initial a pu être constatée. Les colorations à l'hématoxyline des coupes de cerveaux de rats ont montré une diminution significative de la taille des tumeurs ($7,35 \pm 2,76 \text{ mm}^2$) (Figure 54 et 55), que ce soit par rapport à la taille des tumeurs des rats non traités ($p < 0,0001$) ou par rapport à celles des rats traités avec FasL et étoposide ($p = 0,0003$). Enfin, les marqueurs exprimés au niveau des cellules tumorales sont une fois encore le CD68, la GFAP, le HLA et Fas. Il est à noter que dans ce groupe de rats traités, la disparition complète de la tumeur a été observée pour l'un d'entre eux. Les marquages par immunohistofluorescence ont révélés l'absence de cellules tumorales HLA⁺ ou CD68⁺ dans les autres régions du cerveau examinées au niveau de coupes sériées.

IV - Séparation des cellules U-87 MG selon la méthode de fractionnement par couplage flux force (SdFFF)

IV.1 - Observation en microscopie inversée des cultures de la lignée gliale U-87 MG

La lignée U-87 MG présente, en microscopie inversée, deux types cellulaires morphologiquement distincts dans nos conditions de culture. Alors que certaines cellules sont adhérentes, de grande taille et avec des expansions cellulaires, d'autres sont de petite taille, sphériques, sans expansion cellulaire et regroupées en amas (Figure 57).

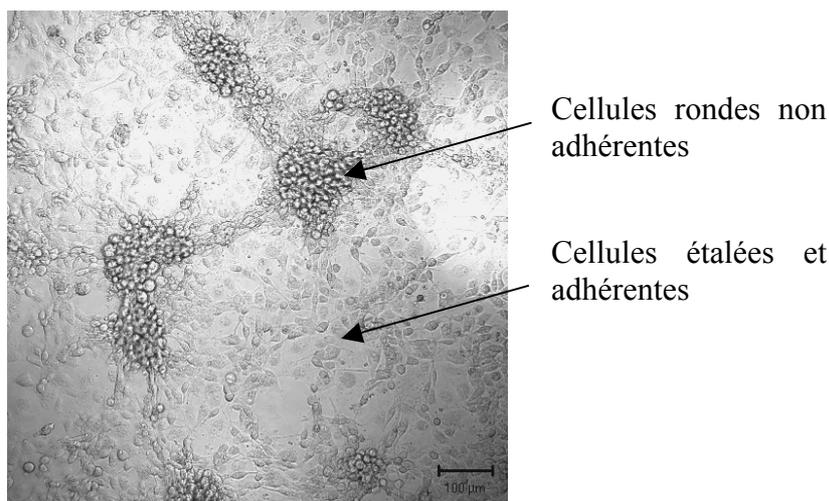


Figure 57. Aspect microscopique des cellules de la lignée U-87 MG.

IV.2 - Observation des cellules après tri par SdFFF

La technique de SdFFF nous a permis de séparer dans la lignée deux ou trois populations cellulaires, selon les conditions de tri, présentant des caractéristiques de taille et de poids distinctes. La première fraction est composée de cellules de grande taille alors que la dernière fraction contient les cellules de plus petite taille. Une fraction de cellules totales non

triées mais injectées dans l'appareil de séparation sert de contrôle de l'altération cellulaire induite par l'élution.

Deux types de tris ont été réalisés, les canaux des machines différant selon leur taille. En effet, l'augmentation de l'épaisseur du canal de la machine permet d'améliorer la sélectivité en taille de l'élution cellulaire. Ainsi, le tri de sous-populations cellulaires ayant des différences de critères biophysiques (taille et densité) de faible amplitude devient plus précis.

Les cellules ont tout d'abord été séparées en deux fractions (F1 et F2) grâce à une machine à petit canal et remises en culture (Figure 58). La première fraction était composée de cellules adhérentes avec des prolongements cellulaires, exprimant fortement la N-CAM et faiblement le récepteur Fas (B-G27). Au contraire, la fraction F2 comprenait des cellules rondes faiblement adhérentes avec très peu de prolongements cellulaires. Les cellules de la fraction F2 exprimaient très fortement le récepteur Fas alors que la N-CAM n'a pas pu être détectée.

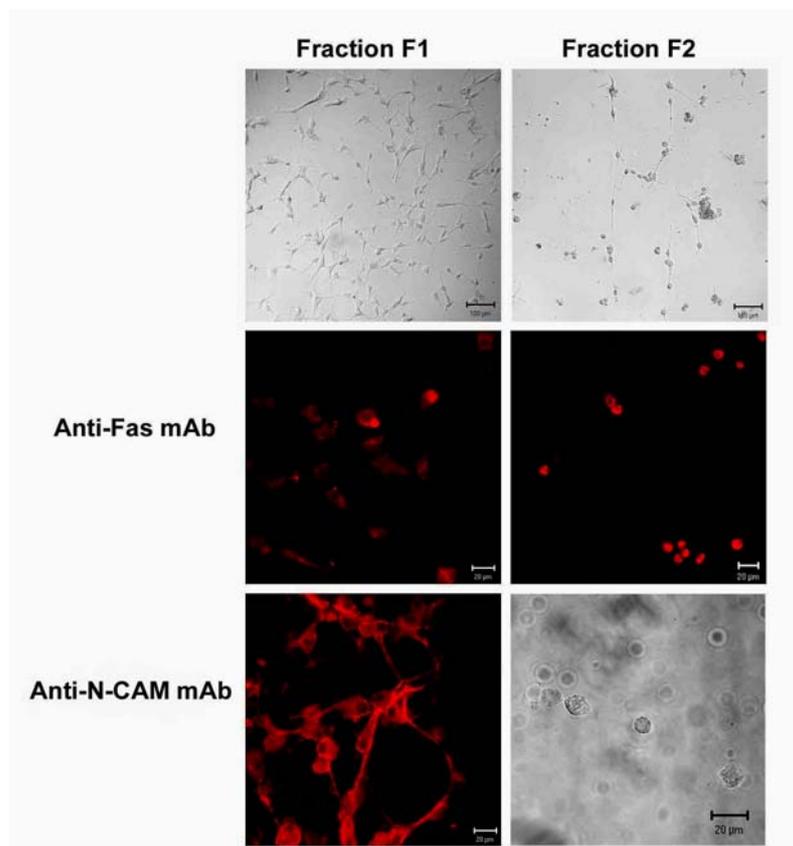


Figure 58. Analyse de la morphologie cellulaire et de l'expression des molécules Fas et N-CAM dans les fractions F1 et F2 des cellules U-87 MG triées par SdFFF.

Les résultats obtenus par immunofluorescence ont été confirmés par cytométrie en flux (Figure 59). Deux fenêtres permettant l'analyse des cellules de tailles différentes ont permis l'analyse des deux sous-populations cellulaires (fenêtres F1 et F2). Ainsi, un décalage du pic de fluorescence a été observé avec un anticorps anti-Fas couplé PE sur les cellules de petite taille (avec quelques cellules de grande taille marquées) et avec un anticorps anti-N-CAM couplé PE sur les cellules de grande taille (et non sur les cellules de petite taille).

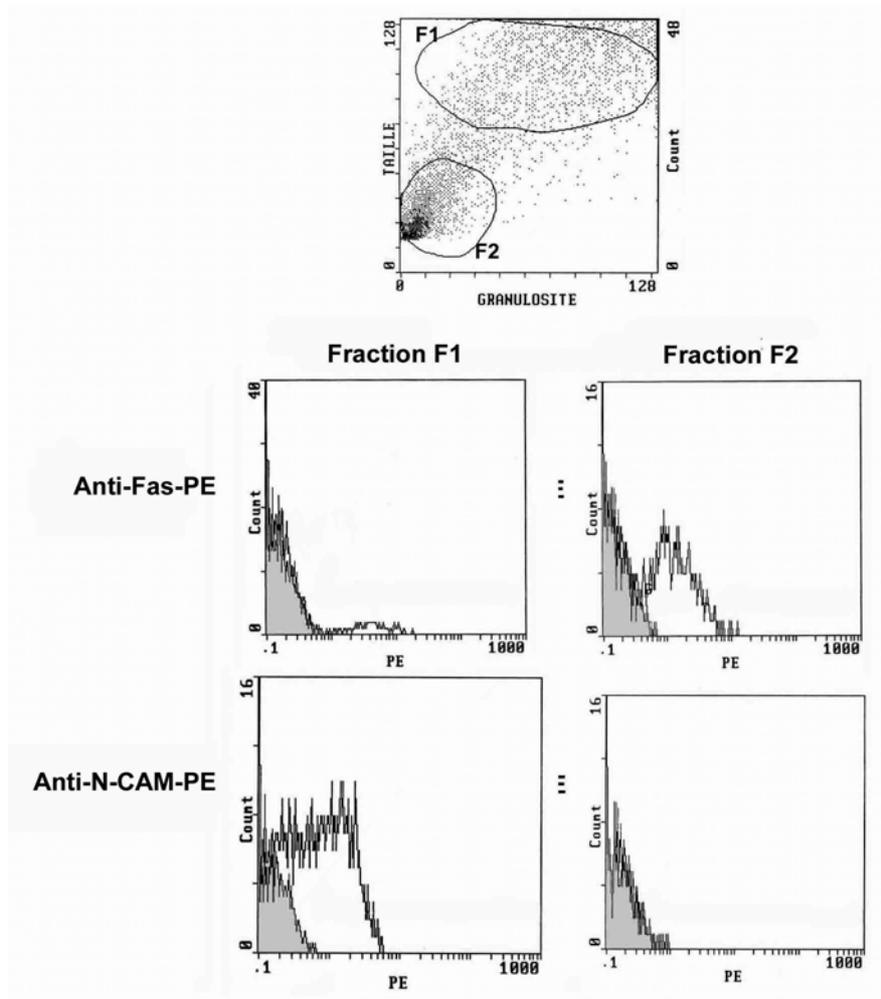


Figure 59. Analyse par cytométrie en flux des marquages Fas et N-CAM, sur les cellules triées en SdFFF.

La prolifération des cellules des différentes fractions a ensuite été déterminée en analysant par cytométrie en flux l'incorporation du BrdU, incubé pendant 48 heures en présence des cellules. Les fenêtres de tri déterminées pour la figure 59 ont été conservées lors

de cette analyse. Alors que les cellules de la fraction F2 n'ont quasiment pas incorporé de BrdU ($4,03 \pm 0,67$ % des cellules qui ont incorporé le BrdU), les cellules de la fraction F1 ($30,07 \pm 3,98$) se divisent beaucoup plus.

Le deuxième tri, réalisé avec une machine possédant un canal de taille supérieure à celui précédemment utilisé, a permis de séparer les cellules selon trois fractions distinctes (Figure 60). La fraction F1 est composée de cellules rondes, non adhérentes, sans expansion cellulaire et de tailles hétérogènes. La fraction F2 est composée de cellules rondes non adhérentes et de cellules adhérentes avec des expansions cellulaires. Enfin, la fraction F3 est composée de cellules rondes, non adhérentes, sans expansions cellulaires mais de taille plus homogène et plus petite que la taille des cellules observées en F1. Alors que les cellules de la fraction F2 ont rapidement reformé des réseaux semblables à ceux observés avant le tri, les cellules des fractions F1 et F3 n'ont pas adhéré après 2 mois en culture. Les cellules des fractions F1 et F3 n'ont pas adhéré lorsqu'elles ont été cultivées dans du milieu de culture provenant de cellules non triées. De même, aucune adhésion cellulaire n'a pu être constatée lorsque les cellules des fractions F1 et F3 ont été mélangées.

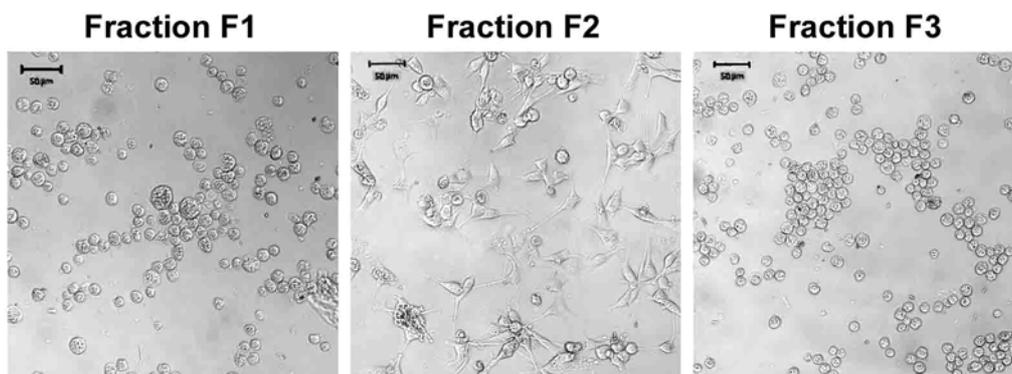


Figure 60. Analyse de la morphologie des cellules U-87 MG dans les fractions F1, F2 et F3.

V - Etude de l'expression des récepteurs de TRAIL dans les lignées cellulaires SH-SY5Y et U-87 MG

V.1 - Recherche des transcrits des TRAIL-R.

Les transcrits des quatre récepteurs de TRAIL ont été recherchés par RT-PCR sur des ARN totaux extraits de la lignée SH-SY5Y, grâce à des couples d'amorces spécifiques de chaque récepteur (Figure 61). Après séparation sur gel, des produits d'amplification de 506, 502 et 612 paires de bases, correspondant aux tailles attendues pour les récepteurs TRAIL-R1, -R2 et -R3 respectivement, ont été détectés. Le transcrite du récepteur TRAIL-R4 n'a pas pu être mis en évidence. Une réaction d'amplification a également été réalisée grâce à des amorces spécifiques de la β -actine (A), comme contrôle positif. Un marqueur de taille (M, 100 pb) a permis de déterminer la longueur de chaque fragment amplifié. Des témoins négatifs de PCR (Co) ont également été réalisés.

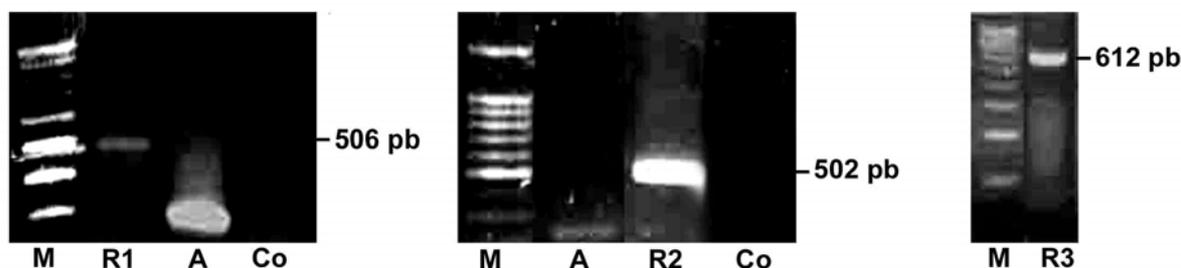


Figure 61. Mise en évidence de la présence des transcrits des récepteurs de TRAIL dans les cellules SH-SY5Y.

M : marqueur de taille ; R1, R2 et R3 : TRAIL-R recherché ; A : actine ; Co : contrôle.

V.2 - Recherche des protéines TRAIL-R selon différentes techniques immunologiques

V.2.A - Détection par Western-blotting

La recherche des quatre récepteurs de TRAIL a été réalisée sur des lysats totaux de cellules SH-SY5Y (NB) ou U-87 MG (U87) (Figure 62). Les anticorps anti-TRAIL-R1, R3 et R4 ont permis de détecter des protéines de 50, 27,4 et 41,8 kDa respectivement, tailles attendues pour chacun des récepteurs. Le récepteur TRAIL-R2 n'a pas pu être mis en évidence. Des contrôles isotypiques (Co) ont systématiquement été réalisés.

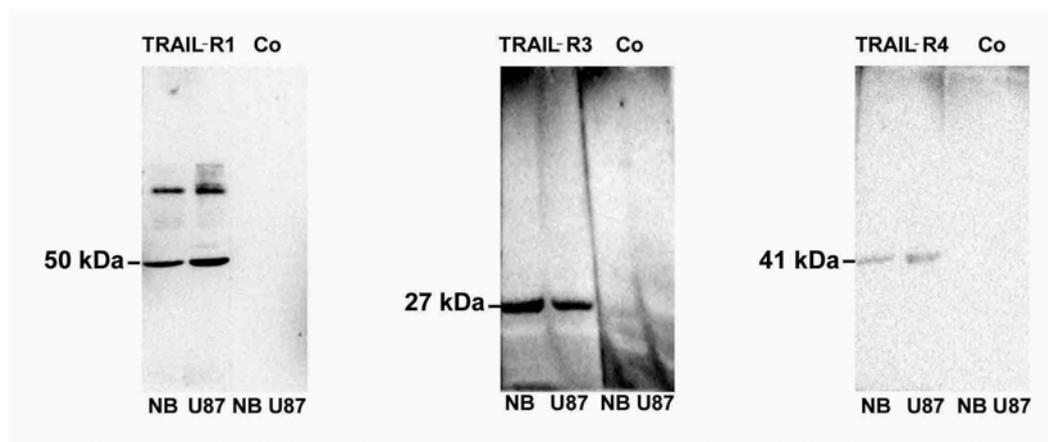


Figure 62. Analyse de l'expression des TRAIL-R par Western-blotting (SDS-PAGE à 12 %).

NB : lysat protéique de cellules neuroblastiques SH-SY5Y, U87 : lysat protéique de cellules de glioblastome humain, Co : contrôle isotypique.

V.2.B - Détection par immunofluorescence indirecte

Les études immunocytochimiques ont été réalisées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs TRAIL-R1, -R2, -R3 et -R4 (Figure 63). Un marquage fluorescent des cellules a été détecté quel que soit le récepteur recherché et quelle que soit la lignée, neuroblastique ou gliale. Le marquage fluorescent du TRAIL-R3 était cependant plus faible au niveau des cellules U-87 MG que celui qui était observé sur les cellules neuroblastiques.

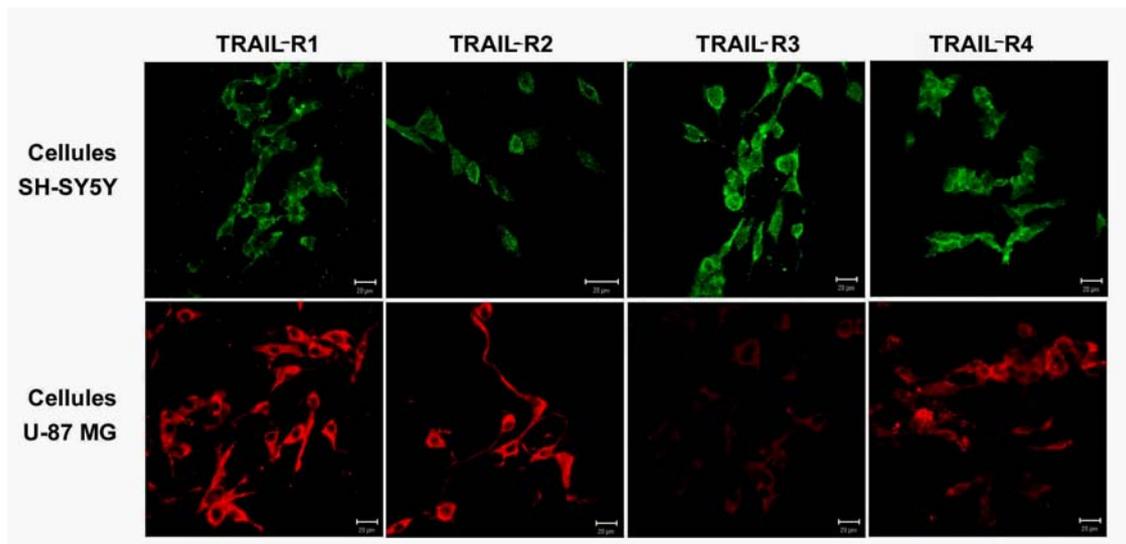


Figure 63. Détection par immunofluorescence des TRAIL-R.

V.2.C - Détection par cytométrie en flux

Une étude de l'expression des récepteurs de TRAIL par cytométrie en flux été réalisée grâce à des anticorps monoclonaux anti-TRAIL-R sur les cellules U-87 MG (Figure 64). Un décalage du pic de fluorescence a été observé avec les anticorps anti-TRAIL-R1 et -R2 alors que les anticorps anti-TRAIL-R3 et -R4 n'ont pas permis de détecter de protéines. Des contrôles isotypiques (en gris) ont systématiquement été réalisés et superposés aux marquages.

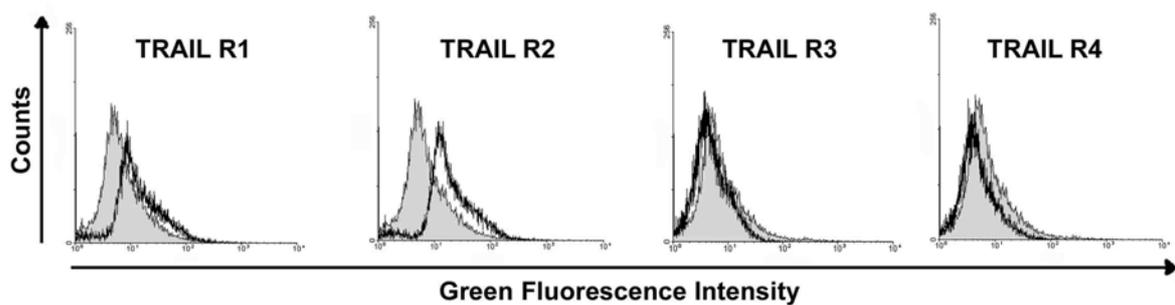


Figure 64. Analyse de l'expression des récepteurs de TRAIL au niveau de cellules U-87 MG par cytométrie en flux

V.3 - Analyse de l'effet apoptotique de TRAIL dans les deux types de lignées cellulaires

Le taux d'apoptose des cellules SH-SY5Y et U-87 MG, après exposition au facteur TRAIL à différentes concentrations, a été déterminé grâce à la technique de détection des nucléosomes solubles ("Cell Death Detection ELISA Plus"). Les index apoptotiques ont été calculés à partir du taux d'apoptose basal, arbitrairement fixé à 1.

