

UNIVERSITÉ DE LIMOGES
École Doctorale Bio-Santé (ED 524)
Équipe d'Accueil 3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies

Thèse pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Sciences de la vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie-Oncologie

Présentée et soutenue par

ABBACI Amazigh

Le 25 septembre 2017

**Caractérisation fonctionnelle du récepteur de type 2 de la
neurotensine dans la résistance à la mort cellulaire des
lymphocytes B au cours de la leucémie lymphoïde chronique**

Thèse co-dirigée par : **Pr Marie-Odile JAUBERTEAU** et **Pr Anne-Laure FAUCHAIS**

JURY :

Président du jury

Pr Arnaud JACCARD, PU-PH, CNRS-UMR 7276, Université de Limoges

Rapporteurs

Pr Bach Nga PHAM, PU-PH, EA 7319, Université de Reims-Champagne Ardennes

Dr Patricia FORGEZ, Chercheur Inserm, HDR, UMR-S INSERM 1007, Université
Paris Descartes

Examineurs

Pr Arnaud JACCARD, PU-PH, CNRS-UMR 7276, Université de Limoges

Pr Anne-Laure FAUCHAIS, PU-PH, EA3842, Université de Limoges

Invités

Pr Marie-Odile JAUBERTEAU, PU-PH, EA3842, Université de Limoges

Pr Marie-Hélène RATINAUD, PU émérite, EA3842, Université de Limoges

Dr Thomas NAVES, Chercheur Universitaire, EA3842, Université de Limoges



*À mes chers parents,
mes sœurs et mon frère,
je vous aime...*





*Nos Enfants sont des Oiseaux**

*C'est me mentir de te dire de ne pas partir
Plus loin encore où que tes ailes te pousseront
Tu souffriras, sais-tu ? Et te fera souffrir
Plus encore ta maman rivée à ton jupon
C'est te mentir de ne te voir voir de mes yeux
Les étoiles que tu hérites de mes iris verts
Tu te brûleras, je sais ! Mais ce n'est qu'aux feux
Que ton cœur ardent s'échappera des enfers
C'est se mentir que les enfants ne soient oiseaux
Même qu'on leur coupe les ailes et les mette en cage
Ils finiront par s'envoler de nos tombeaux*

...

Ne suis-je pas donc sous terre ? Fiston, bons nuages !

**A mon fils Amazigh.
Barek ABAS - 01 Octobre 2015*



Remerciements

Je tiens à exprimer en tout premier lieu ma reconnaissance aux membres du jury :

Aux rapporteurs : le **Pr Bach Nga PHAM** et le **Dr Patricia FORGEZ**, merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de m'avoir consacré de votre temps pour évaluer ce travail. Soyez assurées, Mesdames, de ma sincère gratitude et de mon plus profond respect.

Au **Pr Arnaud JACCARD** d'avoir accepté d'examiner cette thèse et de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Recevez, Monsieur le Professeur, toute mon estime et mes plus sincères remerciements.

À mes directrices de thèse les professeurs **Marie-Odile JAUBERTEAU** et **Anne-Laure FAUCHAIS**, qui m'ont fait l'honneur de co-encadrer ces travaux. Merci pour la confiance que vous m'avez témoigné, pour vos encouragements, idées, conseils et votre soutien. Merci de m'avoir encadré et de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans des conditions favorables. Merci pour votre présence durant les moments les plus difficiles. Je tiens à vous exprimer mon admiration pour votre enthousiasme et votre dynamisme sans faille. Sans vous rien n'aurait été possible. Un grand merci à vous deux pour tout.

Je tiens à remercier le **Pr Marie-Hélène RATINAUD** et le **Dr Thomas NAVES** de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury. Merci **Marie-Hélène** d'avoir cru en moi dès le début et de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer le monde de la recherche. **Thomas**, merci pour ta disponibilité, ton esprit critique et tes conseils scientifiques et humains. Merci pour ta bonne humeur, ton enthousiasme et pour toutes les connaissances que tu m'as transmises. Ce fût un très grand plaisir de travailler avec toi.

Merci à tous les cliniciens du **service d'hématologie clinique** du **CHU de Limoges** qui m'ont permis d'obtenir des échantillons de patients. Une pensée particulière et un grand merci à tous **les patients** qui ont participé à cette étude.

Je remercie également **la région Limousin**, **la ligue nationale contre le cancer** (comité départemental de la Haute-Vienne) et **le Comité d'Orientation de la Recherche en Cancérologie (CORC)** pour le soutien financier dont j'ai bénéficié pour effectuer ces travaux.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe EA3842 actuelle et à celles et ceux qui sont partis entre-temps qui m'ont accueilli avec tant de gentillesse et m'ont accompagné, soutenu, supporté, conseillé, aidé, amusé, vanné... au cours de cette belle aventure, et particulièrement :



Marie Hélène et Mireille (mes mamans de cœur), merci de m'avoir fait confiance dès le début et de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer cette équipe. Grâce à vous j'ai réussi à apprendre et à accomplir beaucoup plus durant les cours et les stages de Master 1 et 2. Merci de m'avoir donné la chance de faire mes preuves, d'affronter ce challenge et de m'avoir orienté sur la bonne voie. Merci de m'avoir transmis votre savoir, votre optimisme, votre expérience et votre sagesse. Depuis mon arrivée en France en 2010, vous étiez là pour moi, je vous suis très reconnaissant et je vous remercie de tout mon cœur pour votre présence, votre soutien, votre gentillesse et vos encouragements qui m'ont permis d'aller plus loin..

Fabrice, merci de m'avoir encadré dès le début en M1 et pour m'avoir expliqué et appris en détail la technique de la CAM (j'ai bien constaté que les poussins n'ont aucun secret pour vous ^^). Merci pour votre disponibilité et aide (même pendant vos vacances pour résoudre les problèmes statistiques de la publie). Merci pour votre gentillesse, vos critiques justifiées et vos conseils judicieux concernant mes travaux de thèse ainsi que durant mon expérience dans l'enseignement autant qu'ATER. Merci pour votre bonne humeur, vos blagues et les bons moments de rire. Merci de m'avoir fait découvrir le véritable gâteau creusois, un délice... et j'avoue ça cale bien !!

Danielle, François, Barbara, Gaëlle, Serge et Kim, votre disponibilité et vos conseils m'ont beaucoup apporté, votre générosité, votre sympathie et votre modestie sont exemplaires. Merci pour tous nos échanges aussi bien scientifiques que personnels. Un grand merci pour tout..

Thom (A fond loucaraiille !!), merci pour tout, tu es un excellent collègue mais avant tout un très bon ami. Merci pour ton aide et tes conseils en tous genres dès mon arrivée dans cette équipe. Merci pour ton esprit d'équipe et d'avoir été là pendant les moments difficiles de ma thèse. Je me souviendrais longtemps de toutes ces belles soirées et tous ces moments de partage en cuisine et de préparation de paëlla, de couscous etc... et de cette fameuse chute libre dans le jardin ^^. Merci également à toi *Nadine*, de nous avoir souvent supportés... merci pour ton accueil et ta gentillesse et gros bisous à *Nataleo* et *Elizio*.

Hugo (mon binôme), merci pour nos discussions et tes suggestions pour résoudre les différents problèmes, du western, de tri, de q-PCR, d'IP et tout le reste.... Merci pour ta compréhension, et d'avoir assuré les manip quand j'étais noyé dans les enseignements. Merci d'avoir supporté mon stress et je m'excuse d'avoir été mal aimable par moment. Merci d'avoir rien lâché et tout donné pour finir ce projet. Merci pour tes encouragements, tes conseils et ton aide précieuse durant les derniers mois de ma thèse. "Oncogene" on l'a fait, et ça été un grand plaisir de travailler avec toi. Bon courage pour la fin de ta thèse, et je te souhaite le meilleur sur le plan professionnel et personnel.



Claire, Merci pour ta bonne humeur et ton aide précieuse et avec beaucoup de sympathie en microscopie confocale. *Nolga*, merci pour ta disponibilité, ta serviabilité et ta gentillesse. Merci d'avoir accepté de nous prélever du sang à plusieurs reprises, ce qui nous a permis d'avoir des contrôles sains et de bien avancer le projet.

Philippe et Aurélie P, merci pour tout ce que vous faites pour le labo en assurant les bonnes conditions de travail à tout le monde. Merci d'avoir toujours trouvé des solutions pour mes "commandes urgentes" et j'avoue il y'en avait beaucoup. Merci pour votre disponibilité, votre gentillesse, et votre bonne humeur. Merci pour votre soutien et encouragements durant toutes ces années passées ensemble à l'EA3842.

Hafidha, ma collègue de route depuis le Master1, merci d'avoir été une super voisine de bureau. Merci pour ta gentillesse, ta serviabilité, ton aide, tes encouragements et ton soutien. *Marine*, bienvenue dans le groupe des lymphomes. Merci pour tes encouragements et ton soutien. Merci pour ta joie de vivre et ton sourire, ça été un grand plaisir de partager le bureau avec toi, ne change rien !! et bon courage pour "TrkB" et la suite de ta thèse. *Sabrina*, merci pour ta gentillesse, ta sympathie, et nos moments râleurs ^^ . Merci pour tes encouragements et bon courage pour la fin de ta thèse. Je reprends ta phase "ça va aller". *Sophie*, merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse, maintenant à chaque fois que je vois une licorne je pense automatiquement à toi ^^ . Bon courage pour ta soutenance qui approche à grand pas. *Aurélie L*, merci pour ta joie de vivre, ta bonne humeur, tes conseils et tes encouragements. J'attends toujours la partie tennis avec toi ^^ . *Amandine*, merci pour ta gentillesse et ton aide. Merci pour tes plugins imageJ et de m'avoir expliqué comment calculer les coefficients de Manders. Merci pour le séjour au plateau de Millevaches et de m'avoir initié à la pêche aux écrevisses. *Clément*, merci l'amé pour ta gentillesse et ta serviabilité, merci pour les bons moments partagés ensemble depuis notre Master 2 à Poitiers. Merci pour les moments de rires et surtout pour le week-end de ton « EVG », merci d'avoir partagé avec moi tes passions pour la pêche et la mécanique. La 406 se porte bien grâce à ton expérience et tes conseils ;). Merci aux (anciens) : *Hussein A, Soha, Carole, Romain, Sofiane et Lydie*, pour votre accueil, votre disponibilité et votre aide dès mon stage de Master 1. *Sofiane*, merci de m'avoir aidé sur ce projet dès le début de ma thèse. Merci également à toutes les personnes croisées dans le labo : *Mohamad, Safae, Elise, Alexandre, Ana....*

Lynda et Ludo, merci pour votre amitié, votre bonne humeur et votre gentillesse. Merci pour tous les bons moments partagés ensemble. *Flux*, merci pour les différents surnoms auxquels j'ai eu droit ;). Gros bisous à votre petite princesse *Sarah*. Je vous souhaite plein de bonheur.



Sandra, je garde pleins de souvenirs de tous les bons et mauvais moments passés ensemble à l'EA3842. Merci pour ton amitié, pour nos discussions, pour tes encouragements et ton soutien. Merci pour toutes les bonnes soirées partagées et comme tu le sais il y'en a tellement beaucoup que je ne vais pas toutes les citer.... Merci pour ta chaleur humaine, ton humour et tes blagues parfois "potaches". Merci également à *Thomas* pour sa gentillesse et les copieux barbecues et gros bisous à *Lou* et *Abel*.

Niki Niki Niki, *Marcella*, *Husseïn* et *Nico*, (la dream team), Merci pour votre présence, votre écoute, votre soutien, vos conseils et encouragements. Je me souviendrai toujours de nos soirées et je garde de supers souvenirs de tous les moments passés ensemble. Merci pour votre joie de vivre, nos rigolades et le reste. Votre compagnie m'aura permis de bien me changer les idées quand je craquais un peu. Merci pour votre amitié que j'espère avoir pour toujours. *Niki* et *Marcella*, merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur, et votre enthousiasme. Merci pour nos fous rires et vos histoires parfois farfelues du monde médical. Merci d'avoir partagé avec nous la culture grecque et brésilienne, maintenant, il reste juste à prévoir les voyages... Enfin, merci pour toutes les sorties et les moments sur le "dance floor". Ne changez rien !! *Nico* (le Périgourdin), Merci pour ta convivialité, ton partage, ton côté ronchonneur et ton humour potache lol. Merci pour toutes les soirées Foot-Bières-Pizza, et nos paris toujours gagnants ou pas ^^ . Merci de m'avoir fait comprendre « qu'ici c'est Limoges et c'est le CSP » et que Limoges c'est « ta ville, que tu l'aimes et tu portes son emblème ». Merci d'avoir fait avec moi ma première sortie pour ramasser les champignons et de m'avoir initié quelques règles, sans ça j'aurais ramassé tout et n'importe quoi. Merci également à *Simon* et *Ramon* qui trouvent toujours les cèpes avant moi. *Husseïn #MP*, merci pour nos sorties, nos fous rires, nos phrases cultes, pour ces souvenirs inoubliables et toutes ces bonnes soirées. Merci pour nos pauses clopes, nos débriefings et pour ta bonne humeur quotidienne. Merci pour les bons moments de partage culinaire, culturel et sportif qui nous ont permis de voyager entre l'Algérie et le Liban. Merci pour les moments inoubliables du Maître, de la 406, de Mr Pichout et la rue Charles Michels. L'aventure de la thèse se termine presque en même temps pour nous deux, je te souhaite le meilleur pour la suite. Et n'oublie pas ! Le pic des singes t'attend toujours pour une visite ;).

Merci *Aïmen*, pour nos premiers jours passés ensemble à Limoges, aux bons moments de notre Master 1 à la rue de Geneve et la fac des sciences.

La vie en dehors du laboratoire est aussi très importante pour réussir à passer à travers le doctorat tout en gardant un esprit sain dans un corps sain ! Merci, à toute l'équipe du "Soccer" : *Nico*, *Husseïn*, *Simon*, *David*, *Ludo*, *Lynda*, *Miguel*, *Flavien*, *Tim*, *William*, etc... Merci *Huss* pour nos séances de running si nombreuses.