Le taux d'apoptose des cellules SH-SY5Y induite par TRAIL (Figure 65) est significativement différent du taux d'apoptose basale, uniquement à la concentration de 80 ng/mL ($p = 0,02$). L'administration concomitante de TRAIL et de l'IC8 diminue l'effet pro-apoptotique induit par TRAIL seul ($p = 0,02$ pour les concentrations de TRAIL à 10, 60 et 80 ng/mL), suggérant que l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules SH-SY5Y emprunte la voie de la caspase-8. Par ailleurs, l'adjonction d'un inhibiteur général des caspases (PAN) diminue encore l'effet pro-apoptotique de TRAIL sur les cellules neuroblastiques par rapport aux cellules traitées avec TRAIL et l'IC8 ($p = 0,04$ pour toutes les concentrations sauf à 5 ng/mL de TRAIL). Ces résultats montrent que la voie des TRAIL-R implique non seulement la caspase-8 mais également d'autres caspases.

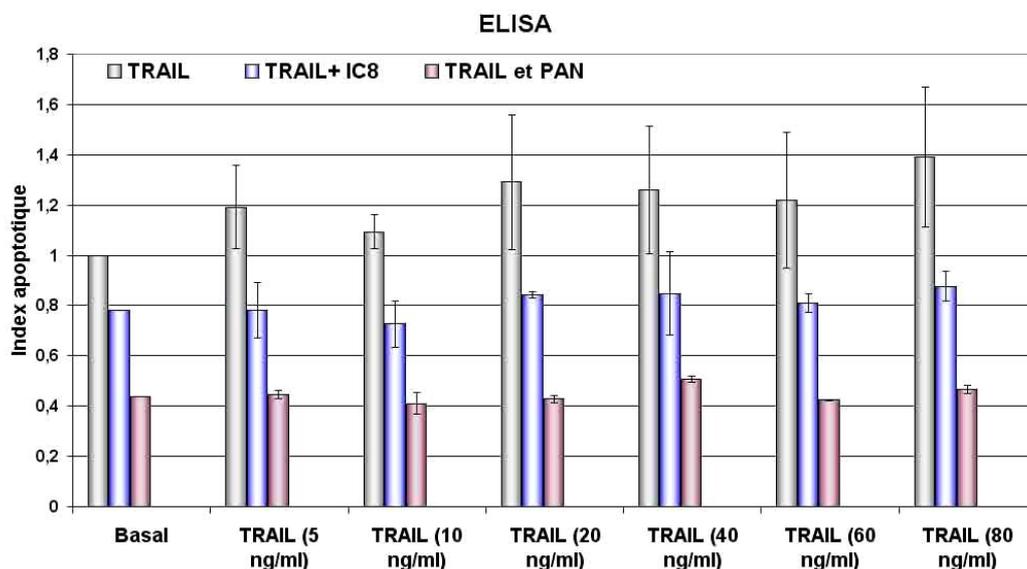


Figure 65. Etude de l'induction d'apoptose des cellules SH-SY5Y par TRAIL seul, ou associé à un inhibiteur de la caspase-8 (IC8) ou à un inhibiteur général des caspases (PAN), par ELISA.

L'effet de TRAIL sur l'apoptose a ensuite été étudié sur les cellules U-87 MG par ELISA (Figure 66). Quelle que soit la concentration testée de TRAIL (5 à 80 ng/mL), l'apoptose des cellules U-87 MG est augmentée ($p < 0,02$ pour toutes les concentrations testées sauf à 5 ng/mL de TRAIL). De plus, il semble que le taux d'apoptose des cellules soit dose-dépendant et augmente avec la concentration de TRAIL.

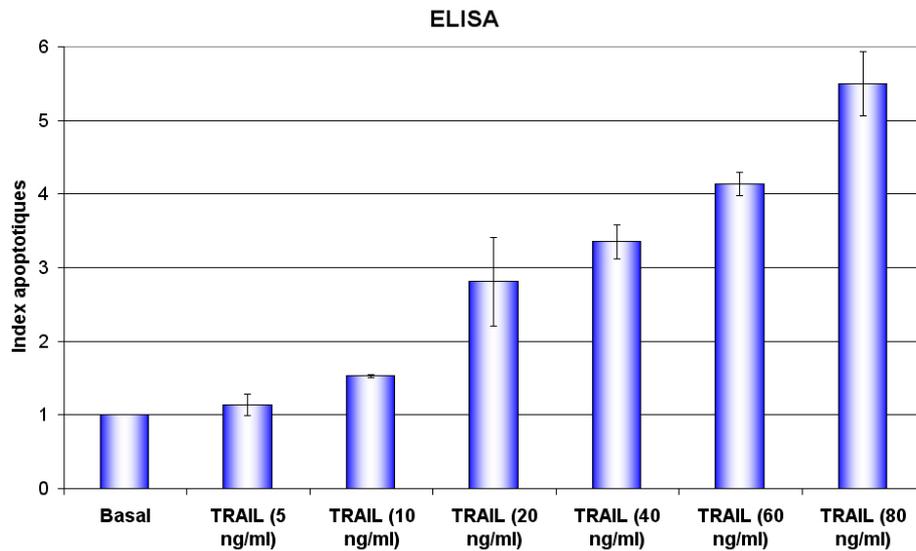


Figure 66. Etude par la méthode ELISA de l'effet de TRAIL sur l'apoptose des cellules U-87 MG.

VI - Le récepteur p75^{NTR} est séquestré dans l'appareil de Golgi des cellules U-87 MG

Dans la majorité des cellules U-87 MG et dans nos conditions de cultures, nous avons mis en évidence que la localisation du récepteur p75^{NTR} était limitée à l'appareil de Golgi.

VI.1 - Expression localisée dans l'appareil de Golgi du récepteur p75^{NTR}

Des doubles marquages en immunocytochimie ont été réalisés avec les cellules U-87 MG grâce à deux anticorps (Figure 67) : un anticorps polyclonal qui reconnaît la mannosidase II, une protéine spécifique de l'appareil de Golgi (Anti-Golgi Ab), et un anticorps monoclonal anti-p75^{NTR} (Anti-p75^{NTR} mAb). Dans les cellules, les protéines sont co-localisées dans le cytoplasme, à proximité du noyau. Ce résultat a abouti à l'hypothèse selon laquelle le récepteur p75^{NTR} serait stocké au niveau de l'appareil de Golgi. Le récepteur p75^{NTR} est également exprimé au niveau de la membrane de quelques cellules U-87 MG.

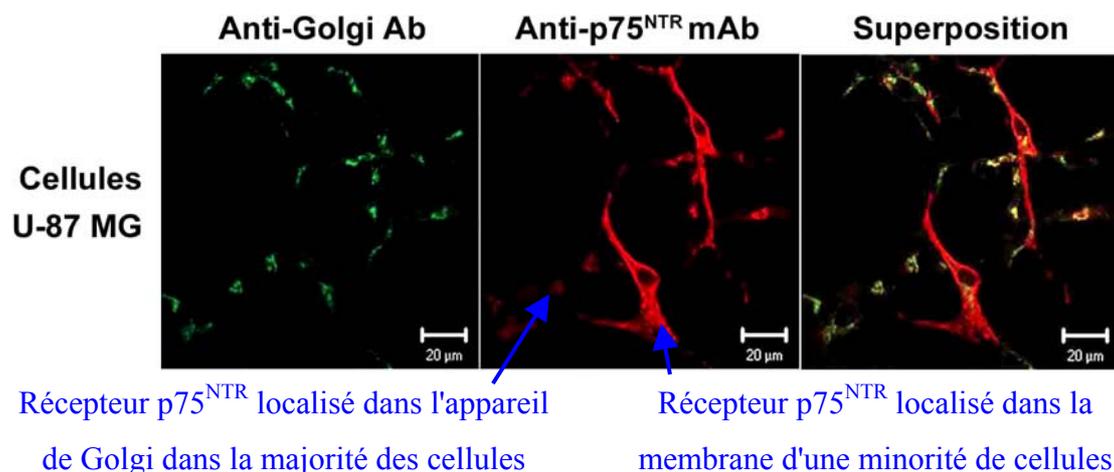


Figure 67. Etude immunocytochimique en double marquage de l'expression du récepteur p75^{NTR} au niveau de l'appareil de Golgi.

Afin de confirmer le résultat précédent, l'étude de l'expression du récepteur par cytométrie en flux a été réalisée grâce à un anticorps monoclonal anti-p75^{NTR} (clone NGFR5) (Figure 68). Deux décalages du pic de fluorescence ont alors été observés en comparaison avec le contrôle isotypique (IMF = 0,160 ± 0,014, en gris), le pic de plus faible intensité (IMF = 0,280 ± 0,095) correspondant au récepteur localisé dans l'appareil de Golgi (il n'est pas présent si les cellules ne sont pas perméabilisées) et le pic de forte intensité (IMF = 41,9 ± 5,8) correspondant au récepteur exprimé à la surface des cellules. Le nombre des cellules exprimant le récepteur p75^{NTR} à leur surface reste cependant assez faible puisqu'il ne représente que 3,03 ± 0,2 % des cellules totales.

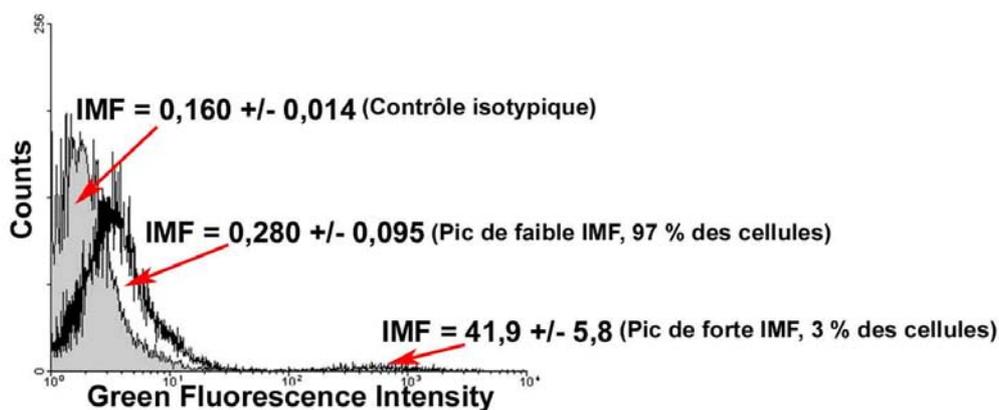


Figure 68. Analyse de l'expression du récepteur p75^{NTR} des cellules U-87 MG par cytométrie en flux.

Deux anticorps polyclonaux reconnaissant spécifiquement les parties N-terminale (Anti-p75^{NTR} ntAb) et C-terminale (Anti-p75^{NTR} ctAb) du récepteur p75^{NTR} ont ensuite été testés (Figure 69). Les marquages observés sur les cellules U-87 MG sont également localisés dans le cytoplasme à proximité du noyau, confirmant la présence du récepteur p75^{NTR} dans l'appareil de Golgi.

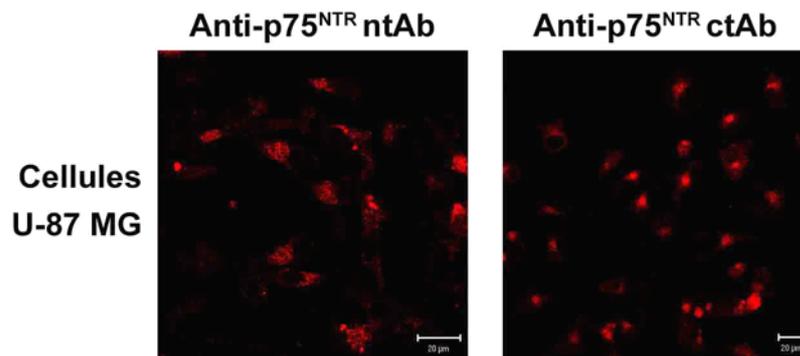


Figure 69. Etude de la localisation du récepteur p75^{NTR} grâce à deux anticorps polyclonaux.

La spécificité golgienne de l'anticorps anti-mannosidase II a été contrôlée morphologiquement avec des fibroblastes humains (Figure 70), ces cellules étant suffisamment grosses pour permettre de visualiser l'appareil de Golgi par microscopie confocale.

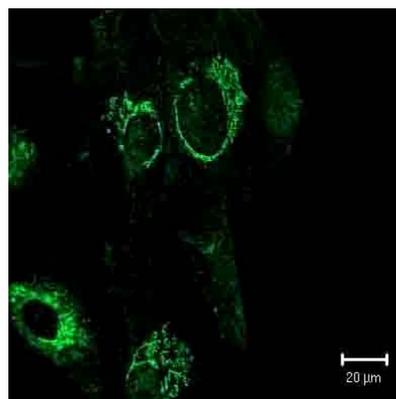


Figure 70. Immunomarquages de fibroblastes grâce à un anticorps spécifique de l'appareil de Golgi, un anticorps anti-mannosidase II.

Afin de vérifier l'absence de séquence commune au récepteur p75^{NTR} et à des constituants de l'appareil de Golgi, des analyses de séquences *in silico* ont également été réalisées. La séquence protéique du récepteur p75^{NTR} a été analysée grâce au logiciel Blast mais aucune séquence protéique connue comme étant exprimée dans l'appareil de Golgi n'a pu être alignée avec la séquence du récepteur p75^{NTR}.

Deux toxines connues pour dégrader l'appareil de Golgi, la BFA et le NDGA, ont ensuite été mises en contact avec les cellules (Figure 71). Ainsi, quelles que soit la toxine, le marquage observé avec l'anticorps anti-mannosidase II mais également avec l'anticorps monoclonal anti-p75^{NTR} apparaît diffus dans le cytoplasme des cellules. La dégradation de l'appareil de Golgi est donc associée à la diffusion du marquage du récepteur p75^{NTR}, confirmant que celui-ci est bien présent dans l'appareil de Golgi.

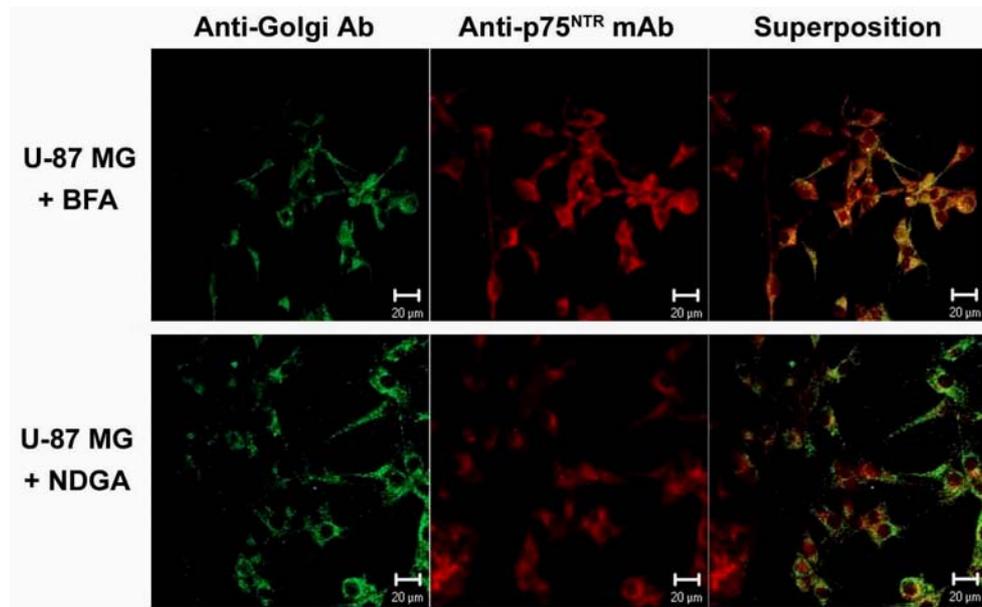


Figure 71. Etude de l'effet des toxines golgiennes, BFA et NDGA, sur la localisation du récepteur p75^{NTR} (Anti-p75^{NTR} mAb) et de l'anticorps anti-mannosidase II (Anti-Golgi Ab) par immunofluorescence sur les cellules U-87 MG.

Pour chaque immunomarquage, des contrôles isotypiques ont été réalisés.

VI.2 - Etude de la protéine p75^{NTR} par Western-blotting

Des études par Western-blotting ont ensuite été réalisées afin de déterminer la taille des protéines reconnues par les différents anticorps utilisés en immunocytochimie (Figure 72). Des lysats de protéines totales ont été séparés par SDS-PAGE et étudiés avec 3 anticorps différents reconnaissant le récepteur p75^{NTR}. Il s'agit de l'anticorps monoclonal anti-p75^{NTR}

(clone NGFR5, Anti-p75^{NTR} mAb) qui reconnaît la partie N-terminale de la protéine et de deux anticorps polyclonaux reconnaissant spécifiquement les parties N-terminale (Anti-p75^{NTR} ntAb) et C-terminale (Anti-p75^{NTR} ctAb) du récepteur. Plusieurs protéines de tailles différentes ont été détectées. Quel que soit l'anticorps utilisé, une protéine de 53,4 kDa a été détectée dans les lysats des cellules U-87 MG. L'anticorps monoclonal (Anti-p75^{NTR} mAb) a de plus détecté deux protéines de 56,6 kDa et 75 kDa.

Des contrôles isotypiques (Co) ont à nouveau été réalisés.

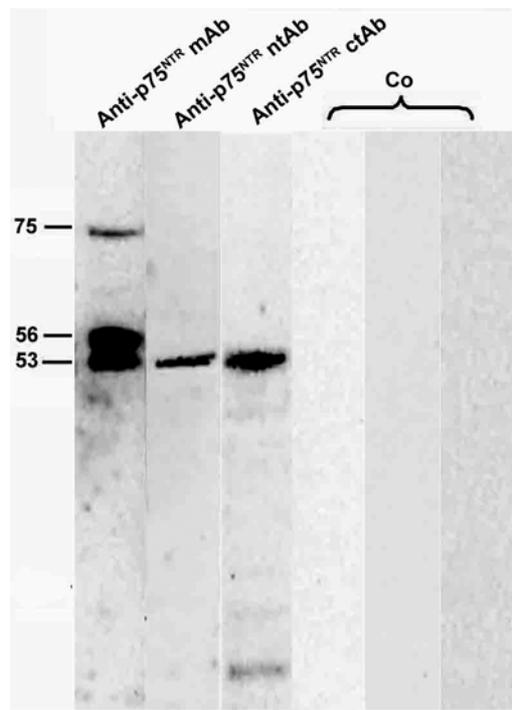


Figure 72. Détection de la protéine p75^{NTR} dans des lysats de cellules U-87 MG par Western-blotting avec 3 anticorps anti-p75^{NTR} :

un anticorps monoclonal dirigé contre la région N-terminale du récepteur (Anti-p75^{NTR} mAb), un anticorps polyclonal spécifique de la région N-terminale (Anti-p75^{NTR} ntAb) et un anticorps polyclonal spécifique de la C-terminale (Anti-p75^{NTR} ctAb) du récepteur.

VI.3 - Effet des ligands du récepteur p75^{NTR} sur son expression à la surface des cellules

Afin de déterminer un éventuel effet des ligands du récepteur p75^{NTR} sur la localisation de ce récepteur, les cellules ont été stimulées pendant 24 heures avec du NGF et du BDNF. Alors que le NGF n'a aucun effet sur l'expression du récepteur p75^{NTR}, le BDNF modifie l'expression du récepteur p75^{NTR} à la membrane plasmique des cellules U-87 MG (Figure 73).

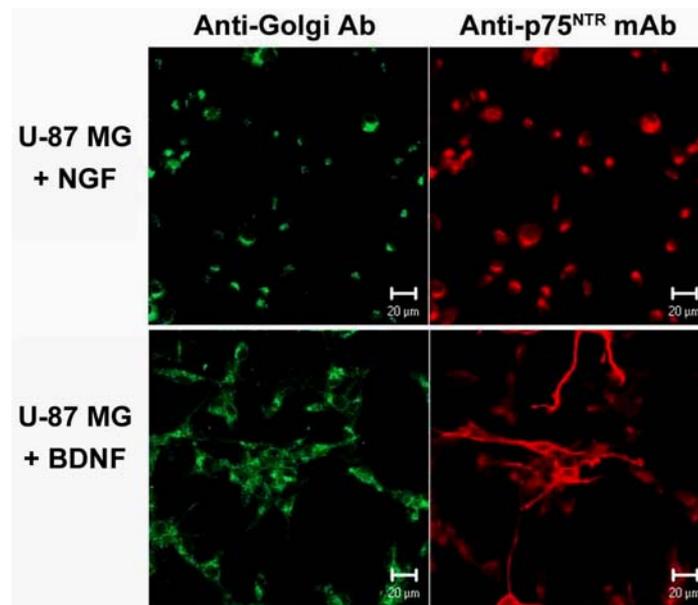


Figure 73. Immunomarquages du récepteur p75^{NTR} et de l'appareil de Golgi après stimulation des cellules par du NGF et du BDNF.

Des études immunocytochimiques ont alors été réalisées (Figure 74). Par immunocytofluorescence, il était possible d'observer une légère augmentation de l'expression du récepteur p75^{NTR} à la surface des cellules.

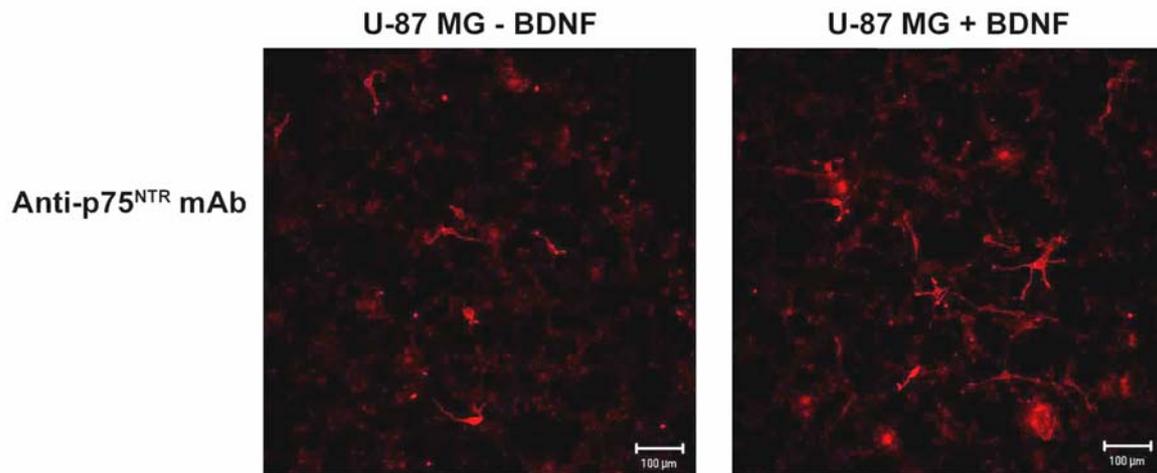


Figure 74. Immunomarquage du récepteur p75^{NTR} au niveau des cellules U-87 MG traitées ou non avec du BDNF.

Une première analyse par cytométrie en flux des cellules mises en présence de BDNF a cependant montré que la quantité de cellules exprimant le récepteur p75^{NTR} à leur surface ne variait pas.

Afin de déterminer si l'expression du récepteur p75^{NTR} à la surface des cellules était localisée au niveau des radeaux lipidiques (Figure 75), des doubles marquages avec un anticorps monoclonal anti-75^{NTR} mAb et avec la sous-unité B de la toxine cholérique couplée au FITC ont alors été effectués. L'absence de superposition des marquages obtenus suggère que la localisation du récepteur p75^{NTR} à la membrane ne se situe pas dans les radeaux lipidiques.

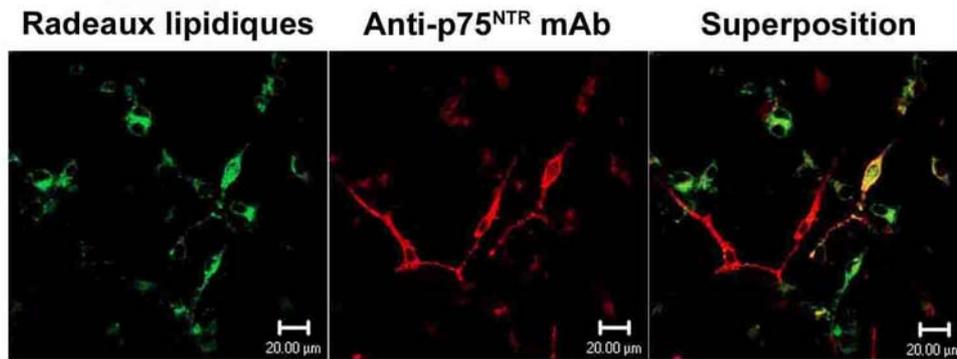


Figure 75. Recherche de l'expression du récepteur p75^{NTR} dans les radeaux lipidiques par immunofluorescence.

VI.4 - L'activation du récepteur p75^{NTR} ne modifie pas le taux d'apoptose des cellules

Afin de déterminer l'effet de l'activation du récepteur p75^{NTR} sur l'apoptose des cellules, un anticorps monoclonal agoniste du récepteur p75^{NTR} a été déposé sur les cellules pendant 48 heures et le taux d'apoptose déterminé par deux méthodes ("Cell Death Detection ELISA Plus" et TUNEL) (Figure 76). Ainsi, quelle que soit la méthode utilisée, le taux d'apoptose des cellules n'a pas été modifié par l'anticorps ($p > 0,3$, *quelles que soient les valeurs comparées*).

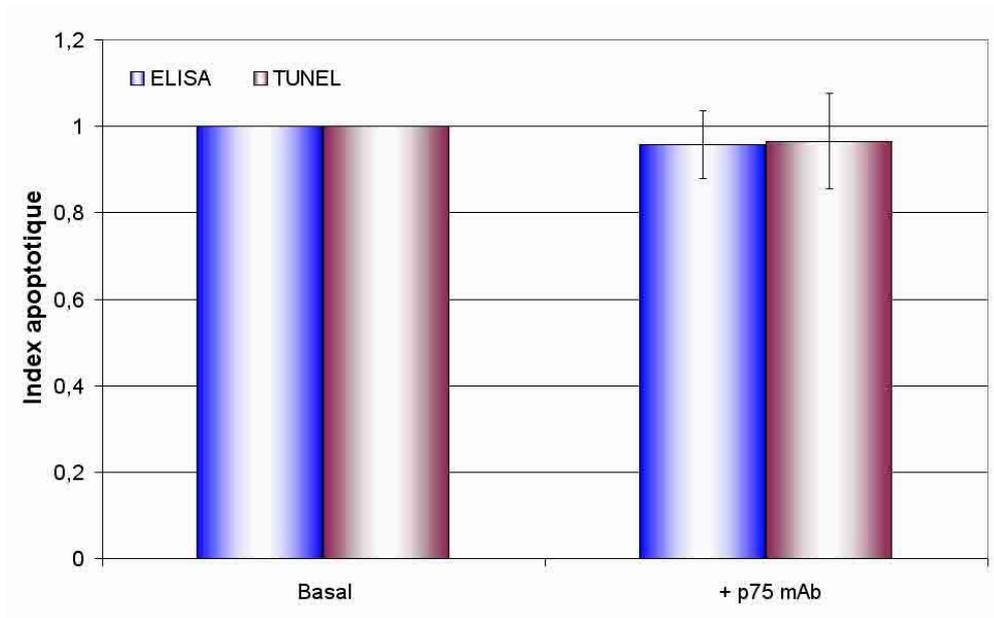


Figure 76. Etude du taux d'apoptose des cellules après exposition à un anticorps monoclonal anti-p75^{NTR} par les techniques ELISA apoptose et TUNEL.

Discussion

I - Le récepteur p75^{NTR} module l'apoptose induite par le récepteur Fas dans la lignée neuroblastique SH-SY5Y

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication acceptée dans la revue Apoptosis (Voir en Annexe la publication n° 2).

Cette première étude a montré que l'apoptose des cellules neuroblastiques humaines SH-SY5Y peut être induite soit par l'activation du récepteur Fas par FasL, soit grâce à l'induction des voies de signalisation du récepteur de faible affinité pour les neurotrophines, p75^{NTR}, par le BDNF. Ces résultats, obtenus par les méthodes DAPI et TUNEL, ont confirmé des études précédemment réalisées (Bamji et al., 1998 ; Yi et al., 2000). Au contraire, l'activation simultanée de ces deux récepteurs aboutit à l'inhibition du phénomène d'apoptose détectée lorsque les récepteurs Fas et p75^{NTR} sont activés indépendamment.

Les transcrits et les protéines des récepteurs Fas et p75^{NTR} ont tout d'abord été recherchés. Le récepteur Fas a ainsi été mis en évidence au niveau ribonucléique mais également au niveau protéique, confirmant d'autres études (Yi et al., 2000 ; Lopez et Ferrer, 2000). De même, le récepteur p75^{NTR} a été détecté au niveau de cellules à l'état basal ou après activation par FasL, prouvant que l'activation des voies de signalisation du récepteur Fas n'empêche pas l'expression du récepteur p75^{NTR}. L'expression des récepteurs TrkA et TrkB, les récepteurs à activité tyrosine kinase de forte affinité pour le NGF et le BDNF, respectivement, a ensuite été analysée par cytométrie en flux et Western-blotting. La technique de cytométrie en flux a confirmé l'expression du récepteur TrkA par les cellules neuroblastiques alors que le récepteur TrkB n'a jamais été détecté dans la lignée SH-SY5Y (Nakagawara et al., 1994 ; Hoehner et al., 1995 ; Edsjo et al., 2003). En effet, lors de travaux précédents, le récepteur TrkB n'a pu être détecté dans la lignée SH-SY5Y que dans des

conditions conduisant à la différenciation des cellules, c'est-à-dire en présence d'acide trans-rétinoïque (Kaplan et al., 1993 ; Matsumoto et al., 1995 ; Edsjo et al., 2003). Les analyses par Western-blotting ont confirmé l'absence d'expression du récepteur TrkB dans les cellules, même après activation des voies de signalisation des récepteurs Fas et p75^{NTR} par FasL et BDNF respectivement. Ainsi, dans la lignée cellulaire SH-SY5Y, l'effet du BDNF est uniquement dû à sa fixation sur le récepteur p75^{NTR}, le récepteur de haute affinité TrkB n'étant pas exprimé. L'apoptose induite par l'interaction du BDNF et du récepteur p75^{NTR} a alors été déterminée, mettant en évidence l'effet pro-apoptotique de l'activation du récepteur p75^{NTR} sur les cellules neuroblastiques. Ce phénomène avait déjà été démontré au niveau de neurones sympathiques (Bamji et al., 1998). L'inhibition de l'apoptose induite par FasL, par le BDNF, a ensuite été démontrée au niveau de la lignée neuroblastique. L'effet répresseur des facteurs de croissance sur l'apoptose médiée par le récepteur Fas avait déjà été prouvé dans différents types cellulaires et particulièrement au niveau lymphocytaire (Galvan et al., 2003 ; Lanvin et al., 2003 ; Lee et al., 2003 ; Jung et al., 2004). Cependant, la relation entre les neurotrophines et les voies de signalisation du récepteur Fas reste très peu documentée et nous avons donc recherché les interactions fonctionnelles entre les récepteurs Fas et p75^{NTR} dans la lignée cellulaire SH-SY5Y.

Le niveau d'expression du récepteur p75^{NTR} dans les cellules à l'état basal a tout d'abord été comparé avec celui obtenu après exposition des cellules à FasL ou au BDNF, par Northern-blotting ou par cytométrie en flux. Aucune variation de la quantité des transcrits n'a pu être détectée quelle que soit la voie de signalisation activée. De même, les études par cytométrie en flux n'ont pas mis en évidence de décalage du pic de fluorescence après exposition à FasL ou BDNF. Ces résultats suggèrent donc que les relations potentielles existant entre les récepteurs Fas et p75^{NTR} ne dépendent pas des variations de la quantité des transcrits ou des protéines p75^{NTR} à la suite de l'activation des différentes voies de signalisation.

Cependant, les analyses en microscopie confocale de double-marquages réalisés avec des anticorps anti-Fas et anti-p75^{NTR} ont montré que l'activation de ces deux récepteurs conduit à leur polarisation dans la même zone de la membrane cellulaire. Des études de co-polarisation et d'immuno-affinité ont alors été réalisées, démontrant la co-polarisation et l'interaction des récepteurs Fas et p75^{NTR}. Ce phénomène de co-polarisation des deux

récepteurs pourrait mettre en jeu la voie des céramides mais pourrait également impliquer la voie de la caspase-8. En effet, la polarisation du récepteur Fas a déjà été observée dans les cellules Jurkat (Cremesti et al., 2001) ou au niveau de motoneurones humains (Lautrette et al., 2003). Elle dépend du relargage des céramides (Cremesti et al., 2001), suggérant qu'ils sont des intermédiaires d'une des voies de signalisation du récepteur Fas. Ils peuvent réguler l'apoptose et la survie, contrôler le cycle cellulaire et la différenciation (Ruvolo, 2001) et surtout augmenter la fluidité membranaire (Venkataraman et Futerman, 2000). Les céramides endogènes sont générés par hydrolyse de la sphingomyéline par des sphingomyélinases neutres (N-SMAse) ou des sphingomyélinases acides (A-SMAse; Hannun et Luberto, 2000). Les A-SMAse induisent le relargage des céramides lors des stades précoces suivant l'activation du récepteur Fas et la relation entre les A-SMAse et l'activation de la caspase-8 semble être cruciale dans la cascade d'évènements intervenant lors des voies de signalisation du récepteur Fas (Grassme et al., 2003). Les N-SMAse sont, quant à elles, plus fréquemment activées lors de la liaison des neurotrophines sur leur récepteur de faible affinité (Dobrowsky et al., 1994 ; Dobrowsky et Carter, 1998 ; Brann et al., 1999). Enfin, les voies de signalisation de la caspase-8 et des céramides peuvent agir selon deux voies de signalisation indépendantes ou de façon synergique après leur activation par différents récepteurs (Movsesyan et al., 2002). Afin d'étudier l'implication de ces deux voies de signalisation sur l'interaction des récepteurs Fas et p75^{NTR} dans les neuroblastomes, un inhibiteur de la caspase-8 (IC8) et un inhibiteur des N-SMAse, la MA, qui bloque l'hydrolyse des sphingomyélines en céramides et qui est impliqué dans les voies de signalisation des récepteurs p75^{NTR} (Brann et al., 1999) et Fas (Tepper et al., 2001), ont été testés. Ainsi, l'adjonction de l'IC8 diminue, comme prévu, le taux d'apoptose induit par FasL mais abaisse également l'apoptose déclenchée en présence de BDNF. De plus, dans les mêmes conditions, la MA inhibe l'effet pro-apoptotique de FasL et du BDNF. La caspase-8 et les N-SMAse sont donc bien impliquées dans les voies de signalisation pro-apoptotiques induites par l'activation des récepteurs Fas et p75^{NTR} dans la lignée neuroblastique SH-SY5Y. Cependant, même s'il est clair que l'induction de la voie des céramides est en relation avec l'activation du récepteur Fas, l'enzyme à l'origine de l'hydrolyse des sphingomyélinases en céramides, A-SMAse (Cremesti et al., 2001) ou N-SMAse (Tepper et al., 2001 ; Cock et al., 1998), reste encore un point de discussion. De toutes façons, seul l'IC8 abolit l'effet anti-apoptotique de l'activation concomitante de Fas et p75^{NTR}, suggérant que ce phénomène de survie est médié par l'activation de la caspase-8. Tous ces résultats permettent de supposer que la polarisation des récepteurs Fas et p75^{NTR} serait due à

l'augmentation de la fluidité membranaire suite au relargage des céramides et que la caspase-8 jouerait un rôle crucial sur l'effet de survie médié par l'activation concomitante des deux récepteurs.

L'activation de la caspase-8 suite à l'induction des voies de signalisation des deux récepteurs aurait donc, dans ce cas, un effet anti-apoptotique plutôt que pro-apoptotique. Ce phénomène de survie cellulaire associé à l'activation de la caspase-8 a déjà été décrit au niveau de lymphocytes T (Salmena et al., 2003 ; Newton et Strasser, 2003 ; O'Reilly et al., 2004) et est directement lié à la capacité d'association de la caspase-8 avec FADD. En effet, la mutation de FADD n'inhibe que les voies de prolifération des cellules et pas l'apoptose (Orlinick et al., 1999). Cette association de la caspase-8 avec FADD permet la formation de plateformes dans la membrane plasmique qui sont indépendantes des radeaux lipidiques (O'Reilly et al., 2004).

Le mécanisme associé à l'effet protecteur de l'apoptose par FasL et BDNF n'a pas été déterminé mais il pourrait être dû à la formation de complexes de macromolécules dans la membrane cellulaire composés entre autres de molécules adaptatrices. En effet, le récepteur Fas interagit avec la molécule adaptatrice FADD (Orlinick et al., 1999) et des études récentes ont montré que le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ peut s'associer avec TRADD ("TNF receptor-associated death domain", El Yazidi-Belkoura et al., 2003). Alors que la fonction de TRADD dans la signalisation de l'apoptose médiée par TNF-R 1 est encore discutée, il est clair que cette molécule adaptatrice peut interagir avec FADD et la pro-caspase-8. Elle agit donc comme un point clé de régulation dans le choix entre la survie ou l'apoptose des cellules (Micheau et Tschopp, 2003). Ainsi, l'interaction du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ et de la molécule TRADD, à la suite de la fixation du NGF sur ce récepteur, aboutit à la survie plutôt qu'à la mort cellulaire (El Yazidi-Belkoura et al., 2003). Dans les conditions d'activation du récepteur Fas, l'effet anti-apoptotique de l'activation du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ par la fixation du BDNF pourrait donc être la conséquence de l'interaction de TRADD et FADD avec la caspase-8 (Figure 77). L'interaction du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ avec TRADD reste cependant controversée et dépend du type cellulaire et des conditions expérimentales (Nichols et al., 1998).

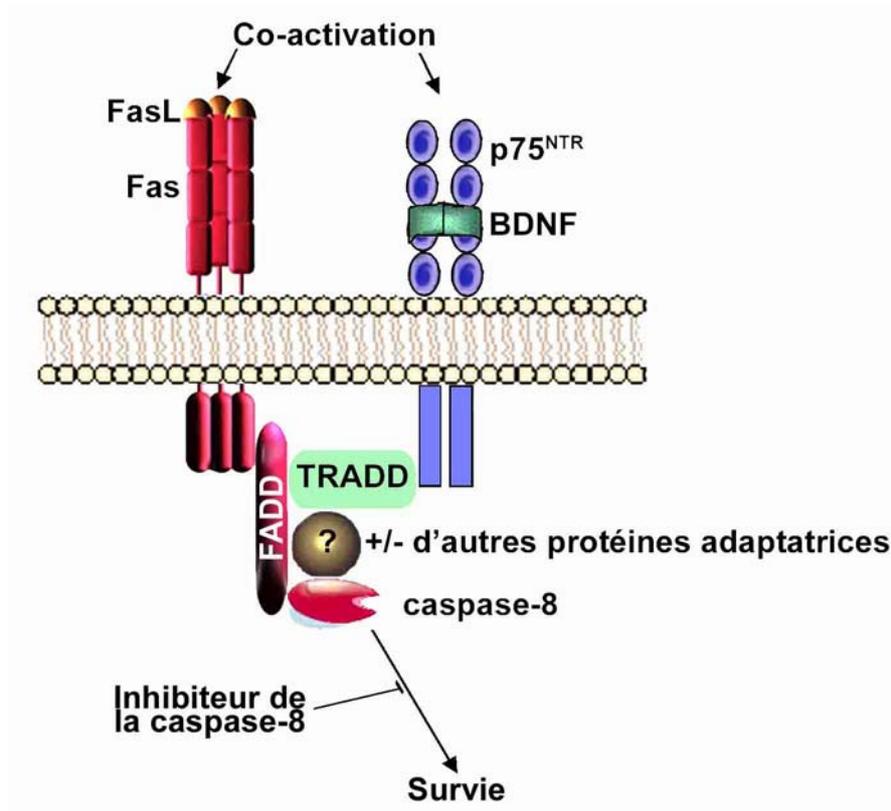


Figure 77 : Schéma représentatif de la voie de signalisation activée par la co-stimulation des récepteurs Fas et p75^{NTR} dans les cellules SH-SY5Y.

En conclusion, dans la lignée neuroblastique SH-SY5Y, lignée qui n'exprime pas le récepteur TrkB, les deux récepteurs contenant des domaines de mort, p75^{NTR} et Fas, sont co-localisés au niveau de la membrane cellulaire. Leur activation indépendante, par leur ligand respectif, BDNF ou FasL, déclenche des cascades de signalisations faisant intervenir la caspase-8 et les céramides et aboutit à l'apoptose des cellules. Au contraire, leur activation simultanée empêche cette apoptose. Cet effet protecteur de l'apoptose est bloqué par un inhibiteur de la caspase-8, suggérant que la caspase-8 joue un rôle dans la survie des cellules neuroblastiques plutôt que dans leur mort. Les molécules intervenant lors de leur interaction pourraient impliquer des protéines adaptatrices qu'il faudra identifier. La connaissance du fonctionnement de ces mécanismes pourrait permettre de comprendre le phénomène de résistance des cellules tumorales à l'apoptose induite par Fas, impliquant une relation possible avec l'expression et l'activation du récepteur p75^{NTR}. Ainsi, la co-expression de ces deux récepteurs pourrait être prise en considération et recherchée dans les tumeurs qui montrent un

haut degré de résistance aux agents de chimiothérapie qui activent des voies de signalisation du récepteur Fas.

II - L'effet pro-apoptotique de FasL est inhibé par le NGF dans les cellules SH-SY5Y et U-87 MG

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'administration concomitante du BDNF et de FasL étant intéressants pour la compréhension de la résistance des tumeurs à l'apoptose, l'effet du NGF sur l'apoptose des cellules de la lignée SH-SY5Y a ensuite été étudié. De même, l'analyse de l'apoptose des cellules U-87 MG en présence de NGF a également été réalisée.

L'expression du récepteur TrkA, récepteur de forte affinité pour le NGF, a tout d'abord été recherchée par immunofluorescence et cytométrie en flux. Quel que soit le type cellulaire, l'expression du récepteur TrkA a été détectée, confirmant des études précédentes (Hoehner et al., 1995, Singer et al., 1999) et montrant que l'effet du NGF est médié par les récepteurs TrkA.

L'analyse de l'effet du NGF sur l'apoptose des cellules neuroblastiques a alors été réalisée. Le NGF seul ou associé à FasL diminue l'apoptose des cellules SH-SY5Y. Ainsi, comme le BDNF, il aurait un effet protecteur de l'apoptose induite par FasL. Alors que la survie des cellules neuroblastiques en présence de NGF a déjà été montrée au niveau des cellules de neuroblastome LAN5 (Lachyankar et al., 2003), l'effet protecteur du NGF sur l'apoptose des cellules SH-SY5Y induite par FasL n'avait jamais été observé.