Badry, Rose, Jugo, Lynda, Rafik, Monica, Sofiane, Amélie et Djamel, (Les Parisiens ou presque), Merci pour votre présence, votre soutien et vos encouragements. Merci pour tous les bons moments passés ensemble, votre amitié est inestimable depuis de nombreuses années et j'espère l'avoir pour toujours. Merci pour les soirées inoubliables qui m'ont permis de souffler et de penser à autre chose.

Mon frère Badry, notre amitié dure depuis le lycée, merci pour ta bonne humeur, nos rigolades, nos fous rires et tous ces bons moments partagés. Limoges nous a accueillis ensemble en 2010 et j'y suis resté, tu es parti à Paris une année plus tard, mais depuis toutes ces années nous veillons l'un sur l'autre. Pas besoin de se voir tous les jours, un coup de fil, et c'est comme, si on s'était quitté hier. Merci à toi et **Rose** pour le séjour à Amsterdam qui restera gravé à jamais dans notre mémoire. Merci à toi, **Jugo, et Nadjib** pour le séjour Marseillais et ta mauvaise soirée passée aux urgences lol. Merci également à toi, à **Sofiane, Amélie et Djamel** pour le séjour Bordelais et notre escalade de la dune de Pilat ! Merci à tous et à **Rafik, Monica et Lynda** pour la soirée inoubliable de tes 30 ans. Merci pour tout les amis, ne changez rien !!

Pour finir je voudrais remercier toutes les personnes qui me sont chères :

Ma famille, et en particulier mes **parents** mes **sœurs Ahlem et Katia** et mon **frère Massi,** merci pour votre soutien indéfectible depuis le tout début, les études m'ont éloigné de vous mais vous êtes toujours avec moi. Je vous aime ♥. Merci **maman, papa** d'avoir accepté toutes mes décisions et d'avoir cru en moi de manière "quasi aveugle" pendant toutes ces années. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous, et je vous en serai éternellement reconnaissant. Merci également à toi **Youcef** pour tes encouragements et ton soutien et gros bisous à vos petits choux **Rayane et Anis** ♥.

Merci à ma famille à Marseille, **Baya, Wahiba, Idriss, Linda, Farid, Farouk et Myriam.** Merci pour votre accueil, soutien et encouragements dès mon arrivée en France. Merci pour vos nombreux appels qui font toujours chaud au cœur. Bisous à **Léna, Alia, et Badice.**

Charlène, ma compagne des bons moments et de ceux plus difficiles, comme ceux de la fin d'une thèse, merci d'avoir fait preuve d'une grande compréhension en acceptant mes absences répétées durant ces derniers mois. Merci pour ton soutien sans faille et tes encouragements. Merci pour ta gentillesse, ta joie de vivre, et ta bonne humeur. Merci pour avoir toujours été là et d'avoir été patiente avec moi ♥. Merci également à vous **Joëlle et Patrick** pour vos encouragements et votre soutien. Une pensée aux câlinous **Loulou et Mamak.**





Résumé

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est caractérisée par une accumulation anormale de lymphocytes B matures. Les thérapies actuelles reposent sur l'utilisation d'inhibiteurs ciblant les kinases impliquées dans la voie du récepteur des cellules B (BCR), mais elles sont limitées par le niveau élevé de résistance à l'apoptose des cellules leucémiques. En effet, celles-ci échouent à éradiquer les cellules résistantes à l'apoptose, il est donc essentiel d'identifier d'autres voies de survie comme nouvelles cibles pour les thérapies anticancéreuses. La surexpression des récepteurs de surface couplés aux protéines G (RCPGs) entraîne une transformation cellulaire et joue ainsi un rôle essentiel dans les tumeurs malignes. Dans cette étude, nous montrons que le récepteur de la neurotensine de type 2 (NTSR2), un récepteur couplé aux protéines G, est un acteur essentiel dans les mécanismes de résistance à l'apoptose dans les cellules leucémiques. Le récepteur NTSR2 est surexprimé et constitutivement actif dans les cellules leucémiques, son activation dépend de son interaction avec le récepteur TrkB (*Tropomyosin-related kinase B*) et du recrutement des protéines $G_{i\alpha}$ à la place de son interaction avec son ligand naturel, la neurotensine (NTS). L'interaction NTSR2-TrkB agit comme un oncogène conditionnel nécessitant le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), le ligand de TrkB, qui est fortement exprimé dans les cellules B leucémiques, contrairement à son ligand naturel la NTS. L'interaction NTSR2-TrkB active les voies de signalisation de survie, y compris les voies de Src et Akt, ainsi que l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) et Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*). Néanmoins le récepteur TrkB seul ne protège pas les cellules B leucémiques d'une diminution drastique de la viabilité par apoptose lorsque NTSR2 est inactivé. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'interaction NTSR2-TrkB et l'activation soutenue des voies de signalisation dépendante de cette interaction constituent un mécanisme essentiel d'échappement à l'apoptose des cellules B leucémiques. Le ciblage du récepteur NTSR2 représente une stratégie prometteuse pour le traitement de cette pathologie.

Mots-clés : Lymphocytes B leucémiques, RCPG, NTSR2, TrkB, apoptose.





Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the abnormal accumulation of mature B lymphocytes. Current therapies for CLL rely on using kinase inhibitors targeting B-cell receptor (BCR) pathways, but they are limited by the high level of apoptosis-resistant B-CLL cells, which results in a high frequency of patient relapse. Because current therapies fail to eradicate these apoptosis-resistant cells, it is essential to identify alternative survival pathways as novel targets for anticancer therapies. Overexpression of cell-surface G protein-coupled receptors (GPCRs) drives cell transformation, and thus plays a critical role in malignancies. In this study, we show that neurotensin receptor 2 (NTSR2), a G-protein-coupled receptor, is an essential driver of apoptosis resistance in B-CLL. NTSR2 was highly expressed and constitutively active in B-CLL cells, and its activation depended on its interaction with the tropomyosin-related kinase B receptor (TrkB) and the recruitment of $G_{i\alpha}$ proteins, instead of its interaction with its natural ligand, neurotensin (NTS). The NTSR2-TrkB interaction acted as a conditional oncogenic driver requiring the TrkB ligand BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), which is highly expressed in B-CLL cells, unlike its natural ligand NTS. The NTSR2-TrkB interaction activates survival signaling pathways, including the Src and AKT kinase pathways, as well as expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) and Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*). TrkB failed to protect B-CLL cells from a drastic decrease in viability via typical apoptotic cell death when NTSR2 was down-regulated. Taken together, the results suggest that the NTSR2-TrkB interaction and the sustained activation of signaling pathways reliant on this interaction constitute an essential driving force for apoptosis evasion of B-CLL cells. Targeting NTSR2 could represent a promising strategy for treating B-CLL malignancy.

Keywords: B-CLL, GPCR, NTSR2, TrkB, apoptosis.





Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>





Tables des matières

Remerciements	7
Résumé	13
Abstract.....	15
Droits d'auteurs	17
Tables des matières	19
Liste des abréviations	21
Liste des figures	27
Liste des tableaux.....	29
Introduction et objectifs.....	33
Chapitre I. La leucémie lymphoïde chronique-B (LLC-B).....	39
I.1. Définition.....	39
I.2. Les facteurs de risque et formes familiales	39
I.3. L'épidémiologie.....	40
I.4. La physiopathologie de la LLC	41
I.4.1. L'origine cellulaire de la LLC	41
I.4.2. La résistance à l'apoptose.....	44
I.4.3. La prolifération.....	45
I.4.4. La voie de signalisation du BCR	46
I.4.5. Le microenvironnement.....	48
I.5. Les signes cliniques	50
I.6. Le diagnostic	50
I.6.1. La numération formule sanguine (NFS)	51
I.6.2. L'immunophénotypage	51
I.7. L'évolution de la maladie	52
I.7.1. Les complications infectieuses.....	52
I.7.2. Les complications auto-immunes.....	53
I.7.3. Les transformations.....	53
I.7.4. Les cancers solides associés.....	54
I.8. Les facteurs pronostiques	54
I.8.1. Les facteurs pronostiques classiques	54
I.8.2. Les autres facteurs pronostiques	59
I.8.3. Les nouvelles mutations.....	64
I.9. Les traitements	66
I.9.1. Les inhibiteurs de la voie de signalisation du BCR	66
I.9.2. Les inhibiteurs de Bcl-2	68
I.9.3. Les anticorps monoclonaux.....	70
I.9.4. Les agents alkylants.....	71
I.9.5. Les analogues de purines	72
I.9.6. Les immunomodulateurs	72
I.9.7. La chimiothérapie	73
I.9.8. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques.....	73
Chapitre II. La neurotensine et ses récepteurs	75
II.1. La neurotensine (NTS)	75
II.1.1. Généralités et découvertes de la NTS	75
II.1.2. La biosynthèse de la NTS	75
II.1.3. La dégradation de la NTS	77
II.1.4. Localisation et rôles de la NTS.....	78



II.2. Les récepteurs de la NTS (NTSRs).....	80
II.2.1. Le récepteur de la NTS de type 1 (NTSR1)	81
II.2.2. Le récepteur de la NTS de type 2 (NTSR2)	85
II.2.3. Le récepteur de la NTS de type 3 (NTSR3/sortiline).....	90
II.3. NTS, NTSRs et système immunitaire.....	93
II.3.1. NTS, NTSRs et lymphocytes T	93
II.3.2. NTS, NTSRs et lymphocytes B	94
II.3.3. NTS, NTSRs et cytokines pro-inflammatoires.....	95
II.3.4. NTS, NTSRs et cellules mastocytaires	95
II.3.5. NTS, NTSRs et cellules dendritiques et phagocytaires	96
II.4. NTS, NTSRs, cancers et signalisation oncogénique	96
II.4.1. NTS, NTSRs et cancers	96
II.4.2. La signalisation oncogénique de la NTS et ses récepteurs	101
Chapitre III. Les neurotrophines et leurs récepteurs	103
III.1. Les neurotrophines (NTs).....	103
III.1.1. Généralités et découvertes des NTs	103
III.1.2. Structure et biogenèse des NTs.....	104
III.2. Les récepteurs aux NTs	104
III.2.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (Trks).....	104
III.2.2. Structure et isoformes des Trks	105
III.2.3. Les voies de signalisation des Trks.....	110
III.2.4. La transactivation des récepteurs Trks	114
III.2.5. Le récepteur p75 ^{NTR}	116
III.2.6. Les interactions entre les différents récepteurs	121
III.3. Les NTs et leurs récepteurs dans le système immunitaire	124
III.3.1. En conditions physiologiques	124
III.3.2. Dans les hémopathies malignes B.....	126
Chapitre IV. Matériels et méthodes	131
IV.1. Culture cellulaire	131
IV.1.1. Les lignées cellulaires	131
IV.1.2. Isolement des lymphocytes B (normaux et leucémiques)	131
IV.1.3. Traitements cellulaires	133
IV.1.4. Transfections.....	133
IV.2. Analyse de la viabilité cellulaire	134
IV.3. Etude de l'apoptose	135
IV.4. Analyse de l'expression protéique par Western Blot	136
IV.5. Immunoprecipitation (IP)	138
IV.6. Etude de la signalisation cellulaire par phosphoprotéome	139
IV.7. Extraction d'ARNs totaux, reverse transcription et PCR quantitative	139
IV.8. Immunofluorescence indirecte (IFI)	141
IV.9. Cytométrie en flux	142
IV.10. Dosage du BDNF et de la neurotensine dans le plasma par la méthode ELISA	143
IV.11. Analyses statistiques.....	143
Chapitre V. Résultats.....	147
V.1. Préambule	147
V.2. Article	153
Chapitre VI. Discussion	173
Conclusion et perspectives.....	183
Références bibliographiques	187
Annexe : Publication non associée au manuscrit de thèse.....	243



Liste des abréviations

ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
AIG	Autoimmune Granulocytopaenia
AIHA	Autoimmune Hemolytic Anemia
Akt	Protein kinase B
AMPc	Adenosin Mono-Phosphate cyclique
AP-1	Activator protein 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
APS	Adaptor protein with PH and SH2 domains
ARMS	Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning adaptor
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
Bad	Bcl2-antagonist of cell death
BAFF	B-cell Activating Factor
Bax	BCL2-associated X protein
BCL11A	B-cell CLL/lymphoma 11A
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BCL2	BCL2, apoptosis regulator
BCL2A1	BCL2 Related Protein A1
BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
Bcl-xS	B-cell lymphoma-extra small
BCR	B-cell receptor
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
Bim	Bcl-2 Interacting Mediator of cell death
BLNK	B-cell Linker protein
BR	Bendamustine-Rituximab
BSA	Bovine Serum Albumin
BTK	Bruton's Tyrosine Kinase
CAMK	CA ²⁺ /calmodulin-regulated protein kinase
CBNPC	Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules
CBPC	Cancer Bronchique à Petites Cellules
CCL3 et 4	C-C motif chemokine 3 et 4
CCND1	Cyclin D1
CCR	Cancer colorectal
CCR5	C-C chemokine Receptor type 5
CD	Clusters of Differentiation
CDC	Complement-Dependent Cytotoxicity
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
Cib	Chlorambucil
CMH-I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe-I
CMV	Cytomégalovirus
c-MYC	MYC proto-oncogene
COX-2	Cyclooxygénase-2
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CR	Complete Remission
CRD	Cystein-Rich Domain