Le rôle de la caspase-8 et de la voie des céramides sur l'effet protecteur du NGF a ensuite été étudié. Ainsi, alors que la caspase-8 n'intervient pas dans la voie de signalisation de la survie induite par le NGF, la MA inhibe totalement la survie cellulaire due à l'action du NGF seul. Ainsi, comme pour le BDNF, la voie des céramides intervient lors de l'activation des récepteurs induite par la fixation du NGF. Ces résultats montrent que l'effet protecteur du NGF seul, indépendamment de toute activation apoptotique, passe par la voie des céramides. Ce phénomène est probablement dû à l'association des récepteurs TrkA et p75^{NTR}. En effet, seul le récepteur p75^{NTR} a été montré comme étant capable d'activer la voie des céramides. Cependant, ces résultats ne sont pas en accord avec une étude précédente montrant que l'activation des récepteurs TrkA et p75^{NTR} par le NGF induit la voie de PI3-K/PKC et inhibe

la voie des céramides (Plo et al., 2004) alors que le récepteur p75^{NTR} seul, sans expression des TrkA, en présence de NGF, active la voie des céramides.

La voie de signalisation faisant intervenir les SMases, au contraire, ne semble pas impliquée dans l'effet protecteur du NGF sur l'apoptose induite par FasL. D'autres voies de signalisation, probablement induites par l'interaction du récepteur TrkA avec son ligand, pourraient néanmoins intervenir lors de l'inhibition de l'apoptose induite par le récepteur Fas. Ainsi, la voie des ERK semble être un bon intermédiaire pour expliquer l'effet protecteur du NGF sur l'apoptose médiée par Fas. En effet, la voie des ERK est impliquée dans la croissance neuritique induite par le récepteur Fas (Desbarats et al., 2003). De même, la régénération de neurones sensitifs peut être induite par l'activation des récepteurs Trk déclenchant la voie des ERK (Pang et al., 1995). Par conséquent, les voies de signalisation des récepteurs Fas et Trk pourraient converger par la voie des ERK, expliquant ainsi l'effet protecteur du NGF sur l'apoptose induite par l'activation du récepteur Fas.

L'apoptose des cellules U-87 MG a également été étudiée afin de comparer les résultats obtenus lors de l'analyse des deux types cellulaires (U-87 MG *vs* SH-SY5Y). Dans ce cas, comme attendu, l'activation du récepteur Fas augmente l'apoptose des cellules U-87 MG. Cependant, seule la voie de la caspase-8 est mise en jeu lors de l'activation du récepteur Fas. En effet, la MA n'a aucun effet sur le niveau d'apoptose des cellules indiquant que la voie des céramides n'est pas mise en cause lors de ce processus. Ce résultat diffère de celui obtenu pour les cellules neuroblastiques qui mettent en jeu à la fois la voie de la caspase-8 ainsi que la voie des céramides.

Lorsqu'il est déposé sur les cellules U-87 MG, le NGF diminue légèrement l'apoptose des cellules. De plus, l'effet de survie du NGF est augmenté lorsque la voie des céramides est bloquée.

Enfin, l'effet protecteur du NGF sur l'apoptose induite par Fas a encore une fois été démontré. Comme pour le NGF seul, il fait intervenir la voie des céramides. Il semble donc que, dans les cellules U-87 MG, seule la voie des céramides intervienne lors de la

transduction du signal induit par l'association de FasL et du NGF et régule la survie ou la mort des cellules.

Le NGF diminue donc l'apoptose induite par l'activation du récepteur Fas dans les deux lignées cellulaires, neuroblastique et gliale. Il existe probablement un équilibre entre l'effet pro-apoptotique dû à l'activation du récepteur Fas et la survie médiée par la présence du NGF. Cependant, les voies de signalisation qui régulent cet équilibre n'ont pas été clairement définies. En effet, même si la voie des céramides semble intervenir, d'autres voies de signalisation sont vraisemblablement mises en jeu et diffèrent probablement d'un type cellulaire à un autre.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus sur les deux types cellulaires à la suite de l'activation des récepteurs $p75^{\text{NTR}}$ et TrkA par les neurotrophines confirme certaines hypothèses déjà émises concernant le fonctionnement des récepteurs aux neurotrophines. En effet, les voies de signalisation activées varient en fonction des neurotrophines présentes, de l'expression des récepteurs de forte et faible affinité pour ces neurotrophines et du type cellulaire. De ce fait, les mécanismes de signalisation cellulaire ne semblent pas extrapolables d'un type cellulaire à l'autre. L'ensemble des résultats donne un aperçu de la complexité des dispositifs de signalisation cellulaire et nous conforte dans l'idée qu'il est nécessaire d'étudier l'effet d'un ensemble de ligands et non d'une molécule isolée.

III - La combinaison de FasL, étoposide et dexaméthasone empêche le développement de tumeurs gliales *in vivo*

L'ensemble de ces résultats a été soumis à publication dans la revue *Clinical Cancer Research* (Voir en Annexe la publication n° 3).

Les gliomes malins humains sont particulièrement résistants à des nombreux stimuli pro-apoptotiques comme la radiothérapie et les molécules cytotoxiques utilisées en chimiothérapie. Dans cette étude, effectuée chez le rat, nous avons démontré que FasL et étoposide ont une forte activité anti-tumorale au niveau des cellules U-87 MG, en particulier lorsqu'ils sont associés à un agent anti-inflammatoire stéroïdien comme la dexaméthasone. De plus, ces deux molécules diminuent l'expansion tumorale, réduisant ainsi les désordres neurologiques, et améliorent les conditions de survie des rats à 1 mois.

Les cellules U-87 MG ont tout d'abord été analysées avec différents marqueurs de type cellulaire. Cette lignée de glioblastome humain exprime, comme attendu, la GFAP, le marqueur des astrocytes (Ito et al., 1989) mais également, et de façon plus surprenante, CD68, un marqueur des cellules microgliales. L'expression de ce marqueur a cependant déjà été détectée au niveau de 6 lignées de cellules astrocytaires en culture. CD68 est clairement présent au niveau d'astrocytes néoplasiques alors que son expression est absente dans des astrocytes normaux (Leenstra et al., 1995). Toutefois, le récepteur CD68 ne sera pas considéré comme un marqueur suffisant de la lignée gliale U-87 MG greffée. C'est l'expression du marqueur HLA, marqueur spécifique des cellules humaines, qui a permis de prouver que les tumeurs obtenues après xéno greffe sont bien la conséquence de la prolifération des cellules U-87 MG et non de la multiplication de cellules cérébrales des rats.

Ces cellules gliales exprimant le récepteur Fas, quelles que soient les conditions de culture ainsi que dans les tumeurs développées après greffe de cellules U-87 MG, l'implication potentielle de FasL dans une stratégie anti-tumorale a donc été étudiée. Les effets de FasL (Frankel et al., 2002 ; Robe et al., 2005) et de l'étoposide (Lavicka et al., 2001) ayant été déterminés de façon distincte dans les glioblastomes, nous avons testé *in vitro*

l'action anti-proliférative et pro-apoptotique de la combinaison de ces deux molécules. Ainsi, il est apparu que FasL seul n'avait pas d'effet pro-apoptotique significatif et augmentait même légèrement la viabilité des cellules, comme cela avait également été préalablement constaté par Shinohara et collaborateurs (2000). A l'inverse, l'association de FasL et de l'étoposide avait un effet anti-prolifératif et induisait un effet pro-apoptotique de FasL de façon synergique et de manière dose-dépendante. Ainsi, au vu des résultats obtenus *in vitro*, il semblait intéressant de tester l'effet anti-tumoral de l'association de ces deux molécules sur des tumeurs gliales obtenues après xéno greffe des cellules U-87 MG dans des cerveaux de rats athymiques.

Les cellules U-87 MG ont alors été greffées dans des cerveaux de rats immunodéprimés, et ont permis d'obtenir rapidement un modèle tumoral reproduisant celui décrit par Ozawa et collaborateurs (2002). Lors de cette étude, les rats xéno greffés mais non traités ont développé les symptômes associés à la présence d'une compression intracrânienne (perte de l'équilibre, épistaxis, parésie) et leur décès est survenu avant le 30^{ème} jour suivant la greffe des cellules. De plus, une perte de poids ou une diminution de la croissance des rats a pu être observée pour tous les rats non traités durant les quinze derniers jours de l'expérience.

Dans ce modèle, l'association de FasL et de l'étoposide a été administrée au moyen d'un dispositif implantable qui assure une libération continue et prolongée des molécules dans les cerveaux des rats (FasL à 0,47 ng/h et étoposide à 75 ng/h). Cette administration directe au contact des cellules tumorales permettait ainsi d'éviter les problèmes de mauvaise diffusion des molécules, inhérents à la barrière hémato-encéphalique et à l'accessibilité intra-tumorale. Ainsi, l'apparition de symptômes cliniques (déficit neurologique, perte de poids) a été retardée chez les rats dont le traitement a été délivré convenablement. Ceci a été corrélé à une diminution significative du développement tumoral par rapport aux rats greffés mais non traités. Cependant, l'examen macroscopique des cerveaux a montré la présence d'œdème péri-tumoral qui pouvait être la conséquence du développement tumoral (Bruehlmeier et al., 2003) mais aussi des injections de FasL. En effet, il a déjà été montré que l'activation du récepteur Fas pouvait avoir un effet pro-inflammatoire au niveau des glioblastomes (Choi et al., 2001 ; Choi et al., 2003).

La survenue d'un œdème cérébral chez des malades atteints de glioblastomes est constante (Bruehlmeier et al., 2003) et nécessite l'administration de traitements anti-

œdémateux. La dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, est couramment associée aux chimiothérapies afin d'empêcher la réponse inflammatoire et l'apparition d'un œdème due à la présence de la tumeur. Son action serait liée à la diminution de la perméabilité des capillaires néoformés et/ou à une augmentation de l'élimination de l'eau extra-cellulaire (Sinha et al., 2004). En raison de la réaction œdémateuse observée dans notre étude lors de la combinaison FasL/étoposide, nous avons associé la dexaméthasone (Hatam et al., 1982). Après 15 jours, aucun des 5 rats traités avec cette triple association, n'a présenté de symptômes ou de déficits neurologiques, démontrant l'efficacité du traitement et l'absence d'effets adverses. Une perte de poids des animaux (- 7,6 % de leur poids initial) a cependant été constatée à la suite du traitement. Ce phénomène a déjà été observé chez des rats traités à la dexaméthasone (Nzang Nguema et al., 2005). Il serait lié au fait que les animaux traités ont plus de difficultés à ajuster la quantité d'aliments à ingérer et diminuent leur consommation de nourriture. De plus, l'administration chronique de glucocorticoïdes induit l'atrophie des muscles et la perte de poids des rats en cours de croissance (Fimbel et al., 1993). Trente jours après la greffe, après euthanasie, l'analyse macroscopique a montré que la combinaison de FasL, étoposide et dexaméthasone diminuait de façon remarquable le développement des tumeurs de cellules gliales humaines dans les cerveaux des rats, comparé à celui des animaux traités avec FasL et étoposide. Cette différence significative peut être expliquée par le fait que la dexaméthasone peut, en plus de son action anti-œdémateuse, inhiber l'angiogénèse de tumeurs solides (Wolff et al., 1997). En effet, des injections intra-péritonéales de dexaméthasone diminuent la taille et la densité vasculaire des tumeurs de rats induites par des greffes de cellules C6. Cependant, même si cette hypothèse est la plus probable, des effets contradictoires sont rapportés avec les cellules de glioblastome, la dexaméthasone ayant une action soit anti-apoptotique (Das et al., 2004), soit proliférative (Zibera et al., 1992) ou anti-proliférative (Kaup et al., 2001). L'effet anti-tumoral de la dexaméthasone n'est donc pas encore clairement défini.

L'action anti-tumorale de l'association de la dexaméthasone, de FasL et de l'étoposide a néanmoins déjà été démontrée *in vitro* sur des cellules RMA de lymphomes murins (Zhu et al., 2002) ou sur des cellules B (Roue et al., 2001). En effet, dans les lymphomes B, l'activation de la voie du récepteur Fas n'est pas suffisante pour induire leur apoptose, quel que soit le nombre de cellules exprimant Fas à leur surface. De même, les cellules B sont résistantes à des traitements basés sur l'administration d'étoposide. Au contraire, ces

lymphocytes B tumoraux, à la suite d'un traitement à la dexaméthasone, peuvent entrer en apoptose en présence de FasL et d'étoposide.

Les résultats obtenus lors de notre étude ont donc permis de mettre en évidence un effet anti-tumoral significatif lors de l'administration simultanée de FasL, étoposide et dexaméthasone. Une disparition complète de la tumeur a été observée chez 1 rat et l'étude immunocytochimique a permis de vérifier l'absence de cellule tumorale (HLA⁺) dans la zone greffée comme dans le reste du parenchyme cérébral examiné. Les perspectives cliniques de cette association de molécules semblent donc prometteuses puisqu'une diminution du développement tumoral, voire une régression complète dans 1 cas, ainsi que de la morbidité des animaux a été constatée. Ce travail pourrait être complété par l'étude de différentes concentrations et durées d'administration.

IV - Séparation des cellules U-87 MG selon la méthode de fractionnement par couplage flux force (Sd FFF)

L'étude précédente de l'action de FasL, étoposide et dexaméthasone a été réalisée sur l'ensemble des cellules de la lignée U-87 MG. Or, l'observation de la lignée en culture montre une forte hétérogénéité des cellules. Isoler les sous-clones de la lignée et les caractériser pourrait donc permettre de trouver des traitements ciblés contre les cellules les plus tumorigènes et donc plus efficaces.

L'étude microscopique de la lignée gliale U-87 MG suggère fortement la présence de différents types morphologiques distincts au sein de cette lignée en culture. En effet, elle est composée de cellules sphériques, regroupées en amas, et de faible adhérence, et à l'inverse, de cellules étalées, adhérentes et avec des expansions cellulaires. De plus, l'absence de marquage avec l'anticorps anti-NF d'une part, et le marquage au niveau de toutes les cellules par l'Ac anti-GFAP ou CD68 d'autre part, montrent que l'hétérogénéité de cette lignée n'est pas due à la présence de différents types cellulaires à l'intérieur des cultures.

Ces différences de morphologie, observées lors de la culture de cellules, ont été confirmées par SdFFF et cytométrie en flux. Ainsi, de façon intéressante, les cellules de la fraction F1, constituée par les cellules étalées et adhérentes, expriment la molécule d'adhésion N-CAM, alors que très peu d'entre elles expriment le récepteur Fas, et se divisent assez rapidement. Au contraire, la population F2, composée des petites cellules faiblement adhérentes organisées en amas, est constituée de cellules exprimant uniquement le récepteur Fas et ne proliférant que très peu.

Ces résultats suggèrent que la technique de SdFFF, utilisant un petit canal de tri, permet de purifier, au sein de la lignée U-87 MG, deux types cellulaires qui présentent des propriétés distinctes au niveau morphologique, au niveau de l'expression de Fas et N-CAM et par leur capacité à proliférer. Des résultats similaires ont déjà été obtenus après tri en SdFFF des cellules de la lignée SH-SY5Y (Lautrette et al., 2003). Dans ce cas, l'expression de la N-CAM était plutôt considérée comme un marqueur de différenciation des cellules alors que Fas

était plutôt exprimé au niveau des cellules les plus immatures. L'hétérogénéité d'expression du récepteur Fas a également été montrée au niveau d'autres cellules comme les cellules B de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B (Roue et al., 2001).

L'expression de la N-CAM au niveau des cellules U-87 MG pourrait plutôt être associée aux propriétés tumorigènes des cellules. La N-CAM (molécule d'adhésion des neurones) est une glycoprotéine importante dans l'organisation des cellules embryonnaires du système nerveux central. L'expression de cette molécule est importante pour le développement local des tumeurs et des métastases (Couldwell et al., 1992). Plusieurs types de gliomes expriment cette molécule (Kleinschmidt-DeMasters et al., 1999) et elle est en partie responsable de l'invasion tumorale (Hikawa et al., 2000). Elle semble également liée à la tumorigénicité des cellules gliales et son expression est généralement associée à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales astrocytaires (Krushel et al., 1998 ; Sasaki et al., 1998). Cependant, l'étude réalisée par Tews (2000) a montré que la N-CAM facilite l'invasion des cellules gliales, suggérant que le blocage de la N-CAM pourrait avoir des effets bénéfiques sur l'effet invasif des tumeurs et être ainsi une voie de recherche thérapeutique. Les résultats obtenus lors de cette étude sont plutôt en faveur de l'hypothèse de Tews (2000). En effet, les cellules qui prolifèrent le plus sont celles qui expriment la N-CAM alors que les cellules qui expriment Fas prolifèrent peu.

Les tris réalisés avec une machine équipée d'un canal de grosse taille ont séparé trois fractions cellulaires possédant des morphologies différentes. Alors que les cellules de la fraction F2 ont reproduit une culture semblable à celle d'origine, les cellules des fractions F1 et F3 remises en culture sont restées rondes et sans prolongements. Les études réalisées sur les fractions F1 et F3 (mélange des deux populations ou ajout de milieu de culture de la fraction F2) ont montré qu'il n'existe pas de coopération cellulaire permettant de reformer une culture semblable à la culture initiale. Les cellules qui composent les fractions F1 et F3 sont donc différentes de celles qui composent la fraction F2. Il existerait ainsi plus de deux sous-populations cellulaires dans la lignée U-87 MG. Cette hypothèse a déjà été démontrée sur cette lignée cellulaire (Carson et Pirruccello, 1998). En effet, des clonages par dilution limite des cellules de la lignée U-87 MG ont permis de mettre en évidence 5 populations cellulaires qui diffèrent par leur taux de prolifération et les antigènes exprimés.

Des études récentes ont montrées qu'il existe au sein de lignées cellulaires gliales des cellules souches tumorales multipotentes (Sanai et al., 2005). En effet, il persiste, dans les lignées cellulaires, comme la lignée gliale C6 (Kondo et al., 2003), ou dans les glioblastomes multiformes (Yuan et al., 2004), une petite sous population constituée de cellules capables de se différencier en neurones ou en cellules gliales *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, la séparation de cellules U-87 MG par SdFFF permet d'envisager la purification de ces cellules souches tumorales. Il serait alors possible d'étudier cette sous population cellulaire et de cibler les molécules thérapeutiques anti-cancéreuses contre celle-ci.

L'ensemble de ces résultats suggère que la lignée gliale U-87 MG est hétérogène et contiendrait des cellules possédant chacune un potentiel tumorigène différent. Ces travaux permettent d'envisager un nouveau type d'étude de la tumorigénicité des cellules. En effet, les différentes fractions cellulaires pourraient être triées et greffées dans des cerveaux de rats immunodéprimés. Il serait ainsi possible de déterminer les propriétés tumorigènes de chaque sous-clone. Ainsi, la recherche de molécules anti-tumorales pourrait être ciblée au niveau des cellules les plus agressives.

V - Etude de l'expression des récepteurs de TRAIL dans les lignées cellulaires SH-SY5Y et U-87 MG

L'étude de l'action pro-apoptotique de TRAIL sur les lignées cancéreuses est intéressante puisque ce ligand n'a en général que peu d'effet sur les cellules saines (Gura, 1997 ; Pollack et al., 2001). En effet, alors que les cellules tumorales expriment plus fortement les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Jaganathan et al., 2002) que les récepteurs TRAIL-R3 et TRAIL-R4 (Van Noesel et al., 2002) à leur surface, ce sont les récepteurs tronqués qui sont le plus fortement présents au niveau de cellules saines (Marsters et al., 1999).

L'étude réalisée a mis en évidence la présence des récepteurs membranaires de TRAIL dans les lignées neuroblastique (SH-SY5Y) et gliale (U-87 MG). L'ensemble de ces données sera complété par la recherche des transcrits de TRAIL-R4 pour les cellules neuroblastiques et de l'ensemble des TRAIL-R pour la lignée gliale. L'expression des différents récepteurs devra également être confirmée au moyen d'autres anticorps spécifiques des TRAIL-R. Les résultats obtenus suggèrent cependant que les quatre récepteurs de TRAIL sont exprimés par les cellules SH-SY5Y et U-87 MG. Ces résultats se différencient de ceux d'autres études qui ont montré que TRAIL-R3 et -R4 ne sont pas exprimés par les cellules de la lignée SH-SY5Y (Hopkins-Donaldson et al., 2000) alors que d'autres auteurs n'ont pas pu mettre en évidence l'expression de TRAIL-R1 et seulement un faible niveau d'expression de TRAIL-R2 (Eggert et al., 2001 ; Yang et al. 2003). Ainsi, l'absence d'expression de TRAIL-R1 et la faible expression de TRAIL-R2 pourraient contribuer, entre autre, à la résistance de certaines lignées neuroblastiques à l'apoptose induite par TRAIL (Yang et al., 2003). Au niveau transcriptionnel, seul TRAIL-R1 a pu être détecté dans la lignée U-87 MG (Rieger et al., 1998) alors que les protéines TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sont exprimées au niveau de ces cellules gliales (Ciusani et al., 2005 ; Ma et al., 2003).