CREB	C-AMP Response Element-Binding protein
CSHs	Cellules Souches Hématopoïétiques
CXCL12	C-X-C chemokine ligand 12
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DAG	Diacylglycerol
DCD	Direct Cell Death
DD	Death Domain
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
DLBCL	Diffuse Large B Cell Lymphomas
DMR	Durée Médiane de la Réponse
DSS	Dextran Sulfate de Sodium
EBV	Epstein Barr Virus
EDG-1	Endothelial Differentiation Gene-1
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
Egr-1	Early growth response protein 1
ERK	Extracellular-signal-Regulated Kinase
EV	Empty Vector
FAK	Focal Adhesion Kinase
Fas/ FasL	Fas cell surface death receptor/Fas Ligand
FC	Fludarabine- Cyclophosphamide
FCR	Fludarabine-Cyclophosphamide-Rituximab
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
FRS-2	Fibroblast growth factor Receptor Substrate-2
Gab1	GRB2-associated-binding protein-1
GAPs	Guanosine triphosphatase Activating Proteins
G-Clb	GAZYVARO plus chlorambucil
GDP	Guanosine diphosphate
GEFs	Guanine nucleotide Exchange Factors
GGA2	Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding protein
Glut-4	Glucose Transporter Type-4
Grb2	Growth factor receptor-bound protein-2
GTP	Guanosine triphosphat
GVHD	Graft-Versus-Host Disease
HER 2/3	Human Epidermal growth factor Receptor 2/3
IFN-γ	Interferon γ
Ig	Immunoglobine
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IGF-1R	Insulin-like Growth Factor-1 Receptor
IgVH	Immunoglobulin Heavy Chain
IκB	I-kappa-B-alpha
IL	Interleukine
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IP3	Inositol 1,4,5-triPhosphate
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif



IWCLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
Jak	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
K/O	Knockout
kb	kilobase
K_d	Constante de dissociation
kDa	kilodalton
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LDH	Lactate DeHydrogenase
Lingo-1	LRR and Ig domain-containing Nogo-receptor interacting protein-1
LNGFR	Low affinity Nerve Growth Factor Receptor
LPA1	Lysophosphatidate receptor 1
LPL	Lipoprotéine Lipase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPKs	Mitogen-Activated Protein Kinases
MBL	Monoclonal B-cell lymphocytosis
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MGA	MGA, MAX dimerization protein
MMPs	Matrix Metalloproteinases
MSCs	Mesenchymal stromal cells
MSK-1	Mitogen- and stress-activated protein kinase-1
MYCN	MYCN proto-oncogene
MYD88	Myeloid Differentiation primary response 88
NADE	NT-Associated Cell Death Executor
NEEP-21	Neuron-Enriched Endosomal Protein-21
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NFS	Numération Formule sanguine
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGF	Nerve Growth Factor
NGFR	NGF Receptor
NHL	Non-Hodgkin Lymphoma
NK	Natural Killer
NLCs	Nurse Like Cells
NN	Neuromedin
NO	Nitric Oxide
Nogo-R	glycolipid-anchored Nogo-Receptor
NRAGE	Neurotrophin Receptor-interacting MAGE homolog
NRIF	Nuclear Receptor Interacting Factor
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4/5	Neurotrophin-4/5
NTRK	Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor
NTS	Neurotensine
NTs	Neurotrophines
NTSRs	Neurotensin receptors
ORR	Objective Response Rate



p27^{Kip1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p75^{NTR}	Neurotrophin receptor p75(NTR)
p75^{NTR}-CTF	C-Terminal Fragment
p75^{NTR}-ECD	ECD Extra Cellular Domain
p75^{NTR}-ICD	ICD Intra Cellular Domain
PAC1R	PACAP type 1 Receptor
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Prohormones Convertases
PD-1	Programmed cell Death-1
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor-Receptor
PD-L1	Programed cell Death-Ligand 1
PDZ	Post-synaptic Disc-large Zona
PEST	Proline (P), acide glutamique (E), sérine (S), thréonine (T)
PFS	Progression-Free Survival
PHA	Phytohemagglutinin
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Diphosphate
PKC	Protein Kinase C
PKD	Protein Kinase D
PLC-γ	Phospholipase C-γ
PLCγ2	Phospholipase Cγ2
PRCA	Pure Red-Cell Aplasia
pro-NTs	Pro-neurotrophines
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PTX	Toxine pertussique
Pyk2	Proline-rich trosine kinase 2
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate-1
Rap	Ras-related protein
Ras	Ras GTPase activating protein
RCPGs	Récepteurs Couplés aux Protéines G
REL	REL proto-oncogene
RhoA	Ras-homology gene family, membre A
Rho-GDI	Rho-GDP Dissociation Inhibitor
Rho-GTPase	Ras-like Protein-Guanosine Tri-Phosphatase
RIP-2	Receptor Interacting Protein-2
ROR1	Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor 1
RS	Richter's Syndrome
Rsk	Ribosomal S6 Kinase
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
S1P₁	Sphingosine 1-Phosphate-Receptor
SAP	Sphingolipid Activator Protein
SC-1	schwann cell factor-1
SETD2	SET domain containing 2
SF3B1	Splicing Factor 3b Subunit 1
SG	Survie Globale
Shc	Src homology 2 domain-containing protein



shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interference RNA
SOS	Son Of Sevenless
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Syk	Spleen Tyrosine Kinase
TAMs	Tumor-Associated Macrophages
TCF	T Cell Factor
TDL	Temps de Doublement Lymphocytaire
TGN	Trans-Golgi Network
TK	Thymidine Kinase
TM	Segment transmembranaire
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor- α
TP53	Tumor Protein p53
TRAFs	TNF receptor-associated factors
TrkB	Tropomyosin related kinase B
TrkB-FL	TrkB-Full Length
TrkB-T1	TrkB-Truncated 1
TrkB-T-shc	TrkB-Truncated-shc
TrkC-T	TrkC-Truncated
Trks	Tropomyosin related kinases
TTIP	Truncated TrkB Interacting Protein
TBS	Tris-Buffered Saline
TBNS	acide 2,4,6-Trinitro-Benzène Sulfonique
VAV1	VAV guanine nucleotide exchange factor 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHS	Vps27/Hrs/STAM
Vps10p	Vacuolar protein sorting 10 protein
XIAP	X-Linked Inhibitor Of Apoptosis
XPO1	Exportine 1
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70 kDa
β2-m	β 2-microglobuline





Liste des figures

Figure 1 : Incidence par âge de la LLC en 2012.	41
Figure 2 : Présentation schématique du développement de la LLC chez l'homme basée sur un modèle de xénogreffe murine.	42
Figure 3 : Un modèle pour l'origine cellulaire de la LLC dépendant de la stimulation antigénique.	43
Figure 4 : Représentation schématique des voies de signalisation intracellulaires activées par le BCR.	47
Figure 5 : Microenvironnement des cellules leucémiques.	49
Figure 6 : Lymphocytes leucémiques sur un frottis sanguin.	51
Figure 7 : Les aires ganglionnaires palpables.	56
Figure 8 : Survie globale (SG) des patients atteints de la LLC selon la classification de Rai (histogramme de droite) et de Binet (histogramme de gauche).	57
Figure 9 : La signalisation du BCR comme cible thérapeutique dans le traitement de la LLC.	69
Figure 10 : Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux anti-CD20.	70
Figure 11 : Séquence peptidique de la NTS.	75
Figure 12 : Transcription du gène commun codant pour la pro-NTS-NN.	76
Figure 13 : Représentation schématique du précurseur de la NTS et des peptides issus de son clivage par les prohormones convertases.	77
Figure 14 : Peptidases impliquées dans la dégradation de la NTS.	78
Figure 15 : Structure des récepteurs NTSR1 et NTSR2 chez le rat.	82
Figure 16 : Effecteurs majeurs activés par l'axe NTS/NTSR1/G _{αq/11}	84
Figure 17 : Structure chimique des antagonistes non peptidiques des NTSRs.	87
Figure 18 : Représentation schématique du trafic cellulaire des NTSRs après internalisation.	89
Figure 19 : Structures protéiques des membres de la famille des protéines à domaine Vps10, et du récepteur NTSR3/sortiline.	91
Figure 20 : Représentation des voies de signalisation par lesquelles la NTS et ses récepteurs contribueraient à la progression tumorale.	102
Figure 21 : Synthèse des NTs.	104
Figure 22 : Interaction des pro-NTs et des NTs matures avec les récepteurs Trks et p75 ^{NTR}	105
Figure 23 : Structure des récepteurs Trks.	106
Figure 24 : Les isoformes de TrkA.	107
Figure 25 : Les isoformes de TrkB.	109
Figure 26 : Les isoformes de TrkC.	110
Figure 27 : Les voies de signalisation activées par les Trks.	111
Figure 28 : Transactivation des RTKs par les RCPGs.	115
Figure 29 : Structure du récepteur p75 ^{NTR}	117
Figure 30 : Les isoformes du récepteur p75 ^{NTR}	118



Figure 31 : Les voies de signalisation du récepteur p75 ^{NTR}	119
Figure 32 : Implication de NTSR3/sortiline dans le rôle pro-apoptotique du pro-NGF et pro-BDNF (adapté de Budni et al., 2015).	121
Figure 33 : Les interactions entre les récepteurs Trks, p75 ^{NTR} et NTSR3/sortiline.	122
Figure 34 : Sélection négative des cellules B humaines par le kit (B Cell Isolation Kit II, human) (MACS; Miltenyi Biotec).	132



Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux indicateurs en 2012.....	41
Tableau 2 : Le score de Matutes pour le diagnostic de la LLC.	52
Tableau 3 : Classification de Rai.	55
Tableau 4 : Modification de la classification de Rai.	55
Tableau 5 : Classification de Binet.	55
Tableau 6 : Anomalies chromosomiques récurrentes dans la LLC.	62
Tableau 7 : Liste des anticorps primaires utilisés en Western Blot.	138
Tableau 8 : Liste des anticorps secondaires utilisés en Western Blot.	138
Tableau 9 : Liste des anticorps primaires Contrôles isotypiques utilisés en immunoprécipitation.	139
Tableau 10 : Séquences d'amorces Sens et anti-sens ainsi que les sondes utilisées pour amplifier les gènes d'intérêt.	141
Tableau 11 : Liste des anticorps primaires, secondaires et les contrôles isotopiques utilisés en immunofluorescence et en cytométrie en flux.	142





Introduction et objectifs





Introduction et objectifs

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la leucémie la plus fréquente des adultes. Cette hémopathie maligne est caractérisée par une prolifération/accumulation monoclonale de lymphocytes B matures CD5⁺/CD23⁺ résistants à l'apoptose (Chiorazzi et al., 2005; Ghamlouch et al., 2017; Kitada et al., 2002). Les thérapies actuelles utilisées contre les cellules leucémiques restent limitées, comme en témoignent la fréquence des récives chez les patients. Par conséquent, l'identification de mécanismes encore inconnus impliqués dans les voies de survie des cellules leucémiques pourrait fournir de nouvelles cibles pour les thérapies anticancéreuses. La surexpression de récepteurs de surface, en particulier les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), a été décrite dans la transformation cellulaire maligne et joue ainsi un rôle essentiel dans plusieurs types de cancers (Liu et al., 2016).

De nombreux travaux ont montré l'implication des RCPGs dans la transduction du signal impliqué dans le contrôle de l'homéostasie, et notamment dans l'équilibre entre la mort et la prolifération cellulaire (Liu et al., 2016). Dans les lymphocytes, les RCPGs couplés aux protéines G hétérotrimériques, notamment les G_{12s}, régulent de multiples fonctions immunitaires et interagissent avec d'autres voies de signalisation, conduisant à une activation constitutive des voies MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), ERK (*Extracellular-signal-Regulated Kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) et des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) et Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) (Barragán et al., 2002; Cuní et al., 2004; Kehrl, 1998, 2016). Ces observations suggèrent que les cellules malignes peuvent détourner la fonction physiologique des RCPGs pour leur survie. En conséquence, l'activation des RCPGs peut être associée à la pathogenèse de la LLC (Dorsam and Gutkind, 2007).

Les travaux précédemment réalisés par notre équipe ont permis de caractériser deux récepteurs de la famille des RCPGs dans les cellules B normales et malignes (Saada et al., 2012). En effet, il a été montré, que la neurotensine (NTS), un neuropeptide de 13 acides aminés ainsi que ses deux récepteurs RCPGs de haute et de faible affinité, NTSR1 et NTSR2 respectivement, sont exprimés dans les lymphocytes B humains. De plus, ces travaux ont montré que le stress cellulaire induit par la privation sérique favorise l'expression membranaire de NTSR1 et d'un autre récepteur de la NTS, le récepteur NTSR3/sortiline, un récepteur de la famille Vps10p (*Vacuolar protein sorting 10 protein*) avec un seul domaine transmembranaire, préalablement caractérisé dans différentes lignées lymphocytaires B humaines ainsi que dans les lymphocytes normaux circulants (Fauchais et al., 2008).



La NTS, a été initialement identifiée dans le système nerveux où elle se comporte comme un neurotransmetteur ou comme un neuromodulateur, elle est également présente en périphérie agissant comme hormone, en majorité dans le système digestif (Carraway and Leeman, 1976). Elle est impliquée dans plusieurs mécanismes comme le contrôle de la douleur, la thermorégulation ainsi que la régulation de la glycémie (Bozzola et al., 1998; Iguchi et al., 1984; Remaury et al., 2002; Rosell et al., 1980). Tel que mentionné précédemment, la NTS induit ses effets biologiques *via* trois sous-types de récepteurs, NTSR1, NTSR2 et NTSR3/sortiline, impliqués entre autres, dans la prolifération, la survie, la migration et l'invasion cellulaire. Ces signalisations ont été décrites dans différents types de cancers solides notamment pour l'axe NTS/NTSR1 (Alifano et al., 2010; Dupouy et al., 2011; Kamimae et al., 2015; Somaï et al., 2002a; Swift et al., 2010). En revanche, l'implication de la NTS et de ses récepteurs dans l'oncogenèse B n'a été montrée que par des travaux de notre équipe ayant précédemment montré la fonction de NTSR3/sortiline dans les lignées lymphocytaires B (Fauchais et al., 2008) et la caractérisation de l'expression de la NTS et de ses deux récepteurs NTSR1 et NTSR2 dans les lignées cellulaires B humaines, les cellules B de patients atteints de la LLC et dans les cellules B provenant de donneurs sains (Saada et al., 2012).