Dans notre étude, comme dans d'autres travaux (Eggert et al., 2001 ; Yang et al., 2003), la lignée neuroblastique est résistante à l'apoptose induite par TRAIL. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance à l'apoptose induite par TRAIL de certaines lignées neuroblastiques, la caspase-8 a été étudiée du fait de son rôle important dans

la signalisation apoptotique induite par TRAIL. Ainsi, quelle que soit la concentration de TRAIL testée, l'IC8 réduit de façon significative la faible apoptose induite par TRAIL. La caspase-8 semble donc intervenir dans la voie apoptotique induite par les récepteurs de TRAIL, contrairement aux résultats apportés par d'autres études (Hopkins-Donaldson et al., 2000 ; Teitz et al., 2000 ; Eggert et al., 2001). De plus, un inhibiteur général des caspases diminue de façon significative l'apoptose induite par différentes concentrations de TRAIL mais est également plus efficace que l'IC8 pour diminuer l'apoptose médiée par TRAIL. Des caspases autres que la caspase-8 sont donc essentielles dans la voie de signalisation apoptotique induite par TRAIL dans les cellules neuroblastiques. Il pourrait s'agir notamment de la caspase-10 qui peut transmettre le signal apoptotique même en l'absence de la caspase-8 (Kischkel et al., 2001) mais d'autres caspases comme les caspases-9, -7 et -3 peuvent également intervenir.

Plusieurs hypothèses sont retenues pour expliquer la résistance des cellules neuroblastiques à l'apoptose induite par TRAIL. L'absence d'expression du récepteur TRAIL-R1, la faible expression du récepteur TRAIL-R2 et le degré d'expression de la caspase-8 peuvent être incriminés dans cette résistance à l'apoptose (Yang et al., 2003). D'autres facteurs, associés à la signalisation cellulaire, peuvent être impliqués. Il s'agit de la surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Fulda et al., 2002), de l'activation de facteurs transcriptionnels comme NF- κ B (Degli-Esposti et al., 1997 ; Pan et al., 1997 ; Screaton et al., 1997 ; Griffith et al., 1998 ; Ehrhardt et al., 2003) ou de la mutation du facteur suppresseur de tumeur, p53 (Takimoto et El-Deiry, 2000). D'autres facteurs transcriptionnels pourraient intervenir dans la modulation de la sensibilité à l'apoptose induite par TRAIL. Ainsi, PPAR- γ , un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires PPAR, qui existe sous deux isoformes γ 1 et γ 2, pourrait intervenir dans le contrôle de cette signalisation. Alors que PPAR- γ 2 est surtout exprimé dans les hépatocytes, PPAR- γ 1 est présent dans la plupart des tissus (Tontonoz et al., 1994). Bien que tous les gènes cibles de ce facteur transcriptionnel ne soient pas bien identifiés, il semble que PPAR- γ joue un rôle important dans la régulation du métabolisme lipidique (Tontonoz et al., 1995) et dans l'inflammation (Chawla et al., 2001). Par ailleurs, PPAR- γ pourrait induire l'apoptose des macrophages activés par le TNF- α et l'IFN- γ (Chinetti et al., 1998). Les ligands naturels et de synthèse du PPAR- γ augmentent l'apoptose induite par TRAIL. Ainsi, la pioglitazone, un ligand de synthèse, agoniste de la PPAR- γ (habituellement utilisé comme antidiabétique oral) augmente l'apoptose induite par

TRAIL des lignées de lymphome T (Göke et al., 2000). L'action pro-apoptotique de la PPAR- γ semble liée au blocage de la prolifération cellulaire et à son antagonisme avec l'activité d'autres facteurs transcriptionnels comme Stat ou NF- κ B (Ricote et al., 1998). L'arrêt de la progression du cycle cellulaire après l'activation de PPAR- γ pourrait être dû à la régulation de l'expression de kinases dépendantes des cyclines (CDK) inhibitrices de la progression du cycle cellulaire comme la p18 et la p21.

A l'inverse de la lignée SH-SY5Y, les cellules de la lignée U-87 MG sont sensibles à TRAIL dont l'effet pro-apoptotique est dose-dépendant. Ces données confortent l'action anti-tumorale de TRAIL, démontrée *in vitro* et *in vivo*. Il pourrait ainsi constituer un agent thérapeutique important dans le cas des gliomes de haut grade (Pollack et al., 2001). C'est dans cette optique que l'activation de PPAR- γ a été étudiée au niveau de la lignée tumorale U-87 MG (Strakova et al., 2005). Plusieurs ligands de PPAR- γ ont un effet cytotoxique sur les cellules et sont ainsi potentiellement thérapeutiques.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence l'expression probable des quatre récepteurs membranaires de TRAIL dans les lignées neuroblastique et gliale. La voie apoptotique induite par TRAIL dans la lignée neuroblastique nécessite la présence de la caspase-8. L'étude de l'effet de TRAIL sur ces deux lignées est à compléter puisque les résultats préliminaires obtenus semblent prometteurs.

VI - Le récepteur p75^{NTR} est séquestré dans l'appareil de Golgi des cellules U-87 MG

Le récepteur p75^{NTR} est habituellement détecté au niveau de la membrane plasmique des cellules. Dans cette étude, nous avons montré que ce récepteur peut être séquestré dans l'appareil de Golgi de cellules tumorales gliales (Voir en Annexe la publication n° 4).

Des analyses en immunofluorescence ont montré que le récepteur p75^{NTR} est localisé dans l'appareil de Golgi. Ceci a été montré par double-marquage en immunofluorescence, au moyen de différents anticorps anti-p75^{NTR} (un anticorps monoclonal anti-p75^{NTR} ou deux anticorps polyclonaux, reconnaissant spécifiquement les extrémités C- et N-terminales du récepteur p75^{NTR}) et d'un anticorps dirigé contre la mannosidase II, protéine spécifiquement exprimée au niveau de l'appareil de Golgi. Ceci a été confirmé en traitant les cellules avec de la BFA et du NDGA, deux toxines qui dégradent l'appareil de Golgi et qui conduisent à une redistribution diffuse, cytoplasmique des anticorps spécifiques de la mannosidase II et de p75^{NTR}. Seulement 3 % des cellules U-87 MG expriment le récepteur p75^{NTR} à la surface de leur membrane plasmique.

L'analyse par Western-blotting a mis en évidence plusieurs bandes correspondant à différents poids moléculaires de la protéine p75^{NTR}. Des protéines de 53,4 ; 56,6 et 75 kDa ont ainsi été détectées. Elles peuvent correspondre à des protéines issues de différents variants d'épissage, à des différences de modifications post-traductionnelles de la protéine ou à des produits de dégradation du récepteur. Afin d'identifier chacune des protéines de poids moléculaire différent, reconnues par les anticorps anti-p75^{NTR}, et de déterminer leur localisation, Golgienne ou membranaire, il serait nécessaire de réaliser d'autres travaux. En effet, la séparation des organites cellulaires par centrifugations différentielles permettrait de déterminer le poids moléculaire des protéines localisées dans l'appareil de Golgi ou dans la membrane plasmique. De plus, des tests de N- et O- déglycosylation et de déphosphorylation permettraient d'identifier les différents types de modifications post-traductionnelles réalisées sur les protéines. Enfin, des réactions de PCR, amplifiées à l'aide d'amorces encadrant l'ARNm codant le récepteur p75^{NTR}, permettraient la recherche des variants d'épissage du

récepteur. Toutefois, les études précédentes de N- et O-déglycosylation du récepteur p75^{NTR} (Yeaman et al., 1997) ont montré que la protéine de 53,4 kDa correspond au récepteur p75^{NTR} dépourvu de N- et O-glycosylation alors que celle de 56,6 kDa n'est pas O-glycosylée. De plus, la protéine de 75 kDa correspond à sa forme mature et serait localisée au niveau de la membrane des cellules. Au contraire, les protéines sans O-glycosylation seraient localisées dans l'appareil de Golgi. En effet, des études ont montré que la O-glycosylation, réalisée dans l'appareil de Golgi, est une étape cruciale pour que les récepteurs soient exprimés à la surface des cellules. Elle peut, de plus, réguler l'association du récepteur p75^{NTR} avec les radeaux lipidiques (Breuza et al., 2002). Cependant, lors de notre étude, aucune corrélation n'a pu être établie entre la localisation du récepteur p75^{NTR} et celle des radeaux lipidiques. Les perturbations des modifications post-traductionnelles se répercutent probablement sur la localisation du récepteur. Il serait à ce niveau intéressant d'étudier la phosphorylation du récepteur p75^{NTR}. En effet, elle est impliquée dans la localisation de la protéine p75^{NTR} au niveau des radeaux lipidiques (Higuchi et al., 2003).

Le récepteur p75^{NTR} est donc séquestré au niveau de l'appareil de Golgi, probablement sous forme immature. Ce phénomène de localisation dans l'appareil de Golgi a déjà été démontré pour d'autres récepteurs. En effet, deux protéines appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF ont été détectées au niveau de l'appareil de Golgi. Ainsi, l'expression du récepteur Fas est régulée par la séquestration de la protéine dans l'appareil de Golgi des cellules de lymphome B (Haynes et al., 2002). De même, la forme de 55 kDa du TNF-R (et non celle de 75 kDa) est localisée de façon prédominante dans l'appareil de Golgi de cellules endothéliales humaines (Bradley et al., 1995). Comme cela a été démontré pour le récepteur Fas, la localisation du récepteur p75^{NTR} dans l'appareil de Golgi pourrait être un mécanisme important de régulation de l'expression de surface du récepteur au niveau des cellules gliales. Ce phénomène pourrait avoir un effet direct sur le développement de tumeurs comme les tumeurs cérébrales. Cette hypothèse semble être confirmée par le fait que l'anticorps anti-p75^{NTR} n'augmente pas le taux d'apoptose des cellules gliales dans notre étude. Ce résultat contraste avec d'autres études qui ont montré que ce récepteur est pro-apoptotique pour les cellules U-87 MG, dans des conditions expérimentales où l'expression du récepteur est observée à la membrane (Yamaguchi et al., 1998 ; Bhakar et al., 2003). La séquestration de ce récepteur pourrait donc permettre aux cellules tumorales d'échapper à l'apoptose induite par la liaison des neurotrophines sur le récepteur p75^{NTR}. Ainsi, provoquer l'expression du récepteur

p75^{NTR} à la surface des cellules tumorales pourrait permettre d'induire leur apoptose. L'exposition des cellules aux ligands classiques du récepteur p75^{NTR}, le NGF et le BDNF, n'a pas induit l'expression du récepteur p75^{NTR} à la surface des cellules. Ces constatations rejoignent celles qui ont été faites avec des cellules endothéliales humaines dont l'exposition à du TNF ne permet pas l'expression membranaire du TNF-R qui reste localisé dans l'appareil de Golgi (Bradley et al., 1995). La recherche de molécules capables d'induire l'expression du récepteur p75^{NTR} à la surface des cellules pourrait être d'un grand intérêt en recherche anti-tumorale. De plus, l'effet d'autres ligands de ce récepteur, comme les NT-3 ou -4, pourrait également être étudié. Il en est de même pour l'acide rétinoïque car il a été démontré qu'il induit l'augmentation de l'expression du récepteur p75^{NTR} à la surface de cellules cancéreuses du poumon avec un effet anti-tumoral (Fiorentini et al., 2002).

Comprendre les mécanismes de séquestration du récepteur pro-apoptotique p75^{NTR} dans l'appareil de Golgi pourrait permettre de contribuer à la compréhension des phénomènes de résistance des cellules tumorales à l'apoptose et ainsi orienter vers de nouvelles voies de recherche de traitements anti-cancéreux.

Conclusion et perspectives

L'ensemble de cette étude a porté sur l'implication de récepteurs de la superfamille des TNF-R dans la résistance à l'apoptose de cellules tumorales du système nerveux et aux conditions de sensibilisation à l'apoptose dépendante de l'activation de ces récepteurs.

Les récepteurs Fas et p75^{NTR} semblent étroitement liés dans leur localisation et au niveau de leurs effets respectifs sur des cellules de neuroblastome humain. Ce résultat est important dans la compréhension des mécanismes de résistance à l'apoptose des cellules. En effet, alors que deux récepteurs peuvent avoir des effets pro-apoptotiques lorsqu'ils sont activés seuls, leurs effets anti-tumoraux s'annulent quand ils sont co-stimulés. Il est donc important de considérer que les cellules tumorales, *in vivo*, sont soumises à plusieurs facteurs externes dont les facteurs neurotrophiques capables d'agir en synergie ou de manière antagoniste dans le développement et/ou la résistance thérapeutique des tumeurs. Ainsi, les analyses réalisées *in vitro* concernant un seul récepteur ne sont que partiellement représentatives du développement tumoral et en limitent ainsi la compréhension. Il est donc nécessaire, soit de tester l'association de plusieurs ligands, soit de déterminer leurs effets sur des modèles expérimentaux de tumeurs *in vivo*. Ainsi, selon cette hypothèse, il sera important d'étudier l'interaction du récepteur Fas avec le récepteur p75^{NTR} ou d'autres voies de signalisation pro-apoptotiques au niveau de tumeurs possédant un haut degré de résistance aux chimiothérapies.

L'effet de FasL associé à l'étoposide et à la dexaméthasone a donc été étudié non seulement *in vitro* mais surtout *in vivo*, après greffe des cellules de glioblastome humain dans des cerveaux de rats immunodéprimés. La totalité des facteurs endogènes des cerveaux de rats, qui peuvent agir sur la tumeur greffée, ont alors été pris en compte. En effet, l'expression des récepteurs et des facteurs de croissance présents dans les cerveaux de rats, ainsi que leur concentration respective, sont alors plus proches de celles de la pathologie tumorale humaine. Les résultats sont de ce fait obtenus dans des conditions reproduisant la physiopathologie des glioblastomes. L'effet anti-tumoral démontré ici pour FasL, étoposide et dexaméthasone est

donc particulièrement intéressant et permet d'envisager des essais avec d'autres concentrations et d'autres modalités d'administration thérapeutique et pourrait permettre de développer ce modèle de glioblastome expérimental avec la perspective de l'appliquer à des recherches cliniques.

L'analyse des cellules triées par SdFFF a mis en évidence une hétérogénéité des cellules gliales et, potentiellement, des différences dans l'effet tumorigène des sous-populations cellulaires. Après tri des cellules, il sera possible de greffer les différentes fractions de cellules dans des cerveaux de rats Nude et de déterminer leur capacité à se développer pour former une tumeur solide *in vivo*. Ainsi, en connaissant les paramètres de prolifération et les récepteurs exprimés, il sera possible de cibler les traitements sur les cellules dont la capacité tumorigène est la plus élevée donc sur les cellules à plus fort potentiel tumoral en pathologie humaine.

Une autre voie de recherche de traitement a été débutée et concerne l'action de TRAIL. En effet, il paraît important de tester l'effet de TRAIL et de l'expression des récepteurs de TRAIL, notamment ceux à domaine de mort, sur les lignées cellulaires. Leur réponse apoptotique est une autre perspective de recherche thérapeutique, tant dans le domaine des neuroblastomes que des glioblastomes. Il convient actuellement d'étudier *in vivo* l'effet de TRAIL sur des modèles expérimentaux de neuroblastomes et de glioblastomes développés chez le rat.

Enfin, un dernier paramètre intervenant dans la résistance des tumeurs à l'apoptose a été mis en évidence. Ainsi, alors que la localisation préférentielle dans l'appareil de Golgi de deux récepteurs, TNF-R et Fas, avait déjà été démontrée pour certains types de cellules tumorales résistantes à l'apoptose, cette étude a montré que le récepteur p75^{NTR} pouvait lui aussi être séquestré au niveau de l'appareil de Golgi. Cette séquestration golgienne pourrait alors empêcher l'effet pro-apoptotique des NT par la voie du récepteur p75^{NTR}. Ainsi, la compréhension des mécanismes sous-jacents à la séquestration du récepteur pro-apoptotique p75^{NTR} dans l'appareil de Golgi permettrait potentiellement de comprendre une des voies de résistance des cellules tumorales à l'apoptose et d'orienter vers de nouvelles voies de traitements anti-cancéreux.

Bibliographie

A

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998, 281, 1322-6.

Agerman K, Canlon B, Duan M, Ernfors P. Neurotrophins, NMDA receptors, and nitric oxide in development and protection of the auditory system. *Ann N Y Acad Sci*. 1999, 884, 131-42.

Ahn JH, Park SM, Cho HS, Lee MS, Yoon JB, Vilcek J, Lee TH. Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J Biol Chem*. 2001, 276, 47100-6.

Akiyama H, Ino T, Tokunaga E, Katsuda I, and Ezaki K. A synergistic increase of apoptosis utilizing Fas antigen expression induced by low doses of anticancer drug. *Rinsho Byori*. 2003, 51, 733-9.

Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sekaly RP. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J. Exp. Med*. 1999, 190, 1879- 90.

Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J. Exp. Med*. 1993, 178, 2231-5.

Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol. Cell. Biol*. 2002, 22, 207-20.

Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD, Toma JG, Atwal J, Kaplan DR, Miller FD. P53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol.* 1998, 143, 1691-703.

Anton ES, Weskamp G, Reichardt LF, Matthew WD. Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994, 91, 2795-9.

Aoyama T, Takemura G, Maruyama R, Kosai K, Takahashi T, Koda M, Hayakawa K, Kawase Y, Minatoguchi S, Fujiwara H. Molecular mechanisms of non-apoptosis by Fas stimulation alone versus apoptosis with an additional actinomycin D in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 2002, 55, 787-98.

Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1999, 11, 255-60.

B

Baeuerle PA. I κ B-NF- κ B Structures: At the interface of inflammation control. *Cell.* 1998, 95, 729-31.

Bai M, Papoudou-Bai A, Kitsoulis P, Horianopoulos N, Kamina S, Agnantis NJ, Kanavaros P. Cell cycle and apoptosis deregulation in classical Hodgkin lymphomas. *In Vivo.* 2005, 19, 439-53.

Ballif BA, Blenis J. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ.* 2001, 12, 397-408.

Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, Causing CG, Miller FD. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol.* 1998, 140, 911-23.

Bar PR. Motor neuron disease in vitro: the use of cultured motor neurons to study amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* 2000, 405, 285-95.

- Barde YA. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron*. 1989, 2, 1525-34.
- Barker PA, Miller FD, Large TH, Murphy RA. Generation of the truncated form of the nerve growth factor receptor by rat Schwann cells. Evidence for post-translational processing. *J Biol Chem*. 1991, 266, 19113-9.
- Barker PA, Salehi A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res*. 2002, 67, 705-12.
- Barker PA, Shooter EM. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75^{L^NTR} reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron*. 1994, 13, 203-15.
- Barker PA. p75^{N^TR}: A study in contrasts. *Cell Death Differ*. 1998, 5, 346-56.
- Barrett GL, Bartlett PF. The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994, 91, 6501-5.
- Barrett GL, Georgiou A. The low-affinity nerve growth factor receptor p75^{NGFR} mediates death of PC12 cells after nerve growth factor withdrawal. *J Neurosci Res*. 1996, 45, 117-28.
- Barthlen W, Schafer J, Girgert R, Schuster M, Schweizer P. Apoptosis of cultured neuroblastoma cells is induced by ceramide and not by ligation of the Fas/Apo-1/CD95 receptor. *Chemotherapy*. 1999, 45, 258-67.
- Bazenet CE, Mota MA, Rubin LL. The small GTP-binding protein Cdc42 is required for nerve growth factor withdrawal-induced neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95, 3984-9.
- Becher B, D'Souza SD, Troutt AB, Antel JP. Fas expression on human foetal astrocytes without susceptibility to Fas-mediated cytotoxicity. *Neuroscience*. 1998, 84, 627-34.
- Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*. 1991, 254, 274-7.

Benedetti M, Levi A, Chao MV. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993, 90, 7859-63.

Bentley CA, Lee KF. p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *J Neurosci*. 2000, 20, 7706-15.

Benzel I, Barde YA, Casademunt E. Strain-specific complementation between NRIF1 and NRIF2, two zinc finger proteins sharing structural and biochemical properties. *Gene*. 2001, 281, 19-30.

Berthold F, Burdach S, Kremens B, Lampert F, Niethammer D, Riehm H, Ritter J, Treuner J, Utsch S, Zieschang J. The role of chemotherapy in the treatment of children with neuroblastoma stage IV: the GPOS (German Pediatric Oncology Society) experience. *Klin Padiatr*. 1990, 202, 262-9.

Bhakar AL, Howell JL, Paul CE, Salehi AH, Becker EB, Said F, Bonni A, Barker PA. Apoptosis induced by p75^{NTR} overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J Neurosci*. 2003, 23, 11373-81.

Bian X, Giordano TD, Lin HJ, Solomon G, Castle VP, Opiari AW Jr. Chemotherapy-induced apoptosis of S-type neuroblastoma cells requires caspase-9 and is augmented by CD95/Fas stimulation. *J Biol Chem*. 2004, 279, 4663-9.

Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75^{NTR}. *EMBO J*. 1999, 18, 616-22.

Bicknell GR, Cohen GM. Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1995, 207, 40-7.

Biggs WH 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96, 7421-6.

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, Gazula VR, Lisanti MP, Dobrowsky RT. Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem.* 1999, 274, 257-63.

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.

Bobé P. The Fas - Fas Ligand apoptotic pathway. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2002.

Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, Blenis J, Tschopp J. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol.* 2000, 2, 241-3.

Boesen-de Cock J, de Vries GRE, Williams GT, Borst J. The anti-cancer drug etoposide can induce caspase-8 processing and apoptosis in the absence of CD95 receptor-ligand interaction. *Apoptosis.* 1998, 3, 17-25.

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D.A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 7795-8.

Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science.* 1999, 286, 1358-62.

Borrello MG, Bongarzone I, Pierotti MA, Luksch R, Gasparini M, Collini P, Pilotti S, Rizzetti MG, Mondellini P, De Bernardi B, et al. Trk and ret proto-oncogene expression in human neuroblastoma specimens: high frequency of trk expression in non-advanced stages. *Int J Cancer.* 1993, 54, 540-5.

Bradley JR, Thiru S, Pober JS. Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 1995, 146, 27-32.