Une boucle autocrine de régulation de la survie lymphocytaire B a été mise en évidence dans des lignées de cellules B à différents stades de différenciation et a montré une double fonction de NTSR3/sortiline dans ces cellules. En effet, dans des conditions de stress sérique et/ou d'activation apoptotique par la voie Fas/FasL, la survie cellulaire dépend de la sécrétion autocrine du BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), un membre de la famille des neurotrophines (NTs) et de l'expression membranaire de son récepteur à tyrosine kinase, TrkB (*Tropomyosin-related kinase B*) (Fauchais et al., 2008). Ainsi, NTSR3/sortiline peut soit transporter le BDNF qui conduit à une boucle autocrine de survie dans les cellules B par l'activation de son récepteur TrkB, soit servir de corécepteur pour $p75^{\text{NTR}}$ (*Neurotrophin receptor p75[NTR]*) dans la liaison de la forme immature pro-apoptotique de BDNF (Bellanger et al., 2011; Fauchais et al., 2008).

La famille des NTs regroupent plusieurs facteurs de croissance initialement découverts dans le système nerveux. Ils sont impliqués dans la différenciation, la prolifération, la survie, l'apoptose ainsi que dans la croissance axonale et la plasticité synaptique des cellules neuronales et astrocytaires (Cowen and Gavazzi, 1998). Les NTs sont également retrouvées dans de nombreux autres tissus tels que le foie, le pancréas, le tube digestif, les tissus synoviaux, et le système immunitaire. Chez l'homme, cette famille est



constituée de 4 membres : le NGF (*Nerve Growth Factor*), le BDNF, la NT-3 (*Neurotrophin-3*) et la NT-4/5 (*Neurotrophin-4/5*) (Cassiman et al., 2001; Kerschensteiner et al., 1999; Sternini et al., 1996). Les NTs exercent leurs effets physiologiques par leur interaction avec des récepteurs de haute affinité nommés Trks (*Tropomyosin related kinases*) mais aussi avec un récepteur de faible affinité, le récepteur p75^{NTR}. En revanche, ce dernier possède une forte affinité pour les formes immatures des NTs, les pro-neurotrophines (pro-NTs) (Arévalo and Wu, 2006; Chao, 2003a). Chaque NT interagit avec son récepteur Trk de haute affinité : TrkA avec le NGF, TrkB avec le BDNF et la NT-4/5, et TrkC avec la NT-3 et induit une signalisation de survie en conditions de stress cellulaire (Bergman et al., 2000; Chao, 2003a). Il a également été montré que les pro-NTs peuvent activer les récepteurs Trks et p75^{NTR} via le récepteur NTSR3/sortiline, favorisant ainsi une signalisation de mort cellulaire (Casaccia-Bonofil et al., 1999a, 1999b; Jansen et al., 2007; Nykjaer and Willnow, 2012). Dans les lignées lymphocytaires B le complexe p75^{NTR}/NTSR3 (Sortiline) induit la mort cellulaire en présence du pro-BDNF (Fauchais et al., 2008).

Basé sur les précédentes observations montrant l'expression différentielle des récepteurs à la NTS (NTSRs) dans les lymphocytes B humains, leur résistance à l'apoptose induite par le stress cellulaire, et la surexpression de NTSR2 dans les lymphocytes B de patients atteints de la LLC, nous avons émis l'hypothèse d'une implication du récepteur NTSR2 de la famille des RCPGs dans la résistance à l'apoptose des cellules B leucémiques. La fonction de NTSR2 n'ayant jusqu'alors jamais été étudiée dans la LLC et étant très peu étudiée dans d'autres cancers, nos objectifs étaient *i)* de comparer l'expression de NTSR1 et NTSR2 au niveau transcriptionnel et protéique entre les lymphocytes B de patients atteints de la LLC et de sujets sains *ii)* de déterminer si la régulation négative de NTSR2 pouvait sensibiliser les lymphocytes B leucémiques à l'apoptose *iii)* de préciser la fonction de NTSR2 dans la signalisation de survie et la résistance à l'apoptose des cellules leucémiques de patients ainsi que dans les lignées cellulaires surexprimant le récepteur *iv)* de rechercher si des interactions potentielles existent entre les voies de survie induites par le BDNF et la NTS dans les cellules leucémiques et les lignées cellulaires et enfin *v)* de déterminer les mécanismes responsables de l'activation du récepteur NTSR2 dans ces cellules.





Revue bibliographique





Chapitre I. La leucémie lymphoïde chronique-B (LLC-B)

I.1. Définition

La LLC-B est une hémopathie maligne, caractérisée par une accumulation lente et progressive de petits lymphocytes-B CD5⁺ néoplasiques d'aspect matures dans le sang périphérique, la moelle osseuse et les tissus lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate) (Dighiero and Hamblin, 2008; Kipps et al., 2017; Rozman and Montserrat, 1995). Ces cellules sont d'origine monoclonale et présentent un phénotype particulier. En effet, les lymphocytes monotypiques de la LLC expriment des marqueurs B (CD19 et CD20), présentent de faibles taux d'immunoglobulines de membrane et de CD79b, co-expriment CD5 et CD23, et n'expriment pas FMC7 (Hallek et al., 2008; Matutes et al., 1994). C'est la plus fréquente des leucémies de l'adulte dans les pays occidentaux et représente environ 30% de toutes les leucémies. Elle touche plus souvent les personnes âgées (âge moyen au diagnostic : 70 ans), avec une prédominance masculine (2/3 des cas). L'évolution clinique de la LLC est extrêmement variable : certains patients présentent une maladie indolente non progressive, avec une espérance de vie quasi identique aux individus du même âge. D'autres patients, au contraire, connaissent une maladie agressive qui nécessite un traitement précoce et deviennent rapidement résistants au traitement. Ces patients sont caractérisés souvent par un mauvais pronostic et risquent de développer un syndrome de Richter (RS), qui correspond au stade final de l'évolution de la maladie (Hallek, 2015; Rossi and Gaidano, 2016; Tsimberidou and Keating, 2005).

I.2. Les facteurs de risque et formes familiales

L'apparition de la LLC n'est pas due à des facteurs environnementaux connus. En effet, elle reste la seule leucémie pour laquelle il n'a jamais été mis en évidence de corrélation avec l'exposition à des rayonnements ionisants ou à des composés chimiques. De plus, la LLC n'est pas plus fréquente chez les personnes immunodéficientes (Ghia et al., 2007; Rozman and Montserrat, 1995). En revanche, une prédisposition génétique et familiale semble jouer un rôle dans la pathogénèse de la maladie. Tout d'abord, il a été démontré que l'incidence varie selon les pays. En effet, la LLC est très rare en Chine, en Corée et pratiquement absente au Japon. Ce faible taux d'incidence est maintenu chez les populations migrantes et chez leur descendance, excluant ainsi les facteurs environnementaux d'une telle prédisposition génétique (Boggs et al., 1987; Weiss, 1979). De plus, des études épidémiologiques ont montré que dans 5 à 10% des cas, il existe une prédisposition familiale à la LLC ainsi qu'à d'autres tumeurs lymphoïdes malignes (Linnet et



al., 1989; Yuille et al., 2000), avec 2 personnes ou plus affectées dans la même famille. Le risque de développer de telles maladies notamment la LLC, est 2 à 7 fois plus élevé dans ces formes familiales comparé à la population générale (Capalbo et al., 2000). Cette prédisposition familiale s'accompagne du phénomène d'anticipation (Wiernik et al., 2001; Yuille et al., 2000), qui est une apparition précoce de la maladie avec une évolution plus sévère chez les descendants de patients atteints de la LLC. Malgré ses différentes caractéristiques, la LLC familiale est en termes clinique, moléculaire et biologique, très similaire aux cas sporadiques (Ghia et al., 2007). Ces rares formes familiales ne justifient pas en pratique de consultation d'oncogénétique. Les polymorphismes génomiques pourraient également intervenir comme facteurs de susceptibilité à la LLC. En effet, plus de 20 polymorphismes au total ont été identifiés et expliqueraient près de 50% du risque familial (Berndt et al., 2013; Speedy et al., 2014) sans qu'aucune mutation initiatrice n'ait été décrite.

I.3. L'épidémiologie

La LLC est la leucémie la plus fréquente dans les pays occidentaux, le plus souvent en Europe, en Amérique du Nord et en Australie et est beaucoup moins fréquente en Asie (Herishanu and Polliack, 2005). Elle représente 40% de toutes les leucémies chez les personnes âgées de plus de 65 ans (Herishanu and Polliack, 2005) avec une incidence estimée de 4 à 5 cas pour 100000 individus/an (Visentin et al., 2016). Plus de 15000 nouveaux cas diagnostiqués et environ 4500 décès estimés par an (Hallek, 2015). L'incidence augmente avec l'âge avec plus de 70% des patients âgés de plus de 65 ans au moment du diagnostic. Bien que l'âge médian au diagnostic soit de 72 ans, au cours des dernières décennies, la LLC est plus souvent diagnostiquée chez les plus jeunes, avec près de 15% des patients de moins de 55 ans (Scarfò et al., 2016) et dans la plupart des cas, les hommes sont plus touchés que les femmes (Rozman and Montserrat, 1995). L'évolution de la maladie est variable, en effet, certains patients atteints de la LLC peuvent survivre normalement, tandis que d'autres décèdent dans les cinq années suivant le diagnostic (Rozman and Montserrat, 1995). La prévalence de la LLC indiquant que le nombre de personnes vivantes atteintes, reste autour de 30 à 50 individus pour 100000 (0,03 - 0,05%) (Ghia et al., 2007). En France, selon une étude de l'institut de veille sanitaire (InVS), on estime à 4464 le nombre de nouveaux cas en 2012. La prévalence est de 60% chez les hommes contre 40% chez les femmes. L'incidence standardisée sur la population mondiale est de 4,4 et 2.2 pour 100000 individus/an chez l'homme et la femme respectivement, soit un rapport hommes/femmes de 2 (Tableau 1).



Tableau 1 : Principaux indicateurs en 2012.

	Sexe	Taux brut	Taux standardisés Europe	Taux standardisés Monde	Nombre de cas
Incidence	Homme	8.7	6.7	4.4	2696
	Femme	5.4	3.3	2.2	1768

(d'après l'InVS, incidence des cancers en France entre 1980 et 2012)

Cette incidence augmente avec l'âge, passant chez l'homme de 1,2 pour 100000 entre 40 et 44 ans à 52,5 entre 90 et 94 ans. Chez la femme elle passe de 0,5 pour 100000 à 22,6 (Figure 1). Cette maladie touche donc les personnes âgées avec un âge médian de 71 ans chez l'homme et de 74 ans chez la femme au moment du diagnostic. Plus de 44% des cas sont observés chez les plus de 75 ans (40% chez l'homme, 49% chez la femme). La même étude a révélé que l'incidence a peu varié entre 1980 et 2012, le taux annuel moyen d'évolution du taux d'incidence est de 0,9% chez l'homme et de 1,1% chez la femme sur l'ensemble de la période avec cependant une tendance à la diminution sur la période 2005-2012 (taux annuel moyen d'évolution de -1,3% et -2,4%, respectivement chez l'homme et la femme).

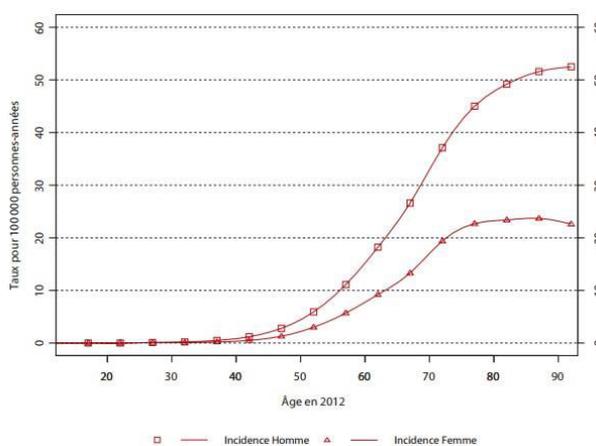


Figure 1 : Incidence par âge de la LLC en 2012.

(d'après l'InVS, incidence des cancers en France entre 1980 et 2012)

I.4. La physiopathologie de la LLC

I.4.1. L'origine cellulaire de la LLC

L'origine cellulaire de la LLC reste inconnue (Chiorazzi and Ferrarini, 2011) mais il existe quelques hypothèses :



I.4.1.1. La lymphocytose B monoclonale isolée (MBL)

La MBL se définit par la persistance de lymphocytes B monoclonaux (< à 5000 lymphocytes/mm³), l'absence d'atteinte ganglionnaire, de cytopénie ou de maladie auto-immune associée (D'Arena and Musto, 2014). Ces cellules ont des caractéristiques proches des cellules de la LLC dans 75% des cas. De plus, parmi les patients atteints d'une MBL, 1 à 2% par an évoluent vers une LLC. Aujourd'hui, il est communément admis que toute LLC est précédée d'une MBL. Il est intéressant de noter que malgré la faible lymphocytose, la MBL peut présenter des anomalies cytogénétiques caractéristiques de la LLC (Rossi et al., 2009). Au niveau biologique, la MBL ne diffère pas de la LLC stade Rai 0 (stade précoce de la maladie) qu'au regard du statut mutationnel IgVH (*Immunoglobulin Heavy Chain*), ce dernier étant plus souvent retrouvé non muté chez les patients Rai 0 comparés aux patients atteints de MBL (Morabito et al., 2013).

I.4.1.2. Les cellules souches de la LLC

Des études précédentes ont montré que les cellules souches hématopoïétiques sont impliquées dans le développement de la LLC (Kikushige et al., 2011). En effet, suite à la stimulation du récepteur des cellules B (BCR), ces cellules génèrent des cellules pro-B polyclonales, capables de produire des cellules B exprimant fréquemment le CD5 et le CD23, caractéristiques du clone leucémique. Dans l'étude de Kikushige et al., 2011, les cellules CD34⁺, CD38⁻, prélevées à partir de la moelle osseuse de patients atteints de la LLC, génèrent chez la souris immunodéficente une MBL, mais pas de LLC.