Brann AB, Scott R, Neuberger Y, Abulafia D, Boldin S, Fainzilber M, Futerman AH. 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.

Brann AB, Tcherpakov M, Williams IM, Futerman AH, Fainzilber M. Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem.* 2002, 277, 9812-18.

Breuzza L, Garcia M, Delgrossi MH, Le Bivic A. Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp. Cell. Res.* 2002, 273, 178-86.

Bruehlmeier M, Roelcke U, Blauenstein P, Missimer J, Schubiger PA, Locher JT, Pellikka R, Ametamey SM. Measurement of the extracellular space in brain tumors using ⁷⁶Br-bromide and PET. *J Nucl Med.* 2003, 44, 1210-8.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 1999, 96, 857-68.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1999, 15, 269-90.

Bunone G, Mariotti A, Compagni A, Morandi E, Della Valle G. Induction of apoptosis by p75 neurotrophin receptor in human neuroblastoma cells. *Oncogene.* 1997, 14, 1463-70.

Burns TF, El-Deiry WS. Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach. *J Biol Chem.* 2001, 276, 37879-86.

Busuttill V, Bottero V, Frelin C, Imbert V, Ricci JE, Auberger P, Peyron JF. Blocking NF-kappaB activation in Jurkat leukemic T cells converts the survival agent and tumor promoter PMA into an apoptotic effector. *Oncogene*. 2002, 21, 3213-24.

Buyse IM, Shao G, Huang S. The retinoblastoma protein binds to RIZ, a zinc-finger protein that shares an epitope with the adenovirus E1A protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, 92, 4467-71.

C

Camerini D, Walz G, Loenen WA, Borst J, Seed B. The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J Immunol*. 1991, 147, 3165-9.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, and Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998, 282, 1318-21.

Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell*. 1997, 90, 315-23.

Carson SD, Pirruccello SJ. Tissue factor and cell morphology variations in cell lines subcloned from U87-MG. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998, 9, 539-47.

Carter BD, Dechant G, Frade JM, Kaltschmidt C, Barde YA. Neurotrophins and their p75 receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1996a, 61, 407-15.

Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhäuser N, Böhm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde YA. Selective Activation of NF- κ B by Nerve Growth Factor Through the Neurotrophin Receptor p75. *Science*. 1996b, 272, 542-5.

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.

Casaccia-Bonnel P, Gu C, Khursigara G, Chao MV. p75 neurotrophin receptor as a modulator of survival and death decisions. *Microsc Res Tech.* 1999, 45, 217-24.

Casademunt E, Carter BD, Benzel I, Frade JM, Dechant G, Barde YA. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J.* 1999, 18, 6050-61.

Casha S, Yu WR, Fehlings MG. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with Fas and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neurosci.* 2001, 103, 203-18.

Chakraborti T, Mandal A, Mandal M, Das S, Chakraborti S. Complement activation in heart diseases: role of oxydants. *Cell Signal.* 2000, 12, 607-17.

Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science.* 1998, 281, 1860-3.

Chao MV. The p75 neurotrophin receptor. *J. Neurobiol.* 1994, 25, 1373-85.

Chao MV, Bothwell M. Neurotrophins: To Cleave or Not to Cleave. *Neuron.* 2002, 33, 9-12.

Chao MV, Hempstead BL. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 1995, 18, 321-6.

Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity.* 1997, 7, 821-30.

Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell.* 2001, 7, 161-71.

Cheema ZF, Wade SB, Sata M, Walsh K, Sohrabji F, Miranda RC. Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex : induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J Neurosci.* 1999, 19, 1754-70.

Cheng B, McMahon DG, Mattson MP. Modulation of calcium current, intracellular calcium levels and cell survival by glucose deprivation and growth factors in hippocampal neurons. *Brain Res.* 1993, 607, 275-85.

Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science.* 1994, 263, 1759-62.

Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, et coll. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* 1998, 273, 25573-80.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 1995, 81, 505-12.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, Dixit VM. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science.* 1996a, 274, 990-2.

Chinnaiyan AM, Prasad U, Shankar S, Hamstra DA, Shanaiah M, Chenevert TL, Ross BD, Rehemtulla A. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97, 1754-9.

Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996b, 271, 4961-5.

Chittka A, Chao MV. Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96, 10705-10.

Choi C, Park JY, Lee J, Lim JH, Shin EC, Ahn YS, Kim CH, Kim SJ, Kim JD, Choi IS, Choi IH. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the

expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma. *J. Immunol.* 1999, 162, 1889-95.

Choi C, Xu X, Oh JW, Lee SJ, Gillespie GY, Park H, Jo H, Benveniste EN. Fas-induced expression of chemokines in human glioma cells: Involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase 1. *Cancer Research.* 2001, 61, 3084-91.

Choi C, Kutsch O, Park J, Zhou T, Seol DW, Benveniste EN. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces caspase-dependent interleukin-8 expression and apoptosis in human astrogloma cells. *Mol Cell Biol.* 2002, 22, 724-36.

Choi K, Benveniste EN, Choi C. Induction of intercellular adhesion molecule-1 by Fas ligation: proinflammatory roles of Fas in human astrogloma cells. *Neurosci Lett.* 2003, 352, 21-4.

Ciusani E, Croci D, Gelati M, Calatozzolo C, Sciacca F, Fumagalli L, Balzarotti M, Fariselli L, Boiardi A, Salmaggi A. In vitro effects of topotecan and ionizing radiation on TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis in malignant glioma. *J Neurooncol.* 2005, 71, 19-25.

Ciusani E, Perego P, Carenini N, Corna E, Facchinetti F, Boiardi A, Salmaggi A, Zunino F. Fas/CD95-mediated apoptosis in human glioblastoma cells: a target for sensitisation to topoisomerase I inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 2002, 63, 881-7.

Cock JG, Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. CD95 (Fas/APO-1) induces ceramide formation and apoptosis in the absence of a functional acid sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 7560-5.

Coffer PJ, Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem.* 1991, 201, 475-81.

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.

Cotrina ML, Gonzalez-Hoyuela M, Barbas JA, Rodriguez-Tebar A. Programmed cell death in the developing somites is promoted by nerve growth factor via its p75(NTR) receptor. *Dev Biol.* 2000, 228, 326-36.

Couldwell WT, de Tribolet N, Antel JP, Gauthier T, Kuppner MC. Adhesion molecules and malignant gliomas: implications for tumorigenesis. *J Neurosurg.* 1992, 76, 782-91.

Coulson EJ, Reid K, Baca M, Shipham KA, Hulett SM, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem.* 2000, 275, 30537-45.

Couzinet A, Hérincs Z, Hueber AO. Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *Médecine/Sciences.* 2002, 18, 841-52.

Cremesti A, Paris F, Grassme H, Holler N, Tschopp J, Fuks Z, Gulbins E, Kolesnick R. Ceramide enables Fas to cap and kill. *J Biol Chem.* 2001, 276, 23954-61.

Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol.* 2002, 168, 1356-61.

Crompton M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2000, 12, 414-9.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995, 378, 785-9.

Cui H, Li T, Ding HF. Linking of N-Myc to death receptor machinery in neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 2005, 280, 9474-81.

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.

Curtis R, Adryan KM, Stark JL, Park JS, Compton DL, Weskamp G, Huber LJ, Chao MV, Jaenisch R, Lee KF, Lindsay RM, DiStefano PS. Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron*. 1995, 14, 1201-11.

D

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 1999, 13, 2905-27.

Das A, Banik NL, Patel SJ, Ray SK. Dexamethasone protected human glioblastoma U87MG cells from temozolomide induced apoptosis by maintaining Bax:Bcl-2 ratio and preventing proteolytic activities. *Molecular Cancer*. 2004, 3, 36.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997, 91, 231-41.

Davey F, Davies AM. TrkB signalling inhibits p75-mediated apoptosis induced by nerve growth factor in embryonic proprioceptive neurons. *Curr Biol*. 1998, 8, 915-8.

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000, 103, 239-52.

De la Monte SM, Sohn YK, Wands JR. Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci*. 1997, 152, 73-83.

Deak JC, Cross JV, Lewis M, Qian Y, Parrott LA, Distelhorst CW. Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998, 95, 5595-600.

Dechant G, Barde YA. Signalling through the neurotrophin receptor p75^{NTR}. *Curr Opin Neurobiol*. 1997, 7, 413-8.

DeFreitas MF, McQuillen PS, Shatz CJ. A novel p75^{NTR} signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons. *J Neurosci.* 2001, 21, 5121-9.

Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* 1997, 7, 813-20.

Del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science.* 1997, 278, 687-9.

Della-Bianca V, Rossi F, Armato U, Dal-Pra I, Costantini C, Perini G, Politi V, Della Valle G. Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106–126). *J Biol Chem.* 2001, 276, 38929-33.

Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS, Newell MK. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol.* 2003, 5, 118-25.

Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V, Le Bourhis X, Boilly B, Peyrat JP, Hondermarck H. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J Biol Chem.* 2001, 276, 17864-70.

Deshmukh M, Vasilakos J, Deckwerth TL, Lampe PA, Shivers BD, Johnson EM Jr. Genetic and metabolic status of NGF-deprived sympathetic neurons saved by an inhibitor of ICE family proteases. *J Cell Biol.* 1996, 135, 1341-54.

DiStefano PS, Clagett-Dame M, Chelsea DM, Loy R. Developmental regulation of human truncated nerve growth factor receptor. *Ann Neurol.* 1991, 29, 13-20.

Dobrowsky RT, Carter BD. Coupling of the p75 neurotrophin receptor to sphingolipid signalling. *Ann N Y Acad Sci.* 1998, 845, 32-45.

Dobrowsky RT, Jenkins GM, Hannun YA. Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75^{NTR} 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.

Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am. J. Pathol.* 1997, 151, 1205-13.

Dowling P, Ming X, Raval S, Husar W, Casaccia-Bonofil P, Chao M, Cook S, Blumberg B. Up-regulated p75^{NTR} neurotrophin receptor on glial cells in MS plaques. *Neurology.* 1999, 53, 1676-82.

D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, Raine CS, Antel JP. Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J. Exp. Med.* 1996, 184, 2361-70.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000, 102, 33-42.

Du K, Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem.* 1998, 273, 32377-9.

Durkop H, Latza U, Hummel M, Eitelbach F, Seed B, Stein H. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell.* 1992, 68, 421-7.

Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. *Immunol. Today.* 1986, 7, 115-19.

E

Eberstadt M, Huang B, Chen Z, Meadows RP, Ng SC, Zheng L, Lenardo MJ, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*. 1998, 392, 941-5.

Edsjo A, Lavenius E, Nilsson H, Hoehner JC, Simonsson P, Culp LA, Martinsson T, Larsson C, Pahlman S. Expression of trkB in human neuroblastoma in relation to MYCN expression and retinoic acid treatment. *Lab. Invest.* 2003, 83, 813-23.

Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, Brodeur GM. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res.* 2001, 61, 1314-9.

Eggert A, Ikegaki N, Liu X, Chou TT, Lee VM, Trojanowski JQ, Brodeur GM. Molecular dissection of TrkA signal transduction pathways mediating differentiation in human neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2000, 19, 2043-51.

Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, Hiscott J, Debatin KM, Jeremias I. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. *Oncogene*. 2003, 22, 3842-52.

El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Dolle 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.

Enari M, Hug H, Nagata S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature*. 1995, 375, 78-81.

Eramo A, Sargiacomo M, Ricci-Vitiani L, Todaro M, Stassi G, Messina CG, Parolini I, Lotti F, Sette G, Peschle C, De Maria R. CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells. *Eur J Immunol*. 2004, 34, 1930-40.

Ernfors P, Hallbook F, Ebendal T, Shooter EM, Radeke MJ, Misko TP, Persson H. Developmental and regional expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat. *Neuron*. 1988, 1, 983-96.

Ernfors P, Henschen A, Olson L, Persson H. Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron*. 1989, 2, 1605-13.

Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20, 929-35.

Ethell DW, Buhler LA. Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *J Clin Immunol.* 2003, 23, 439-46.

F

Fan G, Merritt SE, Kortenjann M, Shaw PE, Holzman LB. Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46^{SAPK} and p38^{mapk} but not ERK2. *J Biol Chem.* 1996, 271, 24788-93.

Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E. The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem Sci.* 1995, 20, 342-4.

Fimbel S, Abdelmalki A, Mayet MH, Sempore B, Koubi H, Pugeat M, Dechaud H, Favier RJ. Exercise training fails to prevent glucocorticoid-induced muscle alterations in young growing rats. *Pflugers Arch.* 1993, 424, 369-76.

Fiorentini C, Facchetti M, Finardi A, Sigala S, Paez-Pereda M, Sher E, Spano P, Missale C. Nerve growth factor and retinoic acid interactions in the control of small cell lung cancer proliferation. *Eur. J. Endocrinol.* 2002, 147, 371-9.

Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell.* 1995, 81, 935-46.

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.

Frade JM, Barde YA. Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays*. 1998, 20, 137-45.

Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*. 1996, 383, 166-8.

Frade JM. NRAGE and the cycling side of the neurotrophin receptor p75. *Trends Neurosci*. 2000a, 23, 591-2.

Frade JM. Unscheduled re-entry into the cell cycle induced by NGF precedes cell death in nascent retinal neurones. *J Cell Sci*. 2000b, 113, 1139-48.

Frankel B, Longo SL, Leach C, Canute GW, Ryken TC. Apoptosis and survival in high-grade astrocytomas as related to tumor Fas (APO-1/CD95) expression. *J Neurooncol*. 2002, 59, 27-34.

Freiberg RA, Spencer DM, Choate KA, Duh HJ, Schreiber SL, Crabtree GR, et al. Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1997, 108, 215-9.

Fryer RH, Kaplan DR, Feinstein SC, Radeke MJ, Grayson DR, Kromer LF. Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain. *J Comp Neurol*. 1996, 374, 21-40.

Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*. 2004, 384, 201-32.

Fulda S, Jeremias I, Debatin KM. Cooperation of betulinic acid and TRAIL to induce apoptosis in tumor cells. *Oncogene*. 2004, 23, 7611-20.

Fulda S, Meyer E, Debatin KM. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene*. 2002, 21, 2283-94.

Fulda S, Scaffidi C, Pietsch T, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM. Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ.* 1998, 5, 884-93.

Fundin BT, Mikaelis A, Westphal H, Ernfors P. A rapid and dynamic regulation of GDNF-family ligands and receptors correlate with the developmental dependency of cutaneous sensory innervation. *Development.* 1999, 126, 2597-610.

G

Galvan V, Logvinova A, Sperandio S, Ichijo H, Bredesen DE. Type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) signalling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). *J.Biol Chem.* 2003, 278, 13325-32.

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.

Gentry JJ, Casaccia-Bonnett P, Carter BD. Nerve growth factor activation of nuclear factor κ B through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 Schwannoma cells. *J Biol Chem.* 2000, 275, 7558-65.

Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science.* 1994, 263, 1618-23.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and REL proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1998, 16, 225-60.

Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF κ B puzzle. *Cell.* 2002, 109, 81-96.

Giclas PC, Pinckard RN, Olson MS. *In vitro* activation of complement by isolated human heart subcellular membranes. *J. Immunol.* 1979, 122, 146-51.

Gliniak B, Le T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity *in vivo* is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11. *Cancer Res.* 1999, 59, 6153-8.

Göke R, Goke A, Goke B, Chen Y. Regulation of TRAIL-induced apoptosis by transcription factors. *Cell Immunol.* 2000, 201, 77-82.

Gomez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA. Protein kinase C (PKC) inhibits Fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K⁺ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 19609-19.

Gomez-Angelats M, Cidlowski JA. Protein kinase C regulates FADD recruitment and death-inducing signaling complex formation in Fas/CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 44944-52.

Grassme H, Cremesti A, Kolesnick R, Gulbins E. Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene.* 2003, 22, 5457-70.

Green DR. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 1994, 6, 476-87.

Griffith TS, Lynch DH. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol.* 1998, 10, 559-63.

Grob PM, Ross AH, Koprowski H, Bothwell M. Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1985, 260, 8044-49.

Gross N, Balmas K, Beretta Brognara C, Tschopp J. Expression of Fas (APO-1/CD95) and Fas ligand (FasL) in human neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001, 36, 111-4.

Gu C, Casaccia-Bonofil P, Srinivasan A, Chao MV. Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *J Neurosci.* 1999, 19, 3043-9.

Gulbins E, Grassme H. Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002, 1585, 139-45.

Gulbins E. Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol. Res.* 2003, 47, 393-9.

Gura T. How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science.* 1997, 277, 768.

H

Hallbook F, Ibanez CF, Persson H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron*. 1991, 6, 845-58.

Hannun YA, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol*. 2000, 10, 73-80.

Hantzopoulos PA, Suri C, Glass DJ, Goldfarb MP, Yancopoulos GD. The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron*. 1994, 13, 187-201.

Harding TC, Xue L, Bienemann A, Haywood D, Dickens M, Tolkovsky AM, Uney JB. Inhibition of JNK by overexpression of the JNK binding domain of JIP-1 prevents apoptosis in sympathetic neurons. *J Biol Chem*. 2001, 276, 4531-4.

Hatam A, Yu ZY, Bergstrom M, Berggren BM, Greitz T. Effect of dexamethasone treatment on peritumoral brain edema: evaluation by computed tomography. *J Comput Assist Tomogr*. 1982, 6, 586-92.

Haynes AP, Daniels I, Abhulayha AM, Carter GI, Metheringham R, Gregory CD, Thomson BJ. CD95 (Fas) expression is regulated by sequestration in the Golgi complex in B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol*. 2002, 118, 488-94.

Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 1995, 80, 213-23.

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.

Herrant M, Luciano F, Loubat A, Auberger P. The protective effect of phorbol esters on Fas-mediated apoptosis in T cells. Transcriptional and postranscriptional regulation. *Oncogene*. 2002, 21, 4957-68.

Hersey P, Zhang XD. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2001, 1, 142-50.

Hetz CA, Hunn M, Rojas P, Torres V, Leyton L, Quest AF. Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J. Cell. Sci.* 2002, 115, 4671-83.

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.

Hikawa T, Mori T, Abe T, Hori S. The ability in adhesion and invasion of drug-resistant human glioma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2000, 19, 357-62.

Hilliard B, Wilmen A, Seidel C, Liu TS, Goke R, Chen Y. Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2001, 166, 1314-9.

Hirai S, Izawa M, Osada S, Spyrou G, Ohno S. Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene.* 1996, 12, 641-50.

Hoang-Xuan K, Sanson M, Delattre JY. Biologie des gliomes : acquis et perspectives cliniques. *Med Sci.* 1999, 15, 1075-7.

Hoehner JC, Olsen L, Sandstedt B, Kaplan DR, Pahlman S. Association of neurotrophin receptor expression and differentiation in human neuroblastoma. *Am. J. Pathol.* 1995, 147, 102-13.

Hofmann K, Tschopp J. The death domain motif found in Fas (Apo-1) and TNF receptor is present in proteins involved in apoptosis and axonal guidance. *FEBS Lett.* 1995, 371, 321-3.

Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature.* 1990, 344, 339-41.

Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emler 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 U S A*. 1997, 94, 12419-24.

Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med*. 2000, 108, 317-30.

Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Bourlond KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N. Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2000, 60, 4315-9.

Horton A, Laramie G, Wyatt S, Shih A, Winslow J, Davies AM. NGF binding to p75 enhances the sensitivity of sensory and sympathetic neurons to NGF at different stages of development. *Mol Cell Neurosci*. 1997, 10, 162-72.

Hsu SC, Wu CC, Luh TY, Chou CK, Han SH, Lai MZ. Apoptotic signal of Fas is not mediated by ceramide. *Blood*. 1998, 91, 2658-63.

Hu MCT, Qiu WR, Wang YP. JNK1, JNK2 and JNK3 are p53 N-terminal serine 34 kinases. *Oncogene*. 1997, 15, 2277-87.

Hu WH, Johnson H, Shu HB. Activation of NF- κ B by FADD, Casper, and Caspase-8. *J Biol Chem*. 2000, 275, 10838-44.

Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*. 1996, 384, 638-41.

Huang CS, Zhou J, Feng AK, Lynch CC, Klumperman J, DeArmond SJ, Mobley WC. Nerve growth factor signaling in caveolae-like domains at the plasma membrane. *J Biol Chem*. 1999, 274, 36707-14.

Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001, 24, 677-736.

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.

Hughes AL, Messineo-Jones D, Lad SP, Neet KE. Distinction between differentiation, cell cycle, and apoptosis signals in PC12 cells by the nerve growth factor mutant delta9/13, which is selective for the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci Res.* 2001, 63, 10-9.

Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF, Ashkenazi A, de Vos AM. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell.* 1999, 4, 563-71.

I

Irie S, Hachiya T, Rabizadeh S, Maruyama W, Mukai J, Li Y, Reed JC, Bredesen DE, Sato TA. Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75^{NTR} and their effect on NF- κ B activation. *FEBS Lett.* 1999, 460, 191-8.

Ishida T, Mizushima SI, Azuma S, Kobayashi N, Tojo T, Suzuki K, Aizawa S, Watanabe T, Mosialos G, Kieff E, Yamamoto T, Inoue JI. Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem.* 1996, 271, 28745-8.

Ito M, Nagashima T, Hoshino T. Quantitation and distribution analysis of glial fibrillary acidic protein in human glioma cells in culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1989, 48, 560-7.

Itoh K, Brackenbury R, Akeson RA. Induction of L1 mRNA in PC12 cells by NGF is modulated by cell-cell contact and does not require the high-affinity NGF receptor. *J Neurosci.* 1995, 15, 2504-12.

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 1991, 66, 233-43.

J

Jaganathan J, Petit JH, Lazio BE, Singh SK, Chin LS. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in established and primary glioma cell lines. *Neurosurg Focus*. 2002, 13.