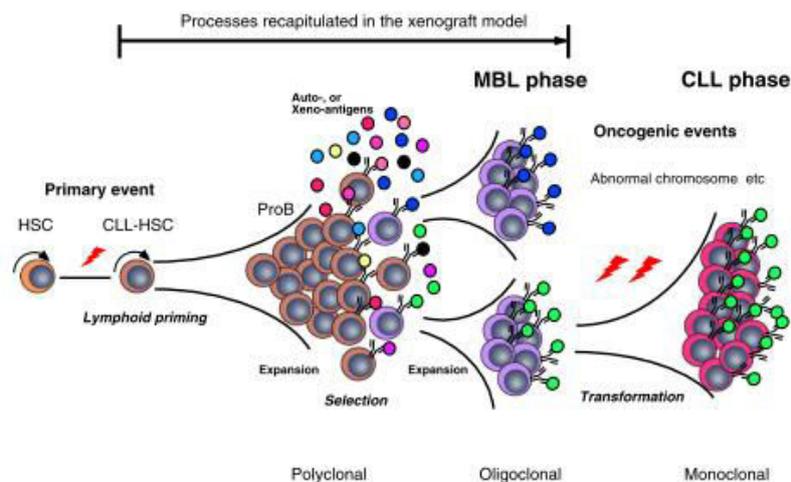


Figure 2 : Présentation schématique du développement de la LLC chez l'homme basée sur un modèle de xéngreffe murine.
(extrait de Kikushige et al., 2011)



Suite à cette étude, ils ont émis l'hypothèse qu'une cellule souche hématopoïétique de la LLC génère un grand nombre de clones B polyclonaux, qui sont ensuite sélectionnés et amplifiés par activation de la signalisation de leur BCR conduisant à l'apparition de la MBL. Cette dernière évoluerait enfin vers une LLC suite à des événements oncogéniques non définis (Figure 2).

I.4.1.3. Le rôle de la stimulation antigénique

D'autres auteurs proposent de diviser la leucémogénèse de la LLC en deux groupes sur la base du statut mutationnel IgVH (Chiorazzi et al., 2005) (Figure 3). Ainsi, les cellules B naïves peuvent être entraînées dans une réponse immunitaire T-dépendante (avec hypermutation des IgVH dans le centre germinatif) ou T-indépendante (sans hypermutation des IgVH). Selon le type des réponses, la cellule se différencie en cellule B de la zone marginale ou en cellule B mémoire. Sous l'effet d'une stimulation antigénique chronique, la cellule reste activée et acquiert avec le temps des altérations génétiques menant à la survenue d'un clone phénotypiquement anormal (MBL), puis à la transformation oncogénique (Gaidano et al., 2012).

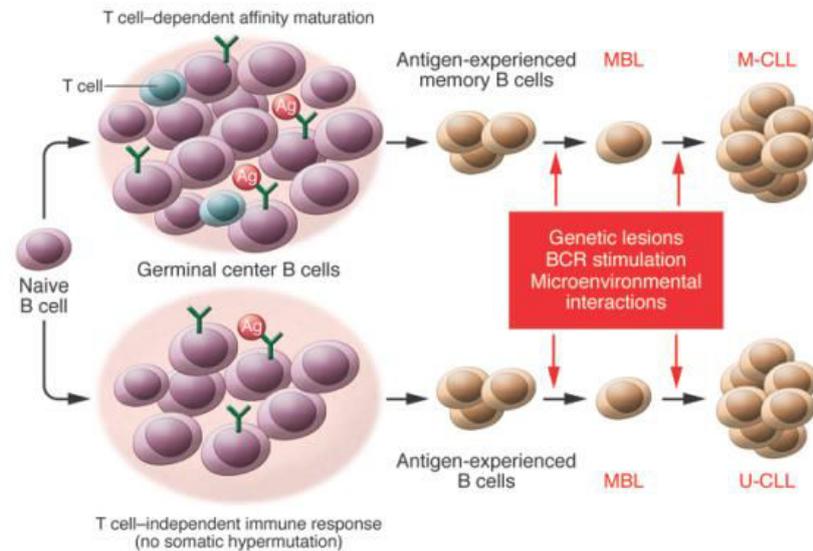


Figure 3 : Un modèle pour l'origine cellulaire de la LLC dépendant de la stimulation antigénique.

La LLC provenant de cellules B ayant subi une hypermutation somatique portent des gènes *IgVH* mutés et sont définies comme M-CLL. À l'inverse, les LLC provenant de cellules B impliquées dans des réactions immunitaires indépendantes des lymphocytes T portent des gènes *IgVH* de la lignée germinale et sont définies comme U-CLL (d'après Gaidano et al., 2012).



I.4.2. La résistance à l'apoptose

L'inhibition de la mort cellulaire programmée (ou l'apoptose) et l'arrêt du cycle cellulaire définissent la biologie de la LLC comme une hémopathie maligne chronique et incurable (Schriever and Huhn, 2003). Les cellules leucémiques ont une faible activité proliférative, et les données appuient l'hypothèse selon laquelle le défaut d'apoptose *in vivo* explique l'accumulation de cellules B. Dans ces cellules, les translocations du gène *BCL2* sont rares avec moins de 1% des cas (Dyer et al., 1994) malgré une expression élevée de la protéine Bcl-2. Initialement cette surexpression était expliquée par une hypométhylation du promoteur de *BCL2* (Hanada et al., 1993), mais par la suite, il a été démontré que miR-15a et miR-16-1 qui régulent négativement l'expression de *BCL2* au niveau post-transcriptionnel, sont délétés ou sous-exprimés dans la LLC. Cette dérégulation de la transcription de *BCL2* conduit à une accumulation de cette protéine (Calin et al., 2005; Cimmino et al., 2005).

Le rôle de Bcl-2 dans l'inhibition de l'apoptose n'est pas clair, car aucune corrélation n'existe entre l'apoptose *in vitro* et le taux de son expression (Vrhovac et al., 1998). Cependant, d'autres membres de la famille Bcl-2, tels que les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia-1*), sont surexprimées alors que les protéines pro-apoptotiques, telles que Bax (*BCL2-associated X protein*) et Bcl-xS (*B-cell lymphoma-extra small*) sont sous-exprimées (Caligaris-Cappio and Hamblin, 1999). La variation individuelle du rapport Bcl-2/Bax corrèle avec l'apoptose et l'évolution clinique de la maladie. En effet, plusieurs études ont mis en évidence qu'un rapport Bcl-2/Bax élevé était souvent corrélé avec une maladie agressive ou une mauvaise réponse au traitement (Kitada et al., 1998; Pepper et al., 1997; Saxena et al., 2004). D'autres études ont montré que les altérations de la séquence dans le promoteur de *BAX* contribuent à diminuer l'expression de la protéine dans quelques cas de LLC. Il a été également montré qu'un polymorphisme hétérozygote était présent dans 69% des LLC, tous stades confondus, et qu'il était lié à la progression vers un stade clinique avancé et à un échec à obtenir la rémission complète (Pepper et al., 2001, 2002; Saxena et al., 2002). D'autres travaux ont rapporté un rôle important dans la LLC pour une autre protéine de la famille Bcl-2, Mcl-1, dont l'expression est corrélée à l'échec de rémission après chimiothérapie (Craig, 2002; Michels et al., 2004).

Contrairement aux résultats *in vivo*, l'apoptose des cellules de la LLC se produit spontanément lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*, cela indiquerait que le microenvironnement peut jouer un rôle important dans la survie de ces cellules (Caligaris-Cappio, 2003; Lagneaux et al., 1993, 1998). Toutefois, il est important de considérer que d'autres régulateurs classiques de l'apoptose tels que p53 et ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) sont aussi altérés dans les cellules leucémiques (Bouley et al., 2006; Trbusek et al., 2006).



La modulation de l'apoptose, notamment de la voie Bcl-2, constitue une nouvelle arme dans l'arsenal thérapeutique de la LLC. Le premier inhibiteur puissant qui a été évalué dans des essais cliniques était le navitoclax, un BH3 mimétique capable de bloquer la fonction de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Il est actif dans la LLC en rechute, avec des réponses partielles observées chez 35% des patients (Kipps et al., 2015). Plus récemment, un second et plus puissant inhibiteur de Bcl-2 appelé venetoclax a été testé dans les formes réfractaires avec délétion 17p. Il induit une rémission dans 75% des cas (Stilgenbauer et al., 2016). Cette molécule est également testée en phase 1 dans les formes réfractaires en association avec le rituximab (Seymour et al., 2017).

I.4.3. La prolifération

L'accumulation cellulaire observée chez les patients atteints de la LLC a longtemps été considérée comme étant une dérégulation du mécanisme apoptotique suite à un défaut génétique. Cela a été conforté par le fait que la grande majorité (> 98%) de cellules périphériques leucémiques sont bloquées en phases précoces (G0/G1) du cycle cellulaire et surexpriment la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Lanasa, 2010). L'hypothèse retenue pour expliquer ce phénomène serait que les gènes contrôlant ce cycle sont dérégulés. En effet, dans ces cellules, la protéine p27^{Kip1} (p27), un inhibiteur de kinases dépendantes du cycle cellulaire, est surexprimé ce qui expliquerait le blocage en phase G0/G1 (Vrhovac et al., 1998).

Par la suite, d'autres études ont montré qu'il existe une part proliférative dans ces cellules. Cela a été démontré par Messmer et son équipe en 2005 qui ont mis en évidence la prolifération significative des cellules de la LLC. En effet, en faisant ingérer à des patients de l'eau lourde (eau deutérée, ²H₂O) quotidiennement pendant 84 jours, ils ont étudié l'incorporation de ce radio isotope au sein des cellules leucémiques. Ces études ont révélé que ces cellules sont plus dynamiques que ce qui avait été initialement décrit. En effet, le taux de croissance compris entre 0,1 à plus de 1% du clone par jour, conduit à évaluer que 10⁹ à 10¹⁰ nouvelles cellules leucémiques sont fabriquées par jour pour un patient qui a approximativement 10¹² cellules leucémiques (Messmer et al., 2005). De plus, ils ont proposé qu'un taux de prolifération supérieur à 0,35% serait suffisant pour permettre l'apparition de nouveaux clones et la progression rapide de la maladie (Messmer et al., 2005). Il a été également montré que la fraction cellulaire CD38⁺ isolée à partir des patients recevant de l'eau deutérée, est beaucoup plus proliférante que la fractions CD38⁻ (Calissano et al., 2009). De plus, ces cellules expriment de façon significative des facteurs de prolifération tels que ZAP-70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70 kDa*), Ki67 ou la télomérase comparé aux cellules CD38⁻ (Damle et al., 2007).



L'expression des marqueurs d'activation cellulaire comme par exemple CD49d et CD69, est retrouvée dans beaucoup de LLC. De plus, le statut non muté des IgVH suite à une stimulation du BCR est associé à une capacité proliférative importante, indiquant un lien entre la biologie cellulaire de la maladie et les pronostics (Lanasa, 2010). L'autre étude qui apporte une preuve supplémentaire sur l'activité proliférative des cellules leucémiques, est l'analyse de la longueur des télomères. En effet, il a été montré que les cellules leucémiques ont des télomères plus courts que les lymphocytes B normaux démontrant ainsi une augmentation de leur prolifération (Rampazzo et al., 2012; Sellmann et al., 2011; Véronèse et al., 2013).

I.4.4. La voie de signalisation du BCR

I.4.4.1. La signalisation B

Le récepteur pour l'antigène des cellules B (BCR) est constitué d'une immunoglobuline membranaire (mIg) associée au CD79a et CD79b, contenant des motifs ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) nécessaires à l'activation de sa signalisation intracellulaire (Reth, 1989). Suite à la fixation de l'antigène, l'activation du BCR se traduit par une phosphorylation des motifs ITAM par la kinase Lyn (de la famille des Src) (Figure 4). Cette phosphorylation permet la transduction du signal par le BCR, activé suite à la phosphorylation de son domaine kinase, par le recrutement de la protéine kinase Syk (*Spleen Tyrosine Kinase*) (Dal Porto et al., 2004). L'activation de Syk est une étape importante dans la signalisation du BCR. En effet, elle permet la formation d'un complexe protéique de signalisation appelé « signalosome ». Ce dernier, implique la protéine Syk elle-même, la PLC γ 2 (*Phospholipase C γ 2*), la PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*), la BTK (*Bruton's Tyrosine Kinase*), VAV1 (*VAV guanine nucleotide exchange factor 1*) et des molécules adaptatrices, comme BLNK (*B-cell Linker protein*) (Kurosaki, 2002; Dal Porto et al., 2004; Scharenberg et al., 2007) (Figure 4). Ce signalosome active ensuite différentes protéines des voies de prolifération et de survie comme les MAPKs, NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) ou NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) (Avalos et al., 2014).



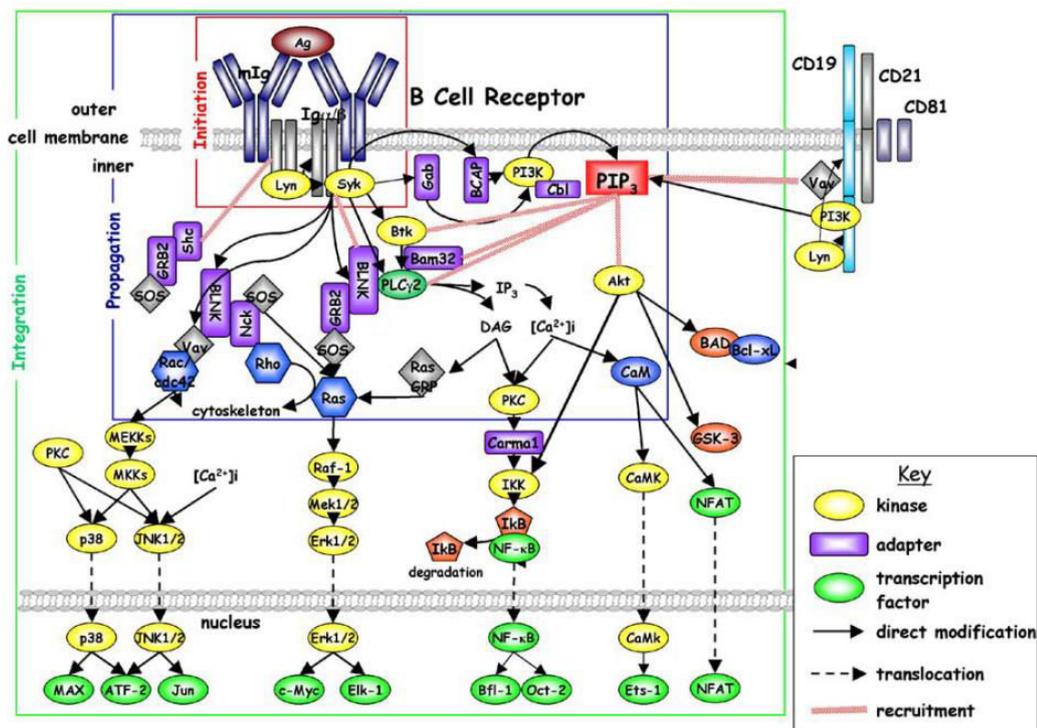


Figure 4 : Représentation schématique des voies de signalisation intracellulaires activées par le BCR. BCR: *B-cell receptor*; BLNK: *B-cell linker protein*; BTK: *Bruton's tyrosine kinase*; DAG: *Diacylglycerol*; GSK: *Glycogen synthase kinase*; IP₃: *Inositol-1,4,5-trisphosphate*; NFAT: *Nuclear factor of activated T cells*; PIP₃: *Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*; PLCγ2: *Phospholipase-Cγ2*; SYK: *Spleen tyrosine kinase* (d'après Dal Porto et al., 2004).

I.4.4.2. La signalisation du BCR dans la LLC

La voie de signalisation du BCR est essentielle à la survie, à la prolifération et aux interactions avec le microenvironnement (Herishanu et al., 2011). La signalisation du BCR en l'absence ou en présence de stimuli a été largement étudiée dans les cellules leucémiques pendant les dernières décennies. Les cellules B de la LLC présentent une activation intrinsèque plus élevée du BCR (signalisation tonique de BCR), comparées aux cellules B normales. De plus, des études ont montré que la protéine ZAP-70, qui est absente dans la voie de signalisation B normale est impliquée dans la LLC en stimulant la signalisation du BCR *via* une augmentation des flux calciques et en activant diverses kinases dont BTK (Chen et al., 2002). La plupart des cellules leucémiques montrent une phosphorylation constitutive de Syk et NF-κB (Gobessi et al., 2009; Herishanu et al., 2011) alors que la phosphorylation constitutive de ERK est présente dans près de la moitié des cas de LLC (Muzio et al., 2008).

La réactivité de la stimulation par le BCR est également associée au statut mutationnel IgVH. En effet, dans le cas d'une LLC avec des gènes *IgVH* non mutés et de mauvais pronostic, les cellules affichent une plus grande réactivité à la stimulation du BCR qui conduit de façon prédominante à une activation et une prolifération, tandis que les



cellules leucémiques avec des gènes *IgVH* mutés dans le cas d'une maladie indolente présentent une réactivité du BCR plus faible et moins fréquente qui induit des réponses anergiques et anti-apoptotiques (Lanasa, 2010; Stevenson et al., 2011). En outre, la stimulation par l'IgM de surface des cellules leucémiques peut entraîner ou prévenir l'apoptose tandis que la stimulation par l'IgD de surface empêche toujours l'apoptose (Bernal et al., 2001; Zupo et al., 2000). Enfin, cette voie de signalisation fait l'objet de plusieurs études notamment dans le développement de nouvelles thérapies ciblées, dans le but d'inhiber les protéines impliquées dans la signalisation comme par exemple l'ibrutinib et l'idélalisib. Ces thérapies ciblant la BTK sont utilisées chez des patients en rechute et/ou naïfs. L'ibrutinib, un inhibiteur de BTK de première génération, a démontré une activité significative chez les patients atteints de la LLC en rechute ainsi que chez les patients naïfs; son utilisation est cependant limitée par l'importance des effets indésirables. L'acalabrutinib, inhibiteur de BTK de seconde génération, est efficace dans la LLC en rechute (taux de réponse de 95%) et semble avoir un meilleur profil de tolérance (Byrd et al., 2016).

I.4.5. Le microenvironnement

La résistance à l'apoptose *in vivo*, qui caractérise la maladie, et à l'inverse l'augmentation de l'apoptose spontanée lorsque les cellules sont cultivées *ex vivo*, impliquent le rôle important que joue le microenvironnement dans ces mécanismes. Ce dernier, contient principalement des MSCs (*Mesenchymal Stromal Cells*) dans les niches vasculaires de la moelle osseuse, des NLCs (*Nurse Like Cells*), des lymphocytes T et des cellules dendritiques folliculaires dans les organes lymphoïdes secondaires (Lanasa, 2010). Les MSCs qui sont retrouvées dans les tissus lymphoïdes secondaires sécrètent systématiquement des chimiokines qui recrutent les cellules leucémiques (Choi et al., 2016). Il a été démontré que le contact direct des MSCs avec les cellules leucémiques, ne permet pas seulement la survie et la prolifération des cellules leucémiques, mais ils favorisent également un changement métabolique des cellules leucémiques en augmentant la synthèse du glutathion et la glycolyse à travers l'axe NOTCH1-c-Myc, qui à son tour, affecte la survie cellulaire et la résistance aux traitements (Jitschin et al., 2015; Purroy et al., 2015) (Figure 5).



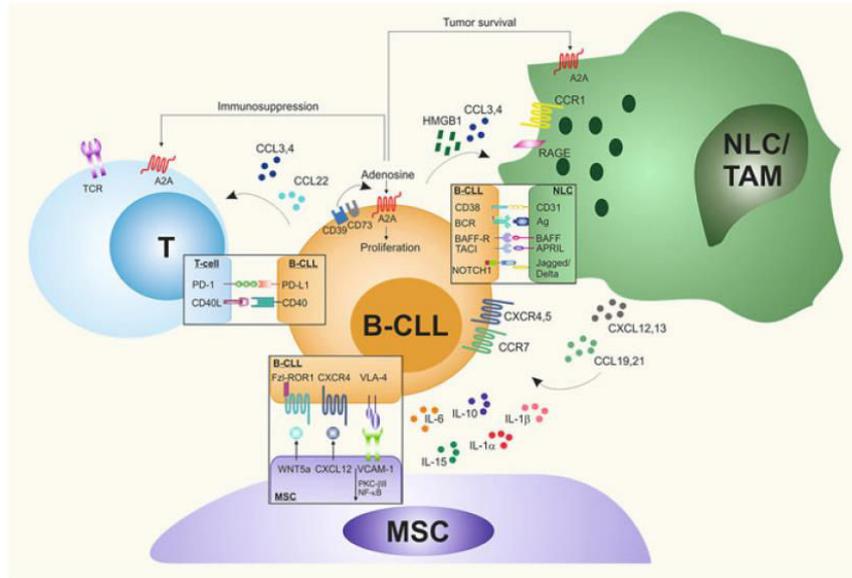


Figure 5 : Microenvironnement des cellules leucémiques.

Dans les niches lymphoïdes, les cellules B de la LLC interagissent avec de multiples partenaires, tels que les NLCs, les MSCs et les lymphocytes T (d'après Arruga and Deaglio, 2017).

En outre, plusieurs études mettent l'accent sur la voie de pro-survie Wnt5a/ROR1 (*Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor 1*) et montrent que les niveaux d'expression élevés de Wnt5a et ROR1 sur les MSCs et les cellules leucémiques respectivement, sont fréquemment associés à une progression rapide de la maladie (Cui et al., 2016; Fukuda et al., 2008). Les NLCs qui sont semblables aux macrophages associés aux tumeurs (TAMs), sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse des patients atteints de la LLC (Filip et al., 2013). Les NLCs soutiennent les cellules leucémiques à travers les molécules d'adhésion et sécrètent des chimiokines et des cytokines, incluant BAFF (*B-cell Activating Factor*) et APRIL (*A Proliferation-Inducing Ligand*) (Figure 5). Cette interaction permet la régulation positive des gènes anti-apoptotiques tels que *BCL2*, *SURVIVIN*, *BCL2A1* (*BCL2 Related Protein A1*) et *XIAP* (*X-Linked Inhibitor Of Apoptosis*) qui permet l'échappement à l'apoptose spontanée induite en favorisant la survie des cellules leucémiques (Arruga and Deaglio, 2017). Ces dernières sont également en contact avec les lymphocytes T dans les niches lymphoïdes. Ces lymphocytes T interviennent *via* l'axe CD40/CD40L qui protège les cellules leucémiques de l'apoptose en augmentant positivement les facteurs de pro-survie et anti-apoptotiques (Audrito et al., 2013; Gricks et al., 2004).

D'autres études ont montré un rôle important de l'axe PD-1/PD-L1 (*Programmed cell Death-1/Programmed cell Death-Ligand 1*) dans la survie et l'expansion de la LLC (Brusa et al., 2013). En effet, l'interaction entre PD-1, exprimée par les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺, et



PD-L1 exprimé sur les cellules leucémiques (Figure 5) conduit à une cytotoxicité altérée qui contribue à la génération d'un microenvironnement immunosuppresseur favorisant d'avantage la survie et l'expansion des cellules leucémiques (Arruga and Deaglio, 2017). Ces interactions entre les cellules leucémiques et l'ensemble de ces éléments favorisent l'établissement progressif d'un environnement anormal qui soutient la prolifération et la survie des cellules leucémiques et en les protégeant de la chimiothérapie, maintient un stock de cellules pouvant accumuler de nouvelles lésions génétiques à partir desquelles une rechute de la maladie peut se produire (Audrito et al., 2013)

I.5. Les signes cliniques

La plupart des patients atteints de la LLC sont complètement asymptomatiques et ignorent le diagnostic. Dans la majorité des cas, la LLC est découverte de manière fortuite, lors d'un hémogramme de routine et est confirmée trois mois plus tard (Ghia et al., 2007). Chez une minorité de patients symptomatiques, les caractéristiques cliniques comprennent la fatigue, les sueurs nocturnes, la perte de poids, la fièvre, des infections fréquentes, des saignements, des adénopathies, une hépato-splénomégalie. Chez quelques rares patients, les cellules leucémiques peuvent induire une réaction auto-immune contre les hématies et les plaquettes entraînant la destruction de celles-ci et générer un tableau associé de purpura thrombopénique immunologique ou d'anémie hémolytique auto-immune (Munir, 2015). De rares cas d'érythroblastopénies auto-immunes ont également été décrits en association à la LLC.

I.6. Le diagnostic

Selon l'IWCLL (*International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*), le diagnostic de la LLC est établie par une numération formule sanguine (NFS) montrant une lymphocytose B ≥ 5000 lymphocytes/ μ L persistant au moins 3 mois, un frottis sanguin avec de petits lymphocytes morphologiquement matures et un immunophénotypage caractérisé par la co-expression de l'antigène CD5 et les marqueurs de surface des cellules B CD19, CD20 et CD23, ainsi que l'expression des chaînes légères d'immunoglobuline kappa ou lambda (Cramer et al., 2016; Hallek et al., 2008). Ainsi 95% des LLC sont diagnostiquées comme étant de type B (LLC-B), tandis que les LLC à lymphocytes T représentent moins de 5% des LLC (Schriever and Huhn, 2003). Dans la majorité des cas, l'hémogramme et l'immunophénotypage suffisent au diagnostic de la LLC.



I.6.1. La numération formule sanguine (NFS)

Au niveau de l'hémogramme, une lymphocytose B $\geq 5000/\mu\text{L}$ sans anémie ni thrombopénie associée sera le plus souvent retrouvée. Cette hémopathie est le plus souvent découverte au cours d'un examen systématique chez un patient sans symptômes apparents (Kikushige et al., 2011). Les cellules leucémiques observées sur les frottis sanguins ont les caractéristiques morphologiques de petits lymphocytes matures avec peu de cytoplasme et un noyau dense, sans nucléole, ayant une chromatine partiellement agrégée. (Figure 6). La présence de cellules lysées et réduites à une « ombre nucléaire » ou ombre de Gümprécht, correspondant à un artefact survenant lors de la réalisation des frottis de sang, est caractéristique de la LLC (Hallek et al., 2008).

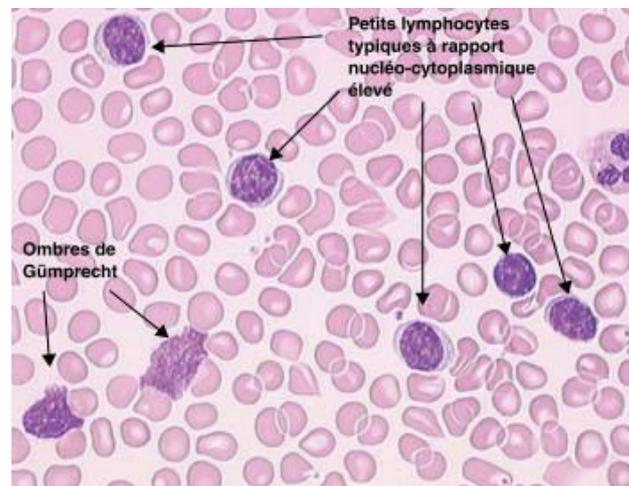


Figure 6 : Lymphocytes leucémiques sur un frottis sanguin.
(d'après Evrard et al., 2005)

I.6.2. L'immunophénotypage

L'immunophénotypage est déterminé à partir des lymphocytes sanguins, par cytométrie en flux. Les cellules leucémiques sont caractérisées par la co-expression de l'antigène CD5 des cellules T, des antigènes de surface CD19, CD20, CD23 des lymphocytes B, ainsi que par l'expression de chaînes légères d'immunoglobulines kappa ou lambda démontrant ainsi le caractère clonal de la LLC (Cramer et al., 2016). Ces cellules sont caractérisées par une expression positive de CD19, CD20, CD24, CD23 et CD5, une faible expression des chaînes légères d'immunoglobulines de surface (kappa ou lambda) ainsi que le CD79b et par une absence d'expression de FMC7. L'expression de CD23 permet de différencier la LLC d'autres syndromes lympho-prolifératifs B.