Jelaska A, Korn JH. Anti-Fas induces apoptosis and proliferation in human dermal fibroblasts: differences between foreskin and adult fibroblasts. *J. Cell. Physiol*. 1998, 175, 19-29.

Jing S, Tapley P, Barbacid M. Nerve growth factor mediates signal transduction through Trk homodimer receptors. *Neuron*. 1992, 9, 1067-79.

Johnsen JI, Pettersen I, Ponthan F, Sveinbjornsson B, Flaegstad T, Kogner P. Synergistic induction of apoptosis in neuroblastoma cells using a combination of cytostatic drugs with interferon-gamma and TRAIL. *Int J Oncol*. 2004, 25, 1849-57.

Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell*. 1986, 47, 545-54.

Johnson EM Jr, Taniuchi M, Clark HB, Springer JE, Koh S, Tayrien MW, Loy R. Demonstration of the retrograde transport of nerve growth factor receptor in the peripheral and central nervous system. *J Neurosci*. 1987, 7, 923-9.

Jones JI, D'Ercole AJ, Camacho-Hubner C, Clemmons DR. Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 1 in cell culture and in vivo: effects on affinity for IGF-I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991, 88, 7481-5.

Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*. 1995, 373, 444-8.

Jung YJ, Kim JY, Park JH. TGF-beta1 inhibits Fas-mediated apoptosis by regulating surface Fas and cFLIPL expression in human leukaemia/lymphoma cells. *Int J Mol Med*. 2004, 13, 99-104.

K

Kagiyama A, Savage HE, Michael LH, Hanson G, Entman ML, Rossen RD. Molecular basis of complement activation in ischemic myocardium: identification of specific molecules of mitochondrial origin that bind human C1q and fix complement. *Circ Res.* 1989, 64, 607-15.

Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF- κ B by the Akt/PKB kinase. *Current Biol.* 1999, 9, 601-5.

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.

Kaplan DR, Matsumoto K, Lucarelli E, Thiele CJ. Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. *Neuron.* 1993, 11, 321-31.

Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 2000, 10, 381-91.

Kaplan DR, Stephens RM. Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J Neurobiol.* 1994, 25, 1404-17.

Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 2002, 3, 221-7.

Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacsovics M, Tschopp J. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr. Biol.* 2000, 10, 640-8.

Kaup B, Schindler I, Knupfer H, Schlenzka A, Preiss R, Knupfer MM. Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. *J Neurooncol.* 2001, 51, 105-10.

Kelley SK, Ashkenazi A. Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol.* 2004, 4, 333-9.

Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 1999, 190, 1891-6.

Keppler OT, Peter ME, Hinderlich S, Moldenhauer G, Stehling P, Schmitz I, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M. Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology.* 1999, 9, 557-69.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972, 26, 239-57.

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.

Khursigara G, Orlinick JR, Chao MV. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem.* 1999, 274, 2597-600.

Kim JY, Sutton ME, Lu DJ, Cho TA, Goumnerova LC, Goritchenko L, Kaufman JR, Lam KK, Billet AL, Tarbell NJ, Wu J, Allen JC, Stiles CD, Segal RA, Pomeroy SL. Activation of neurotrophin-3 receptor TrkC induces apoptosis in medulloblastomas. *Cancer Res.* 1999, 59, 711-9.

Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, el-Deiry WS. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2000, 6, 335-46.

Kimberley FC, Screaton GR. Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors. *Cell Research.* 2004, 14, 359-72.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 1995, 14, 5579-88.

Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem.* 2001, 276, 46639-46.

Kisenge RR, Toyoda H, Kang J, Tanaka S, Yamamoto H, Azuma E, Komada Y. Expression of short-form caspase 8 correlates with decreased sensitivity to Fas-mediated apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Sci.* 2003, 94, 598-605.

Klein R, Conway D, Parada LF, Barbacid M. The *TrkB* tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell.* 1990, 61, 647-56.

Kleinschmidt-DeMasters BK, Orr EA, Savelieva E, Owens GC, Kruse CA. Paucity of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) nuclear immunostaining in gliomas and inability of retinoic acid to influence neural cell adhesion molecule (NCAM) expression. *J Neurooncol.* 1999, 41, 31-42.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997, 275, 1132-6.

Klug A, Schwabe JW. Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J.* 1995, 9, 597-604.

Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101, 781-6.

Kong H, Boulter J, Weber JL, Lai C, Chao MV. An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci.* 2001, 21, 176-85.

Kovacsovic T, Tschopp J, Kress A, Isliker H. Antibody-independent activation of C1, the first component of complement, by cardiolipin. *J Immunol.* 1985, 135, 2695-700.

Krajewska M, Krajewski S, Zapata JM, Van Arsdale T, Gascoyne RD, Berern K, McFadden D, Shabaik A, Hugh J, Reynolds A, Clevenger CV, Reed JC. TRAF-4 expression

in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am J Pathol.* 1998, 152, 1549-61.

Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000, 407, 789-95.

Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NF- κ B inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 2001, 21, 3964-73.

Kroemer G. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ.* 1998, 5, 547.

Krushel LA, Tai MH, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) domains and intracellular signaling pathways involved in the inhibition of astrocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95, 2592-6.

Krygiel S, Djakiew D. The neurotrophin receptor p75^{NTR} is a tumor suppressor in human prostate cancer. *Anticancer Res.* 2001, 21, 3749-55.

Kumar S, Colussi PA. Prodomains adaptors-oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* 1999, 24, 1-4.

Kume T, Nishikawa H, Tomioka H, Katsuki H, Akaike A, Kaneko S, Maeda T, Kihara T, Shimohama S. p75-mediated neuroprotection by NGF against glutamate cytotoxicity in cortical cultures. *Brain Res.* 2000, 852, 279-89.

Kwon D, Choi C, Lee J, Kim KO, Kim JD, Kim SJ, Choi IH. Hydrogen peroxide triggers the expression of Fas/FasL in astrocytoma cell lines and augments apoptosis. *J Neuroimmunol.* 2001, 113, 1-9.

Kwon B, Youn BS, Kwon BS. Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 1999, 11, 340-5.

L

Lachyankar MB, Condon PJ, Daou MC, De AK, Levine JB, Obermeier A, Ross AH. Novel functional interactions between Trk kinase and p75 neurotrophin receptor in neuroblastoma cells. *J Neurosci Res.* 2003, 71, 157-72.

Ladiwala U, Lachance C, Simoneau SJJ, Bhakar A, Barker PA, Antel JP. P75 neurotrophin receptor expression on adult human oligodendrocytes: signaling without cell death in response to NGF. *J Neurosci.* 1998, 18, 1297-304.

Lambert C, Landau AM, Desbarats J. Fas-Beyond Death: A regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis.* 2003, 8, 551-62.

Lanvin O, Guglielmi P, Fuentes V, Gouilleux-Gruart V, Maziere C, Bissac E, Regnier A, Benlagha K, Gouilleux F, Lassoued K. TGF-beta1 modulates Fas (APO-1/CD95)-mediated apoptosis of human pre-B cell lines. *Eur. J. Immunol.* 2003, 33, 1372-81.

Large TH, Weskamp G, Helder JC, Radeke MJ, Misko TP, Shooter EM, Reichardt LF. Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system. *Neuron.* 1989, 2, 1123-34.

Lautrette C, Cardot PJ, Vermot-Desroches C, Wijdenes J, Jauberteau MO, Battu S. Sedimentation field flow fractionation purification of immature neural cells from a human tumor neuroblastoma cell line. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003, 791, 149-60.

Lautrette C, Giraud S, Vermot-Desroches C, Preud'homme JL, Jauberteau MO. Expression of a functional Fas death receptor by human foetal motoneurons. *Neuroscience.* 2003, 119, 377-85.

Lavicka J, Sarissky M, Mirossay A, Sulla I, Mojzisz J, Mirossay L. Diazepam enhances etoposide-induced cytotoxicity in U-87 MG human glioma cell line. *Fundam clin Pharmacol.* 2001, 15, 201-7.

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 2001, 294, 1945-8.

Lee SJ, Zhou T, Choi C, Wang Z, Benveniste EN. Differential regulation and function of Fas expression on glial cells. *J. Immunol.* 2000, 164, 1277-85.

Lee SW, Park Y, Yoo JK, Choi SY, Sung YC. Inhibition of TCR-induced CD8 T cell death by IL-12: regulation of Fas ligand and cellular FLIP expression and caspase activation by IL-12. *J. Immunol.* 2003, 170, 2456-60.

Leenstra S, Das PK, Troost D, de Boer OJ, Bosch DA. Human malignant astrocytes express macrophage phenotype. *J Neuroimmunol.* 1995, 56, 17-25.

Lemke G, Chao MV. Axons regulate Schwann cell expression of the major myelin and NGF receptor genes. *Development.* 1988, 102, 499-504.

Lemke G. Glial control of neuronal development. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001, 24, 87-105.

Lenczowski JM, Dominguez L, Eder AM, King LB, Zacharchuk CM, Ashwell JD. Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17, 170-81.

Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987, 237, 1154-62.

Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lect.* 1966, 60, 217-59.

Li HL, Zhu H, Xu CJ, Yuan JY. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998, 94, 491-501.

Lidington EA, Moyes DL, McCormack AM, Rose ML. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl. Immunol.* 1999, 7, 239-46.

Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature.* 1989, 341, 149-52.

Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* 1997, 16, 4999-5005.

Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjo BK, Persson H. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, 89, 648-52.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian. *Biology. Cell.* 2001, 104, 487-501.

Loeb DM, Stephens RM, Copeland T, Kaplan DR, Greene LA. A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C-gamma 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 1994, 269, 8901-10.

Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 1990, 61, 351-9.

Longthorne VL, Williams GT. Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Embo J.* 1997, 16, 3805-12.

Lopez E, Ferrer I. Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the Fas/Fas-L-caspase-8 signaling pathway. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 2000, 85, 61-67.

Low W, Smith A, Ashworth A, Collins M. JNK activation is not required for Fas-mediated apoptosis. *Oncogene.* 1999, 18, 3737-41.

Lucero HA, Robbins PW. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys.* 2004, 426, 208-24.

Luo L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature Rev Neurosci.* 2000, 1, 173-80.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998, 94, 481-90.

M

Ma Y, Yang D, Chen Y. Analysis of TRAIL receptor expression using anti-TRAIL death receptor-5 monoclonal antibodies. *Chin Med J*. 2003, 116, 947-50.

Mac Phee I, Barker PA. Extended ceramide exposure activates the TrkA receptor by increasing receptor homodimer formation. *J Neurochem*. 1999, 72, 1423-30.

Maggirwar SB, Sarmiere PD, Dewhurst S, Freeman RS. Nerve growth factor-dependent activation of NF- κ B contributes to survival of sympathetic neurons. *J Neurosci*. 1998, 18, 10356-65.

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.

Majdan M, Lachance C, Gloster A, Aloyz R, Zeindler C, Bamji S, Bhakar A, Belliveau D, Fawcett J, Miller FD, Barker PA. Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. *J Neurosci*. 1997, 17, 6988-98.

Mallett S, Fossum S, Barclay AN. Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes a molecule related to nerve growth factor receptor. *Embo J*. 1990, 9, 1063-8.

Mandal M, Maggirwar SB, Sharma N, Kaufmann SH, Sun SC, Kumar R. Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF- κ B signaling pathway. *J Biol Chem*. 1996, 271, 30354-9.

Marchetti P, Hirsch T, Zamzami N, Castedo M, Decaudin D, Susin SA, Masse B, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.* 1996, 157, 4830-6.

Marconi A, Terracina M, Fila C, Franchi J, Bonte F, Romagnoli G, Maurelli R, Failla CM, Dumas M, Pincelli C. Expression and function of neurotrophins and their receptors in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2003, 121, 1515-21.

Mariani SM, Krammer PH. Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur J Immunol.* 1998, 28, 1492-8.

Marsters SA, Pitti RA, Sheridan JP, Ashkenazi A. Control of apoptosis signaling by Apo2 ligand. *Recent Prog Horm Res.* 1999, 54, 225-34.

Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol.* 1997, 7, 1003-6.

Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 4345-9.

Martinou I, Desagher S, Eskes R, Antonsson B, Andre E, Fakan S, Martinou JC. The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J Cell Biol.* 1999, 144, 883-9.

Matsumoto K, Wada RK, Yamashiro JM, Kaplan DR, Thiele CJ. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1995, 55, 1798-06.

Meylan E, Martinon F, Thome M, Gschwendt M, Tschopp J. RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep.* 2002, 3, 1201-08.

Meakin SO, MacDonald JIS, Gryz EA, Kubu CJ, Verdi JM. The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA. A model for discriminating proliferation and differentiation. *J Biol Chem.* 1999, 274, 9861-70.

Meakin SO, Shooter EM. Molecular investigations on the high-affinity nerve growth factor receptor. *Neuron.* 1991, 6, 153-63.

Mendell LM, Albers KM, Davis BM. Neurotrophins, nociceptors, and pain. *Microsc Res Tech.* 1999, 45, 252-61.

Michaelson JS. The Daxx enigma. *Apoptosis.* 2000, 5, 217-20.

Michaelson JS, Bader D, Kuo F, Kozak C, Leder P. Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev.* 1999, 13, 1918-23.

Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I - mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003, 114, 181-90.

Middlemas DS, Lindberg RA, Hunter T. TrkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol.* 1991, 11, 143-53.

Milne DM, Campbell LE, Campbell DG, Meek DW. P53 is phosphorylated *in vitro* and *in vivo* by an ultraviolet radiation-induced protein kinase characteristic of the c-Jun kinase, JNK1. *J Biol Chem.* 1995, 270, 5511-8.

Miossec C, Dutilleul V, Fassy F, Diu-Hercend A. Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 13459-62.

Mischel PS, Smith SG, Vining ER, Valletta JS, Mobley WC, Reichardt LF. The extracellular domain of p75^{NTR} is necessary to inhibit neurotrophin-3 signaling through TrkA. *J Biol Chem.* 2001, 276, 11294-301.

Mitsiades N, Poulaki V, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, Stamenkovic I. Thyroid carcinoma cells are resistant to Fas-mediated apoptosis but sensitive tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res.* 2000, 60, 4122-9.

Mongkolsapaya J, Grimes JM, Chen N, Xu XN, Stuart DI, Jones EY, Screaton GR. Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat Struct Biol.* 1999, 6, 1048-53.

Movsesyan VA, Yakovlev AG, Dabaghyan EA, Stoica BA, Faden AI. Ceramide induces neuronal apoptosis through the caspase-9/caspase-3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, 299, 201-7.

Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF, Petrecca K, Fawcett JP, Seidah NG, Morris SJ, Sossin WS, Murphy RA. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 1999, 19, 2069-80.

Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, Suvanto P, Hanaoka T, Li Y, Irie S, Greene LA, Sato TA. NADE, a p75^{NTR}-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75^{NTR}. *J Biol Chem.* 2000, 275, 17566-70.

Muschen M, Warskulat U, Beckmann MW. Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *J Mo. Med.* 2000, 78, 312-25.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell.* 1996, 85, 817-27.

N

Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 1995, 267, 1449-56.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997, 88, 355-65.

Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol. Cell. Biol.* 1994, 14, 759-67.

Newton K, Strasser A. Caspases signal not only apoptosis but also antigen-induced activation in cells of the immune system. *Genes Dev.* 2003, 17, 819-25.

Nichols A, Martinou I, Maundrell K, Martinou JC. The p75 neurotrophin receptor: effects on neuron survival *in vitro* and interaction with death domain-containing adaptor proteins. *Apoptosis.* 1998, 3, 289-94.

Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in clinical diagnostics: pathophysiology and laboratory investigation. *Clinica Chimica Acta.* 2005, 352, 49-74.

Nykjaer A, Willnox TE, Petersen CM. p75^{NTR} – live or let die. *Curr Op Neurobiol.* 2005, 15, 49-57.

Nzang Nguema G, Boghossian S, Dardevet D, Grizard J, Alliot J. Effect of treatment with dexamethasone on protein intake in adult and old Lou/c/jall rats. *Mech Ageing Dev.* 2005, 126, 655-63.

O

Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, Ponstingl H, Krammer PH. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 10709-15.

Okamoto CT. Endocytosis and transcytosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998, 29, 215-28.

O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 1997, 20, 252-8.

Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 2000, 14, 453-501.

O'Reilly LA, Divisekera U, Newton K, Scalzo K, Kataoka T, Puthalakath H, Ito M, Huang DC, Strasser A. Modifications and intracellular trafficking of FADD/MORT1 and caspase-8 after stimulation of T lymphocytes. *Cell Death Differ.* 2004, 11, 724-36.

Orlinick JR, Vaishnav A, Elkon KB, Chao MV. Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 28889-94.

Orlinick JR, Vaishnav AK, Elkon KB. Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int Rev Immunol.* 1999, 18, 293-308.

Ozawa T, Wang J, Hu LJ, Bollen AW, Lamborn KR, Deen DF. Growth of human glioblastomas as xenografts in the brains of athymic rats. *In vivo.* 2002, 16, 55-60.

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* 1999, 401, 82-5.

Ozoren N, El-Deiry WS. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia.* 2002, 4, 551-7.

Ozoren N, Kim K, Burns TF, Dicker DT, Moscioni AD, El-Deiry WS. The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res.* 2000, 60, 6259-65.

P

Pan GH, Bauer JH, Haridas V, Wang S, Liu D, Yu G, Vincenz C, Aggarwal BB, Ni J, Dixit VM. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett.* 1998b, 431, 351-6.

Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*. 1997, 277, 815-8.

Pang L, Sawada T, Decker SJ, Saltiel AR. Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J Biol Chem*. 1995, 270, 13585-88.

Pap M, Cooper GM. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*. 1998, 273, 19929-32.

Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem*. 1999, 274, 38241-50.

Park C, Sakamaki K, Tachibana O, Yamashima T, Yamashita J, Yonehara S. Expression of Fas antigen in the normal mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, 252, 623-8.

Park DS, Morris EJ, Greene LA, Geller HM. G1/S cell cycle blockers and inhibitors of cyclin-dependent kinases suppress camptothecin-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci*. 1997, 17, 1256-70.

Park DS, Morris EJ, Padmanabhan J, Shelanski ML, Geller HM, Greene LA. Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents. *J Cell Biol*. 1998, 143, 457-67.

Park JA, Lee JY, Sato TA, Koh JY. Co-induction of p75^{NTR} and p75^{NTR}-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat. *J Neurosci*. 2000, 20, 9096-103.

Parton RG. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol*. 1996, 8, 542-8.

Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol*. 2001, 11, 272-80.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*. 1982.

Pinkoski MJ, Green DR. Fas ligand, death gene. *Cell Death Differ.* 1999, 6, 1174-81.

Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature.* 1998, 396, 699-703.

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.

Pollack IF, Erff M, Ashkenazi A. Direct Stimulation of Apoptotic Signaling by Soluble Apo2L/Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Leads to Selective Killing of Glioma Cells. *Clin Can Res.* 2001, 7, 1362-9.

Pouly S, Becher B, Blain M, Antel JP. Interferon-gamma modulates human oligodendrocyte susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000, 4, 280-6.

Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, Sundaresan T, Pastorino S, Park JK, Mikolaenko I, Maric D, Eberhart CG, Fine HA. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res.* 2005, 65, 2353-63.

R

Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science.* 1993, 261, 345-8.

Rajcan-Separovic E, Liston P, Lefebvre C, Korneluk RG. Assignment of human inhibitor of apoptosis protein (IAP) genes xiap, hiap-1, and hiap-2 to chromosomes Xq25 and 11q22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 1996, 37, 404-6.

Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Tough TW, Alderson MR, Lynch DH. *gld/gld* mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur. J. Immunol.* 1994, 24, 928-33.

Rana A, Gallo K, Godowski P, Hirai SI, Ohno S, Zon L, Kyriakis JM, Avruch J. The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress-activated protein kinase activator, SEK-1. *J Biol Chem.* 1996, 271, 19025-8.

Raoul C, Henderson CE, Pettmann B. Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *J. Cell. Biol.* 1999, 147, 1049-62.

Ren B, Chee KJ, Kim TH, Maniatis T. PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. *Genes Dev.* 1999, 13, 125-37.

Rensing-Ehl A, Malipiero U, Irmeler M, Tschopp J, Constam D, Fontana A. Neurons induced to express major histocompatibility complex class I antigen are killed via the perforin and not the Fas (APO-1/CD95) pathway. *Eur. J. Immunol.* 1996, 26, 2271-4.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 1998, 391, 79-82.

Rieger J, Naumann U, Glaser T, Ashkenazi A, Weller M. APO2 ligand: a novel lethal weapon against malignant glioma? *FEBS Letters.* 1998, 427, 124-28.

Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science.* 1995, 268,1347-9.

Riffkin CD, Gray AZ, Hawkins CJ, Chow CW, Ashley DM. Ex vivo pediatric brain tumors express Fas (CD95) and FasL (CD95L) and are resistant to apoptosis induction. *Neuro-oncol.* 2001, 3, 229-40.

Robe PA, Nguyen-Khac M, Jolois O, Rogister B, Merville MP, Bours V. Dexamethasone inhibits the HSV-tk/ganciclovir bystander effect in malignant glioma cells. *BMC Cancer.* 2005, 5, 32.

Rochat-Steiner V, Becker K, Micheau O, Schneider P, Burns K, Tschopp J. FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD

phosphorylation and inhibits Fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J Exp Med.* 2000, 192, 1165-74.

Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Gotz 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.

Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature.* 1994, 370, 527-32.

Rohn JL, Hueber AO, McCarthy NJ, Lyon D, Navarro P, Burgering BM, Evan GI. The opposing roles of the Akt and c-Myc signalling pathways in survival from CD95-mediated apoptosis. *Oncogene.* 1998, 17, 2811-8.

Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature.* 1999, 401, 86-90.