Le score de Matutes est basé sur la détermination des cinq marqueurs : CD5, CD23, CD79b ou CD22, FMC7 et une immunoglobuline membranaire (Matutes et al., 1994). Ce



score varie de 0 à 5 selon l'expression des différents antigènes (Tableau 2). Un score de 4 ou 5 est en faveur du diagnostic de la LLC et élimine les autres causes d'hyperlymphocytose. Un score à 3 correspond généralement à une «LLC atypique». Les scores ≤ 3 permettent de caractériser les autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques B. Un score inférieur à 3 exclut formellement le diagnostic de la LLC (Matutes et al., 1994; Moreau et al., 1997).

Tableau 2 : Le score de Matutes pour le diagnostic de la LLC.

Antigène	1 point	0 point
Ig de surface monotypique	Expression Faible	Expression Forte
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
FMC7	Négatif	Positif
CD22 ou CD 79b	Expression faible	Expression forte

(d'après Herishanu and Polliack, 2005)

I.7. L'évolution de la maladie

Dans la plupart des cas, il s'agit d'une maladie indolente sur de nombreuses années d'évolution lente et progressive. Toutefois, il existe une hétérogénéité dans l'évolution, et un certain nombre de patients vont avoir une évolution fatale plus rapide. Outre la progression de la masse tumorale, l'évolution peut être émaillée par plusieurs types de complications. Les complications les plus fréquemment observées sont les infections (première cause de mortalité dans la maladie), une aggravation de l'insuffisance médullaire, les complications auto-immunes, l'évolution en syndrome de Richter (5%) qui correspond à la survenue d'un lymphome de haut grade, et une augmentation de l'incidence des tumeurs solides.

I.7.1. Les complications infectieuses

Ce sont les complications les plus fréquentes qui représentent la première cause de morbidité et de mortalité des patients atteints de la LLC. Ces derniers, présentent un risque majeur d'infection en raison d'une immunodépression secondaire liée à une hypogammaglobulinémie, une neutropénie, un défaut d'optionisation et un dysfonctionnement des lymphocytes T et/ou aux conséquences de la thérapie immunosuppressive (Molica, 1994; Morrison, 2010; Young, 2011). Les infections bactériennes à germes encapsulés sont les plus fréquentes, mais les infections fongiques et herpétiques tendent à augmenter avec l'utilisation des traitements comme par exemple, les analogues de la purine, les biothérapies ciblant le CD52 ou le CD20 (respectivement



alemtuzumab et rituximab), les agents alkylants ou les combinaisons de ces médicaments. Un risque majeur d'infection bactérienne et de réactivation virale a été démontré jusqu'à 2 ans après des combinaisons d'immunochimiothérapie intensive comme la FCR (fludarabine [F], cyclophosphamide [C], et rituximab [R]) (Hallek et al., 2008).

I.7.2. Les complications auto-immunes

L'évolution de la LLC est fréquemment compliquée par des cytopénies auto-immunes. La plus fréquente est l'anémie hémolytique auto-immune (AIHA), suivie par le purpura thrombopénique immunologique, (Strati and Caligaris-Cappio, 2011). Ces deux syndromes peuvent être présents séparément, séquentiellement chez le même patient ou en association comme dans le cas du syndrome d'Evans. Il peut également exister une érythroblastopénie (*PRCA, Pure Red-Cell Aplasia*) et plus rarement une granulocytopénie auto-immune (*AIG, Autoimmune Granulocytopaenia*) qui peuvent être présentes seules ou en association avec d'autres cytopénies auto-immunes. La PRCA se présente comme une anémie non hémolytique arégénérative par destruction des cellules progénitrices hématopoïétiques. L'AIG est similaire à la PRCA dans laquelle les précurseurs myéloïdes sont détruits conduisant au développement d'infections chez les patients (Strati and Caligaris-Cappio, 2011). Selon des études récentes, le risque global de complications auto-immunes est de 5-10% chez les patients atteints de LLC (Zent and Kay, 2010).

I.7.3. Les transformations

La LLC est généralement stable durant des mois ou des années, mais dans une faible proportion des cas elle peut se transformer en formes plus agressives. Ces transformations incluent le lymphome diffus (Syndrome de Richter, RS), la transformation polymphocytaire, et plus rarement la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) (Foon and Gale, 1988). Le RS survient dans environ 5% des LLC (Tsimberidou and Keating, 2005) et est confirmé par une biopsie ostéo-médullaire ou par une biopsie-exérèse ganglionnaire. La présentation clinique associe une fièvre hectique non infectieuse, des adénopathies rapidement progressives et une augmentation du taux de l'actate déshydrogénase (LDH). Le temps médian entre le diagnostic de la LLC et l'apparition d'un RS est de l'ordre de 3,7 ans (de 0,2 à 6,7 ans) (Rossi et al., 2012). Le pronostic est sombre, en particulier chez les patients ayant un RS classique. Les options thérapeutiques sont limitées et incluent les traitements chimiothérapeutiques développés pour le DLBCL (*Diffuse Large B-cell Lymphoma*) *de novo* ou la LAL. La plupart des patients atteints de RS ne répondent pas à la chimiothérapie intensive ou aux nouveaux traitements utilisés dans la LLC ou le NHL (*Non-Hodgkin Lymphoma*), et la médiane de survie varie de 5 à 8 mois (Tsimberidou et al., 2002).



I.7.4. Les cancers solides associés

Les patients atteints de la LLC ont un risque plus élevé de développer d'autres cancers comparé aux sujets témoins du même âge et du même sexe (Scarfò et al., 2016). Ces cancers sont retrouvés souvent chez les hommes plus âgés. Des études ont rapporté que les cancers associés les plus fréquents étaient les cancers de la peau, de la prostate, le cancer du sein, le mélanome, le lymphome, les cancers gastro-intestinaux et pulmonaires (Scarfò et al., 2016). Plusieurs mécanismes ont été discutés pour l'association entre les deuxièmes cancers et la LLC, notamment le rôle de l'immunosuppression liée à la maladie et aux traitements (Molica, 2005; Morton et al., 2010).

I.8. Les facteurs pronostiques

Compte tenu de l'évolution clinique très variable de la LLC d'un patient à l'autre, de multiples facteurs pronostiques ont été recherchés depuis des décennies. Ces derniers, ont permis de classer les patients en différents groupes pour un meilleur suivi et une optimisation de la réponse thérapeutique.

I.8.1. Les facteurs pronostiques classiques

I.8.1.1. Les classifications clinico-biologiques

La LLC est actuellement classée selon des groupes pronostiques, basés sur des systèmes de classifications cliniques, développés par Rai et Binet en 1975 et 1981 respectivement (Binet et al., 1981; Rai et al., 1975). Les deux s'appuient sur des paramètres cliniques tels que l'étendue des adénopathies, l'hépatosplénomégalie, l'anémie et la thrombocytopenie. (Arruga and Deaglio, 2017).

I.8.1.1.1. La classification de Rai

La classification de Rai est très utilisée aux États-Unis depuis 1975. Elle consiste à une classification pronostique en cinq stades (Stade 0 à IV) (Tableau 3) basée sur la survie globale (SG) médiane la plus courte (Rai et al., 1975; Scarfò et al., 2016). Par la suite, cette dernière a été modifiée pour réduire le nombre de groupes pronostiques de 5 à 3, regroupant 3 catégories de risques (Tableau 4) (Hallek, 2015; Scarfò et al., 2016).



Tableau 3 : Classification de Rai.

Stades	Caractéristiques	Survie médiane (mois)
0	Lymphocytose sanguine et médullaire isolée	> 150
I	Lymphocytose et adénopathies	101
II	Lymphocytose et splénomégalie et ou hépatomégalie	71
III	Lymphocytose et anémie (Hb < 11g/dL)	19
IV	Lymphocytose et thrombopénie (Plt < 100 000/mm ³)	19

Tableau 4 : Modification de la classification de Rai.

Risques	Caractéristiques
Faible	Lymphocytose sanguine et médullaire isolée (Stade 0)
Intermédiaire	Lymphocytose et adénopathies (Stade I) et/ou hépatosplénomégalie (Stade II)
Elevé	Lymphocytose et anémie (Stade III) et/ou thrombopénie (Stade IV)

(d'après Scarfò et al., 2016)

Selon ce système révisé, les patients atteints de lymphocytose avec des cellules leucémiques dans le sang et/ou la moelle (cellules lymphoïdes > 30%) (Stade Rai 0), présentent une maladie à faible risque. Les patients avec une lymphocytose, des adénopathies et une splénomégalie associées ou non à une hépatomégalie, sont définis comme ayant une maladie à risque intermédiaire (stade Rai I ou Rail II). Les patients à haut risque sont atteints d'une anémie (taux d'hémoglobine (Hb) < 11 g/dL) (stade Rai III) ou d'une thrombocytopénie (nombre de plaquette (Plt) < 100000/mm³) (stade Rai IV) (Hallek, 2015).

I.8.1.1.2. La classification de Binet

La classification de Binet est largement utilisée en Europe depuis 1981. Elle consiste à une classification pronostique en 3 stades (stade A, B, et C) (Tableau 5) et elle est basée sur le nombre d'aires ganglionnaires atteintes au moment de l'examen physique (aires cervicales, axillaires et inguinales, hépatomégalie, splénomégalie) (Figure 7) et les valeurs de l'hémogramme (Scarfò et al., 2016).

Tableau 5 : Classification de Binet.

(d'après l'institut national du cancer)

Stades	Caractéristiques
A	Pas d'anémie (Hb > 10 g/dl) ni de thrombopénie (Plt > 100 000/mm ³), aires ganglionnaires atteintes <3
B	Pas d'anémie (Hb > 10 g/dl) ni de thrombopénie (Plt > 100 000/mm ³), aires ganglionnaires atteintes >3
C	Anémie (Hb < 10 g/dl) et/ou thrombopénie (Plt < 100 000/mm ³), quelques soit le nombre d'aires ganglionnaires atteintes



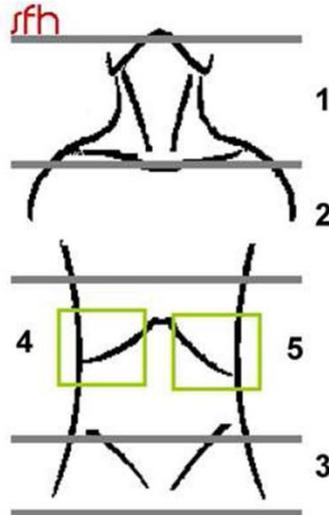


Figure 7 : Les aires ganglionnaires palpables.

Dans cette classification, la notion d'aire ganglionnaire est bilatérale : par exemple des adénopathies axillaires droite et gauche constituent une aire ganglionnaire atteinte (d'après la Société Française d'Hématologie).

Ces deux systèmes ont permis de distinguer trois grands groupes de patients ayant des pronostics distincts : des stades précoces (Rai 0 et Binet A), intermédiaires (Rai I/II, Binet B) et avancés (Rai III/IV, Binet C) avec une moyenne de survie (Figure 8) estimée respectivement à : supérieure à 10 ans, de 5 à 7 ans et entre 2 à 4 ans. (Binet et al., 1981; Montserrat, 2006; Rai and Montserrat, 1987; Rai et al., 1975). Cependant ces classifications ne permettent pas d'identifier, parmi les patients de stade précoce avec un bon pronostic, ceux qui auront une évolution rapide. A l'inverse, pour les patients avec une maladie plus avancée, ces systèmes ne distinguent pas les patients qui resteront stables. De plus, il a été montré qu'au cours de l'évolution de la maladie, environ 27% de patients en stade A décèdent de causes liées à la LLC, que 40% des patients en stade A progressent aux stades B et C, et que 50% ont besoin de traitements (Dighiero et al., 1998). Malgré leurs hautes valeurs pronostiques, ces classifications clinico-biologiques ne tiennent pas compte des caractéristiques biologiques et moléculaires connues des cellules de la LLC qui pourraient également prédire la survie et la réponse au traitement (Cramer and Hallek, 2011; Kay et al., 2007). En effet, plusieurs marqueurs pronostiques sont utilisés en pratique clinique pour améliorer la classification des patients et suivre leur évolution afin d'envisager une thérapeutique adaptée.



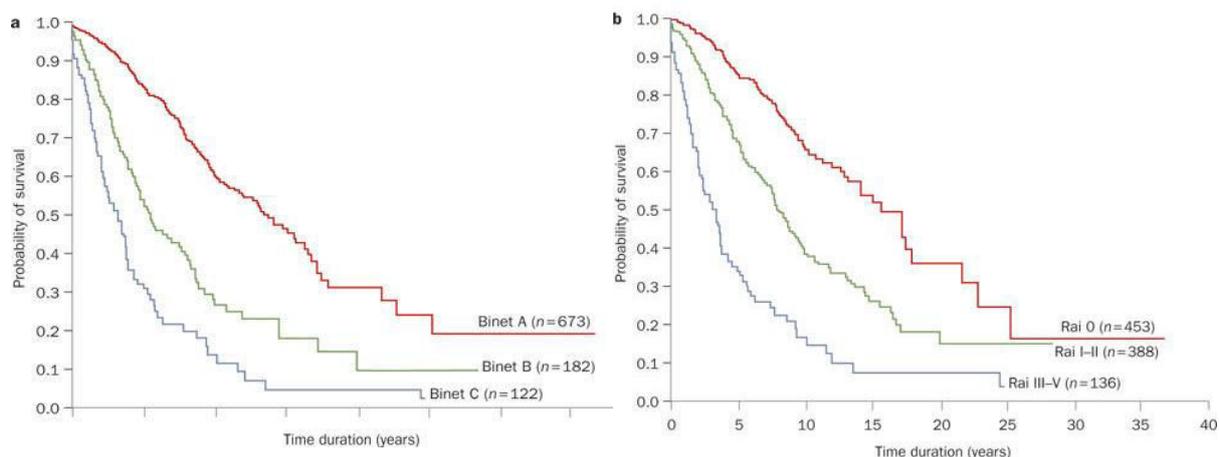


Figure 8 : Survie globale (SG) des patients atteints de la LLC selon la classification de Rai (histogramme de droite) et de Binet (histogramme de gauche). (d'après Montserrat, 2006)

I.8.1.2. Le temps de doublement lymphocytaire (TDL)

Le TDL est défini comme la durée nécessaire pour que le nombre absolu de lymphocytes observé au moment du diagnostic soit multiplié par deux reflétant ainsi l'activité de la maladie. En effet, un TDL de moins de 12 mois est associé à un pronostic défavorable avec une survie sans progression (PFS) considérablement réduite et une SG diminuée. Par contre, une augmentation du nombre de lymphocyte de plus de 50% en moins de 2 mois ou un TDL de moins de 6 mois indique une progression rapide de la maladie qui nécessite un traitement. Il faut souligner que l'utilisation du TDL comme critère pour le début du traitement ou pour le pronostic est recommandé uniquement lorsque le nombre de lymphocytes est > 30000 lymphocytes/ μ L. L'évaluation du TDL, simple et peu coûteuse est un outil fiable pour l'évaluation de l'activité de la maladie chez les patients en stade précoce. (Cramer and Hallek, 2011).