Ross GM, Shamovsky IL, Lawrance G, Solc M, Dostaler SM, Weaver DF, Riopelle RJ. Reciprocal modulation of TrkA and p75^{NTR} affinity states is mediated by direct receptor interactions. *Eur J Neurosci.* 1998, 10, 890-8.

Roth W, Isenmann S, Naumann U, Kugler S, Bahr M, Dichgans J, Ashkenazi A, Weller M. Locoregional Apo2L/TRAIL eradicates intracranial human malignant glioma xenografts in athymic mice in the absence of neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 265, 479-83.

Rotolo JA, Zhang J, Donepudi M, Lee H, Fuks Z, Kolesnick R. Caspase-dependent and -independent Activation of Acid Sphingomyelinase Signaling. *J Biol Chem.* 2005, 280, 26425-34.

Roue G, Lancry L, Duquesne F, Salaun V, Troussard X, Sola B. Upstream mediators of the Fas apoptotic transduction pathway are defective in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk res.* 2001, 25, 967-80.

Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.* 2002, 67, 203-33.

Roux PP, Bhakar AL, Kennedy TE, and Barker PA. The p75 neurotrophin receptor activates Akt (Protein Kinase B) through a phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2001, 276, 23097-104.

Roux PP, Colicos MA, Barker PA, Kennedy TE. 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.

Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Font J, Izquierdo M, Lopez-Rivas A. Protein kinase C inhibits CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis by at least two different mechanisms in Jurkat T cells. *J Immunol.* 1999, 163, 4737-46.

Ruiz-Ruiz MC, Izquierdo M, de Murcia G, Lopez-Rivas A. Activation of protein kinase C attenuates early signals in Fas-mediated apoptosis. *Eur J Immunol.* 1997, 27, 1442-50.

Ruvolo PP. Ceramide regulates cellular homeostasis *via* diverse stress signalling pathways. *Leukemia.* 2001, 15, 1153-60.

S

Sabapathy K, Hu Y, Kallunki T, Schreiber M, David JP, Jochum W, Wagner EF, Karin M. JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Curr Biol.* 1999, 9, 116-25.

Sakai R, Henderson JT, O'Bryan JP, Elia AJ, Saxton TM, Pawson T. The mammalian ShcB and ShcC phosphotyrosine docking proteins function in the maturation of sensory and sympathetic neurons. *Neuron.* 2000, 28, 819-33.

Sakic B, Szechtman H, Denburg JA, Gorny G, Kolb B, Whishaw IQ. Progressive atrophy of pyramidal neuron dendrites in autoimmune MRL-lpr mice. *J Neuroimmunol.* 1998, 187, 162-70.

Sakuma H, Ikeda A, Oka S, Kozutsumi Y, Zanetta JP, Kawasaki T. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a new member of mixed lineage protein kinase from human brain. *J Biol Chem.* 1997, 272, 28622-9.

Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K. Delayed selective motor neuron death and Fas antigen induction after spinal cord ischemia in rabbits. *Brain Res.* 1998, 797, 23-8.

Salehi AH, Roux PP, Kubu CJ, Zeindler C, Bhakar A, Tannis LL, Verdi JM, Barker PA. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron.* 2000, 27, 279-88.

Salmena L, Lemmers B, Hakem A, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Au PY, Berry DM, Tambllyn L, Shehabeldin A, Migon E, Wakeham A, Bouchard D, Yeh WC, McGlade JC, Ohashi PS, Hakem R. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev.* 2003, 17, 883-95.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999, 96, 10964-7.

Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med.* 2005, 353, 811-22.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977, 74, 5463-7.

Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughlin M, Cordon-Cardo C, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell.* 1996, 86, 189-99.

Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.* 2001, 2, 20-9.

Sasaki H, Yoshida K, Ikeda E, Asou H, Inaba M, Otani M, Kawase T. Expression of the neural cell adhesion molecule in astrocytic tumors: an inverse correlation with malignancy. *Cancer*. 1998, 82, 1921-31.

Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC. FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science*. 1995, 268, 411-5.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*. 1998, 17, 1675-87.

Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, Lee A, Rice GC, Wong GH, Gatanaga T, Granger GA, Lentz R, Raab H. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell*. 1990, 61, 361-70.

Scheel-Toellner D, Wang K, Singh R, Majeed S, Raza K, Curnow SJ, Salmon M, Lord JM. The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002, 297, 876-9.

Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell. Death. Differ*. 1998, 5, 372-80.

Schweigerer L, Breit S, Wenzel A, Tsunamoto K, Ludwig R, Schwab M. Augmented MYCN expression advances the malignant phenotype of human neuroblastoma cells: evidence for induction of autocrine growth factor activity. *Cancer Res*. 1990, 50, 4411-6.

Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ, Bell JI. TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol*. 1997, 7, 693-6.

Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci*. 1996, 19, 463-89.

Seilheimer B, Schachner M. Regulation of neural cell adhesion molecule expression on cultured mouse Schwann cells by nerve growth factor. *EMBO J*. 1987, 6, 1611-6.

Shamovsky IL, Ross GM, Riopelle RJ, Weaver DF. The interaction of neurotrophins with the p75^{NTR} common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study. *Protein Sci.* 1999, 8, 2223-33.

Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell. Biol.* 2002, 4, 131-6.

Shaw M, Cohen P, Alessi DR. Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216. *FEBS Lett.* 1997, 416, 307-11.

Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science.* 1997, 277, 818-21.

Shimada K, M Nakamura, E Ishida, M Kishi, S Yonehara, and N Konishi. C-JunNH2-terminal kinase-dependent Fas activation contributes to etoposide-induced apoptosis in p53-mutated prostate cancer cells. *Prostate.* 2003, 55, 265-80.

Shimohama S, Ogawa N, Tamura Y, Akaike A, Tsukahara T, Iwata H, Kimura J. Protective effect of nerve growth factor against glutamate-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res.* 1993, 632, 296-302.

Shinohara H, Yagita H, Ikawa Y, Oyaizu N. Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal regulated kinase. *Cancer Res.* 2000, 60, 1766-72.

Shinohara H, Kayagaki N, Yagita H, Oyaizu N, Ohba M, Kuroki T, Ikawa Y. A protective role of PKCepsilon against TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 284, 1162-7.

Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science.* 2000, 288, 2354-7.

Silverman N, Maniatis T. NF κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* 2001, 15, 2321-42.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000, 1, 31-9.

Singer HS, Hansen B, Martinie D, Karp CL. Mitogenesis in glioblastoma multiforme cell lines: a role for NGF and its TrkA receptors. *J Neurooncol.* 1999, 45, 1-8.

Sinha S, Bastin ME, Wardlaw JM, Armitage PA, Whittle IR. Effects of dexamethasone on peritumoural oedematous brain: a DT-MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004, 75, 1632-5.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999, 6, 1067-74.

Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, Dower SK, Cosman D, and Goodwin RG. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science.* 1990, 248, 1019-23.

Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell.* 1994, 77, 627-38.

Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci.* 2001, 24, 1217-81.

Song HJ, Poo MM. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr Opin Neurobiol.* 1999, 9, 355-63.

Song K, Chen Y, Goke R, Wilmen A, Seidel C, Goke A, Hilliard B, Chen Y. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med.* 2000, 191, 1095-104.

Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, Glass DJ, Masiakowski P, Furth ME, Valenzuela DM, DiStefano PS, Yancopoulos GD. TrkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell.* 1991, 65, 885-93.

Stamenkovic I, Clark EA, Seed BA B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *Embo J.* 1989, 8, 1403-10.

Strakova N, Ehrmann J, Bartos J, Malikova J, Dolezel J, Kolar Z. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) agonists affect cell viability, apoptosis and expression of cell cycle related proteins in cell lines of glial brain tumors. *Neoplasma.* 2005, 52, 126-36.

Strater J, Moller P. Expression and function of death receptors and their natural ligands in the intestine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000, 915, 162-70.

T

Takahashi M, Mukai H, Toshimori M, Miyamoto M, Ono Y. Proteolytic activation of PKN by caspase-3 or related protease during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95, 11566-71.

Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Yamaguchi N, Yagita H, Okumura K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol.* 2001, 214, 194-200.

Takimoto R, El-Deiry WS. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene.* 2000, 19, 1735-43.

Tanaka T, Mizuno K, Miyama M, Chang L, Chen H, Ohtaki S, Umesaki N, Ogita S. Enhanced Fas/CD95-mediated apoptosis by epidermal growth factor in human endometrial epithelial cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999, 86, 189-94.

Tani E, Kitagawa H, Ikemoto H, Matsumoto T. Proteasome inhibitors induce Fas-mediated apoptosis by c-Myc accumulation and subsequent induction of FasL message in human glioma cells. *FEBS Lett.* 2001, 504, 53-8.

Taniuchi M, Clark HB, Johnson EM Jr. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986, 83, 4094-8.

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. 1993, 74, 845-53.

Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med*. 2000, 6, 529-35.

Tepper AD, Ruurs P, Borst J, Van Blitterswijk WJ. Effect of overexpression of a neutral sphingomyelinase on CD95-induced ceramide production and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001, 280, 634-9.

Tews DS. Adhesive and invasive features in gliomas. *Pathol Res Pract*. 2000, 196, 701-11.

Thome M, Tschopp J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol*. 2001, 1, 50-8.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases : enemies within. *Science*. 1998, 281, 1312-6.

Tibbles LA, Ing YL, Kiefer F, Chan J, Iscove N, Woodgett JR, Lassam NJ. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *EMBO J*. 1996, 15, 7026-35.

Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*. 1994, 8, 1224-34.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev*. 1995, 5, 571-6.

Torii S, Egan DA, Evans RA, Reed JC. Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *Embo J*. 1999, 18, 6037-49.

Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*. 1989, 245, 301-5.

Tsoufias P, Soppet D, Escandon E, Tessarollo L, Mendoza-Ramirez JL, Rosenthal A, Nikolics K, Parada LF. The rat *trkC* locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC12 cells. *Neuron*. 1993, 10, 975-90.

U

Ulrich E, Duwel A, Kauffmann-Zeh A, Gilbert C, Lyon D, Rudkin B, Evan G, Martin-Zanca D. Specific TrkA survival signals interfere with different apoptotic pathways. *Oncogene*. 1998, 16, 825-32.

Urfer R, Tsoufias P, O'Connell L, Hongo JA, Zhao W, Presta LG. High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. *J Biol Chem*. 1998, 273, 5829-40.

V

Valenzuela DM, Maisonpierre PC, Glass DJ, Rojas E, Nunez L, Kong Y, Gies DR, Stitt TN, Ip NY, Yancopoulos GD. Alternative forms of rat TrkC with different functional capabilities. *Neuron*. 1993, 10, 963-74.

Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, and Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*. 1997, 91, 627-37.

Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*. 2000, 346, 561-76.

Van Noesel MM, van Bezouw S, Salomons GS, Voute PA, Pieters R, Baylin SB, Herman JG, Versteeg R. Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res*. 2002, 62, 2157-61.

Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D. Targeted disruption of the mouse Caspase-8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*. 1998, 2, 267-76.

Vega JA, Garcia-Suarez O, Germana A. Vertebrate thymus and the neurotrophin system. *Int Rev Cytol*. 2004, 237, 155-204.

Venkatakrishnan G, McKinnon CA, Pilapil CG, Wolf DE, Ross AH. Nerve growth factor receptors are preaggregated and immobile on responsive cells. *Biochemistry*. 1991, 30, 2748-53.

Venkataraman K, Futerman AH. Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems. *Trends Cell Biol*. 2000, 10, 408-12.

Verdi JM, Birren SJ, Ibanez CF, Persson H, Kaplan DR, Benedetti M, Chao MV, Anderson DJ. p75LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron*. 1994, 12, 733-45.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000, 102, 43-53.

Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*. 1996, 380, 75-9.

Vesa J, Kruttgen A, Shooter EM. p75 reduces TrkB tyrosine autophosphorylation in response to brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 4/5. *J Biol Chem*. 2000, 275, 24414-20.

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 U S A*. 1991, 88, 5650-4.

Von Bartheld CS, Williams R, Lefcort F, Clary DO, Reichardt LF, Bothwell M. Retrograde transport of neurotrophins from the eye to the brain in chick embryos: roles of the p75^{NTR} and trkB receptors. *J Neurosci.* 1996, 16, 2995-3008.

W

Wajant H, Haas E, Schwenzler R, Muhlenbeck F, Kreuz S, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 24357-66.

Wajant H, Henkler F, Scheurich P. The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal.* 2001, 13, 389-400.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2003, 14, 53-66.

Walczak H, Bouchon A, Stahl H, Krammer PH. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells. *Cancer Res.* 2000, 60, 3051-7.

Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat Med.* 1999, 5, 157-63.

Wang H, Li M, Rinehart JJ, Zhang R. Pretreatment with dexamethasone increases antitumor activity of carboplatin and gemcitabine in mice bearing human cancer xenografts: *In vivo* activity, pharmacokinetics, and clinical implications for cancer chemotherapy. *Clinical cancer research.* 2004, 10, 1633-1644.

Wang JJ, Rabizadeh S, Tasinato A, Sperandio S, Ye X, Green M, Assa-Munt N, Spencer D, Bredesen DE. Dimerization-dependent block of the proapoptotic effect of p75(NTR). *J Neurosci Res.* 2000, 60, 587-93.

Wang X, Bauer JH, Li Y, Shao Z, Zetoune FS, Cattaneo E, Vincenz C. Characterization of a p75^{NTR} apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *J Biol Chem.* 2001, 276, 33812-20.

Waschek JA, Muller JM, Duan DS, Sadee W. Retinoic acid enhances VIP receptor expression and responsiveness in human neuroblastoma cell, SH-SY5Y. *FEBS Lett.* 1989, 250, 611-4.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* 1992, 356, 314-7.

Westwick JK, Bielawska AE, Dbaiibo G, Hannun YA, Brenner DA. Ceramide activates the stress-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1995, 270, 22689-92.

Whiteside TL. Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin. Cancer Biol.* 2002, 12, 43-50.

Widmann C, Gerwins P, Johnson NL, Jarpe MB, Johnson GL. MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1998, 18, 2416-29.

Widmann C, Johnson NL, Gardner AM, Smith RJ, Johnson GL. Potentiation of apoptosis by low dose stress stimuli in cells expressing activated MEK kinase 1. *Oncogene.* 1997, 15, 2439-47.

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 1995, 3, 673-82.

Wilhelm S, Wagner H, Hacker G. Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells. *Eur J Immunol.* 1998, 28, 891-900.

Wilson DJ, Alessandrini A, Budd RC. MEK1 activation rescues Jurkat T cells from Fas-induced apoptosis. *Cell Immunol.* 1999, 194, 67-77.

Wolff JE, Molenkamp G, Hotfilder M, Lathera J. Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures in vitro and angiogenesis *in vivo*. *Klin Padiatr.* 1997, 209, 275-7.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980, 284, 555-6.

Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol.* 1984, 142, 67-77.

X

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 Z, Maroney AC, Dobrzanski P, Kukekov NV, Greene LA. The MLK family mediates c-Jun N-terminal kinase activation in neuronal apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2001, 21, 4713-24.

Y

Yaar M, Zhai S, Pilch PF, Doyle SM, Eisenhauer PB, Fine RE, Gilchrist BA. Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *J Clin Invest.* 1997, 100, 2333-40.

Yamada M, Ohnishi H, Sano S, Nakatani A, Ikeuchi T, Hatanaka H. Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with

phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J Biol Chem.* 1997, 272, 30334-9.

Yamaguchi H, Ukita H, Murakami H, Chiba S, Oshima Y, Ogata A, Ikeda M, Matsumoto A, Satone A, Ide W, Hashimoto I, Kamada H. Induction of apoptosis through NGF/p75^{NTR} in human glioma cells treated with propentofylline. *No To Shinkei.* 1998, 50, 407-14.

Yamashiro DJ, Nakagawara A, Ikegaki N, Liu XG, Brodeur GM. Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas. *Oncogene.* 1996, 12, 37-41.

Yamashita T, Tucker KL, Barde YA. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron.* 1999, 24, 585-93.

Yan H, Chao MV. Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J Biol Chem.* 1991, 266, 12099-104.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997, 275, 1129-32.

Yang X, Khosravi-Far R, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell.* 1997, 89, 1067-76.

Yang X, Merchant MS, Romero ME, Tsokos M, Wexler LH, Kontny U, Mackall CL, Thiele CJ. Induction of caspase 8 by interferon gamma renders some neuroblastoma (NB) cells sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but reveals that a lack of membrane TR1/TR2 also contributes to TRAIL resistance in NB. *Cancer Res.* 2003, 63, 1122-9.

Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science.* 1995, 267, 2003-6.

Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, Shin H, Wang JJ, Leo E, Zapata J, Hauser CA, Reed JC, Bredesen DE. TRAF family proteins interact with the

common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem.* 1999, 274, 30202-8.

Yeaman C, Le Gall AH, Baldwin AN, Monlauzeur L, Le Bivic A, Rodriguez-Boulan E. The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J. Cell. Biol.* 1997, 139, 929-40.

Yeo TT, Chua-Couzens J, Butcher LL, Bredesen DE, Cooper JD, Valletta JS, Mobley WC, Longo FM. Absence of p75^{NTR} causes increased basal forebrain cholinergic neuron size, choline acetyltransferase activity, and target innervation. *J Neurosci.* 1997, 17, 7594-605.

Yi FH, Lautrette C, Vermot-Desroches C, Bordessoule D, Couratier P, Wijdenes J, Preud'homme JL, Jauberteau MO. In vitro induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 2000, 109, 211-20.

Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 1989, 169, 1747-56.

Yoon SO, Casaccia-Bonofil P, Carter B, Chao MV. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci.* 1998, 18, 3273-81.

Yu PW, Huang BC, Shen M, Quast J, Chan E, Xu X, Nolan GP, Payan DG, Luo Y. Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB. *Curr Biol.* 1999, 9, 539-42.

Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2004, 23, 9392-400.

Z

Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J.* 1990, 9, 3545-50.

Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 1996, 183, 1533-44.

Zarate JO, Sampaolesi R. Pleomorphic xanthoastrocytoma of the retina. *Am J Surg Pathol.* 1999, 23, 79-81.

Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature.* 1998, 392, 296-300.

Zhang H, Xu Q, Krajewski S, *et al.* BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000, 97, 2597-602.

Zhang XD, Franco AV, Nguyen T, Gray CP, Hersey P. Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J Immunol.* 2000, 164, 3961-70.

Zhao SP, Zhou XF. Co-expression of trkA and p75 neurotrophin receptor in extracranial olfactory neuroblastoma cells. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2002, 28, 301-7.

Zhu HL, Wang YZ, Yu L, Li B, Yao SQ, and Lou FD. The expression of Fas, FasL and Bcl-2 on RMA cells during the process of apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2002, 10, 35-9.

Zhou XF, Rush RA. Localization of neurotrophin-3-like immunoreactivity in peripheral tissues of the rat. *Brain Res.* 1993, 621, 189-99.

Zhu HL, Wang YZ, Yu L, Li B, Yao SQ, Lou FD. The expression of Fas, FasL and Bcl-2 on RMA cells during the process of apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2002, 10, 35-9.

Zibera C, Gibelli N, Butti G, Pedrazzoli P, Carbone M, Magrassi L, Robustelli della Cuna G. Proliferative effect of dexamethasone on a human glioblastoma cell line (HU 197) is mediated by glucocorticoid receptors. *Anticancer Res.* 1992, 12, 1571-4.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 11549-56.

Zupan AA, Osborne PA, Smith CE, Siegel NR, Leimgruber RM, Johnson EM Jr. Identification, purification, and characterization of truncated forms of the human nerve growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1989, 264, 11714-20.

Annexes

Publication 1 - Expression of a functional Fas death receptor
by human foetal motoneurons.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00034-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00034-4)

Publication 2 - Modulation of Fas-induced apoptosis by p75
neurotrophin receptor in a human neuroblastoma cell line.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10495-005-2649-6>

Publication 3 - *In vitro* apoptotic induction of human glioblastoma cells by Fas Ligand *plus* etoposide and *in vivo* antitumor activity of combined drugs in xenografted nude rats.

Publication 4 - P75 neurotrophin receptor is sequestered in
Golgi apparatus of U-87 MG cell line

**P75 neurotrophin receptor is sequestered in Golgi apparatus of
human glioblastoma cell line**

Stéphanie Giraud, Barbara Bessette,
Muriel Mathonnet and Marie-Odile Jauberteau

**EA 3842, Homéostasie cellulaire et pathologies, University Hospital,
87042 Limoges, France**

Corresponding author: M.O.Jauberteau, M.D, Ph.D, Laboratory of Immunology, University
Hospital, 2 avenue Martin Luther King, 87042 Limoges, France.

Phone: (33) 555 435 868, fax: (33) 555 435 916, e-Mail: jauberte@unilim.fr

Running title: P75^{NTR} is sequestered in Golgi apparatus

Abstract

P75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) is a cell surface receptor that can induce apoptosis in many cell types. This receptor has a major role in central nervous system development and is still expressed in some adult brain cells. Its implication in cell apoptosis or survival is probably of major importance in cellular homeostasis and thus p75^{NTR} could be implicated in tumour resistance to death. In this report, we investigated the intracellular expression of p75^{NTR} in cells from a human glioblastoma cell line. Indeed, detection of p75^{NTR} receptor in Golgi apparatus by immunofluorescence microscopy could be correlated with a decrease of cell apoptosis, leading cells to become tumorous. This hypothesis is supported by a loss of ligand-induced apoptosis in this cell line. These observations show that p75^{NTR} can be sequestered in the Golgi complex and could then be, in part, responsible for the cell resistance to apoptosis and for brain tumour formation.

Keywords

P75^{NTR} receptor, Golgi apparatus, glioblastoma