I.8.1.3. Les marqueurs sériques

Plusieurs études ont révélé que trois marqueurs sériques, la β 2-microglobuline (β 2-m), la thymidine kinase (TK) et le CD23 soluble peuvent prédire la SG ou la PFS (Cramer and Hallek, 2011; Hallek et al., 2008). Contrairement à d'autres néoplasies lymphoïdes, le taux LDH sérique s'est révélé moins important chez les patients atteints de la LLC. En pratique clinique, seuls les LDH et la β 2-m sont couramment dosés.

La β 2-m est une protéine extracellulaire appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Sa forme soluble est détectable dans le sérum et constitue un facteur pronostique indépendant (Hallek et al., 1999). Un taux élevé de β 2-m chez les patients présentant une LLC est corrélé avec un stade avancé de la maladie, une



masse tumorale élevée et une infiltration ganglionnaire et médullaire. Une augmentation de sa concentration est généralement associée à une survie sans traitement courte et une mauvaise réponse à la chimiothérapie. (Delgado et al., 2009; Gentile et al., 2009; Montillo et al., 2005). De plus, les taux de β 2-m sont corrélés avec l'expression des marqueurs CD38 et ZAP-70, deux autres facteurs pronostiques défavorables (Heintel et al., 2001; Schroers et al., 2005). Même si la β 2-m reste un bon facteur pronostique, il faut prendre certaines précautions. En effet, son élimination rénale dépend du débit de filtration glomérulaire (DFG) et par conséquent, elle peut être augmentée artificiellement lors d'une insuffisance rénale. Ainsi, la valeur prédictive de ce facteur pronostique serait améliorée si on ajustait la β 2-m au DFG (Cramer and Hallek, 2011).

I.8.1.3.1. La thymidine kinase (TK)

La TK est une enzyme impliquée dans le contrôle de la synthèse de l'ADN. Sa forme prédominante, est retrouvée en particulier dans les cellules en division, ce qui en fait un marqueur de l'activité proliférative. Ainsi, dans la LLC, un taux sérique élevé de la TK est de mauvais pronostic, corrélé avec à une progression rapide et aux stades avancés de la maladie (Cramer and Hallek, 2011; Hallek et al., 1999; Montillo et al., 2005). Une concentration plasmatique élevée peut également être un facteur prédictif de la mauvaise réponse au traitement (Di Raimondo et al., 2001). Chez certains patients stade A de Binet, des taux élevés de la TK sont corrélés à d'autres marqueurs pronostiques tels que le TDL, l'expression lymphocytaire de CD38 et de ZAP-70, le CD23 soluble, les anomalies cytogénétiques et le statut IgVH (Matthews et al., 2006). Il faut noter également que l'utilisation de ce facteur pronostique reste limitée car sa spécificité n'est pas parfaite. En effet, l'activité de la TK peut être augmentée lors d'une carence en vitamine B12 ou d'infections virales. (Hallek et al., 1992).

I.8.1.3.2. Le CD23 soluble

Le CD23 est un récepteur à faible affinité pour les IgE. Il est exprimé sur les cellules B matures, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les plaquettes, mais aussi, sur les cellules B leucémiques. Sa forme soluble se comporte comme un facteur de croissance, induisant la prolifération des lymphocytes B normaux et leucémiques (Molica et al., 1996; Sarfati et al., 1996). Son expression sérique est en corrélation avec l'infiltration médullaire diffuse, la masse tumorale et un TDL court et est associée à une progression de la maladie aux stades précoces ainsi qu'à une survie réduite (Cramer and Hallek, 2011). Son dosage pourrait également permettre le diagnostic précoce de la LLC (Kaaks et al., 2015). Le temps de doublement du taux sérique de CD23 (CD23-DT) a également été rapporté comme un



paramètre supplémentaire important dans la prédiction de la progression de la maladie et de la SG (Meuleman et al., 2008; Schwarzmeier et al., 2002).

Le principal avantage de ces différents marqueurs pronostiques sériques est la simplicité du prélèvement sanguin et la fiabilité de leur évaluation, cependant, les valeurs limites peuvent varier selon les laboratoires. Une autre limitation de ces marqueurs est que leurs niveaux sont influencés par des facteurs non liés à la LLC. (Cramer and Hallek, 2011).

I.8.2. Les autres facteurs pronostiques

I.8.2.1. Les anomalies cytogénétiques

Les anomalies cytogénétiques récurrentes observées dans la LLC sont fréquentes et impliquent par ordre décroissant les régions chromosomiques 13q, 11q, 12q, 17p et 6q. Ces anomalies peuvent être isolées ou associées entre elles et peuvent apparaître au cours de la maladie. Certaines d'entre elles, comme les délétions 11q et 17p, ont une valeur pronostique et sont prises en compte dans les choix thérapeutiques (Nguyen-Khac, 2010). L'analyse par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), permet de détecter des séquences d'ADN spécifiques sur les chromosomes, non seulement sur les chromosomes de la métaphase, mais aussi sur les noyaux des cellules interphasiques. Cette technique est actuellement l'approche standard pour l'analyse des anomalies cytogénétiques dans la LLC et permet d'identifier des anomalies dans plus de 80% des cas (Amaya-Chanaga and Rassenti, 2016; Döhner et al., 1997). À partir d'une série de 325 patients, Döhner et son équipe ont établi un modèle pronostique hiérarchique permettant d'identifier cinq groupes (Döhner et al., 2000) :

I.8.2.1.1. La délétion 13q14

La délétion impliquant la bande 13q14 est présente dans 55 à 63% des cas, selon les études, ce qui en fait l'anomalie cytogénétique la plus fréquente (Döhner et al., 2000). Elle peut résulter d'une translocation chromosomique impliquant la bande 13q14. Dans l'étude par FISH interphasique de Döhner et al., les patients avec une délétion 13q14 isolée (sans autres anomalies retrouvées par FISH) ont la meilleure SG (133 mois) et la plus longue médiane de l'intervalle sans traitement (92 mois) (Nguyen-Khac, 2010).

I.8.2.1.2. La délétion 11q22-23

La délétion de tout ou d'une partie du bras long du chromosome 11, présente dans environ 15 à 20% des cas, est classiquement associée à de volumineuses adénopathies (Döhner et al., 1997). Le gène *ATM* localisé dans la région minimale de délétion en 11q22-23 code pour une protéine qui agit en amont de p53 dans la voie de réponse aux dommages



à l'ADN. On détecte une mutation sur l'autre copie du gène dans environ 40% des cas de LLC avec délétion du gène *ATM* (Schaffner et al., 1999; Stankovic et al., 1999). Cette délétion est associée à un mauvais pronostic, avec une progression rapide de la maladie et une SG diminuée (Döhner et al., 2000).

I.8.2.1.3. La trisomie 12

On observe la trisomie 12 dans 11 à 25% des cas (Döhner et al., 2000; Juliusson et al., 1990). Il semblerait que les patients avec une trisomie 12 isolée présentent une progression rapide de la maladie, mais la SG n'est pas diminuée (Döhner et al., 2000). La trisomie 12 serait plus fréquente dans les LLC « atypiques » sur le plan cytologique, ou sur le plan immunophénotypique (Matutes et al., 1996). L'observation de rares duplications partielles du chromosome 12 a permis de définir une zone minimale de duplication en 12q13-q15 (Gahrton et al., 1982).

I.8.2.1.4. La délétion 17p13 et mutation de p53

La délétion entière ou d'une partie du bras court du chromosome 17 est observée dans 6 à 10% des cas et est responsable de la perte du gène suppresseur de tumeur *TP53* (*Tumor Protein p53*), localisé en 17p13 (Döhner et al., 2000; Juliusson et al., 1990). La délétion du gène *TP53* est associée à un mauvais pronostic, avec une SG courte, et à une résistance à certaines thérapeutiques comme la fludarabine (Döhner et al., 2000; Zenz et al., 2009). Le gène *TP53* code pour une protéine qui joue un rôle essentiel en induisant l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire après un dommage de l'ADN. Dans plus de 90% des LLC avec délétion du gène *TP53*, l'autre copie du gène est mutée (Fenaux et al., 1992; Malcikova et al., 2009).

I.8.2.1.5. La délétion 6q21-23

Les délétions 6q sont observées dans 6 à 10% des LLC et leurs valeurs pronostiques sont discutées (Cuneo et al., 2004; Döhner et al., 2000). Une zone minimale de délétion a été établie en 6q21-23 (Stilgenbauer et al., 1999; Zhang et al., 2000) et aucun gène localisé dans cette région ne semble jouer un rôle majeur dans le développement de la LLC (Nguyen-Khac, 2010).

I.8.2.1.6. Les translocations impliquant les gènes des immunoglobulines : *IGH* (14q32), *IGK* (2p13) et *IGL* (22q11)

Une translocation impliquant les gènes des immunoglobulines est retrouvée dans moins de 5% des cas de LLC (Zhang et al., 2000). La translocation t(11;14)(q13;q32)



juxtapose le gène des chaînes lourdes IGH (14q32) au locus *BCL1* (11q13), entraînant l'activation constitutive du gène *CCND1* (*Cyclin D1*), la surexpression de la cycline D1 et une stimulation du cycle cellulaire (Harris et al., 1999) Cette translocation observée dans plus de 95% des lymphomes du manteau (Harris et al., 1999), est détectée dans 20% des myélomes (Avet-Loiseau et al., 1998). Malgré son existence dans la LLC, elle reste extrêmement rare.

Il est décrit par ailleurs des délétions interstitielles du bras long du chromosome 14, del(14)(q24q32), emportant la partie 3' IGH (Nagel et al., 2009; Pospisilova et al., 2007). Enfin, on peut observer des délétions 5' IGH, correspondant à la région variable du gène et reflétant très probablement des événements de recombinaison somatique physiologiques (Wlodarska et al., 2007). Les LLC typiques avec t(11;14) sont très rares. Certaines de ces LLC pouvant rester stables (hyperlymphocytose isolée) durant plusieurs années. La translocation t(14;18)(q32;q21) juxtapose les gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) (14q32) au gène *BCL2* (*BCL2, apoptosis regulator*) (18q21), avec pour conséquence moléculaire l'expression constitutive d'une protéine anti-apoptotique Bcl-2 normale.

Cette anomalie est associée au lymphome folliculaire dans environ 90% des cas. L'évolution des LLC avec t(14;18) ou variantes ne semble pas être différente des LLC classiques (Put et al., 2009). La translocation t(14;19) (q32;q13) juxtapose les gènes *IGH* au gène *BCL3* (*B-cell CLL/lymphoma 3*) (19q13), qui code pour un co-activateur de la transcription, de la famille des facteurs I-kB. Les LLC avec t(14;19) pourraient être associées à des formes agressives (Chapiro et al., 2008). Cette translocation s'observe essentiellement dans les LLC et peut donc être considérée comme spécifique. Elle est parfois observée comme anomalie isolée, mais s'accompagne le plus souvent d'autres anomalies, en particulier d'une trisomie 12 (McKeithan et al., 1997; Michaux et al., 1996). La translocation t(2;14)(p13;q34) implique les gènes *IGH* et *BCL11A* (2p13). Cette anomalie est rare mais récurrente décrite dans des LLC et des immunocytomes. Ces LLC avec translocation t(2;14)(p13;q34) sont rapidement progressives (Satterwhite et al., 2001; Yoffe et al., 1990).

Les aberrations chromosomiques, telles que les délétions 8p, 14q et 15q, l'amplification 8q, le gain 2p, et les trisomies 18 et 19, sont également retrouvées dans la LLC (Edelmann et al., 2012). Cependant, ces aberrations présentent une faible incidence et manquent de valeur pronostique indépendante. Le gain du chromosome 2p est néanmoins associé avec une surexpression du gène *XPO1* (*Exportine 1*), une progression de la maladie et une résistance aux traitements (Chapiro et al., 2010; Cosson et al., 2017). La duplication du chromosome 2p se produit chez 5% des patients atteints de la LLC à un stade précoce



(Chapiro et al., 2010), bien que cette fréquence augmente à 28% dans les derniers stades de la maladie. Les deux régions les plus souvent dupliquées incluent les gènes *REL*, *BCL11A* (B-cell CLL/lymphoma 11A), *XPO1* et *MYCN* (Chapiro et al., 2010; Pfeifer et al., 2007). D'autres régions ciblées par les changements récurrents du nombre de copies à faible incidence incluent les duplications 8q24, les délétions 15q15.1 (4% des cas) et 3p21 (3% des cas) avec *c-MYC*, *MGA* (*MGA*, *MAX dimerization protein*) et *SETD2* (*SET domain containing 2*) comme gènes associés respectivement (Edelmann et al., 2012; Parker and Strefford, 2016). Les anomalies chromosomiques récurrentes dans la LLC sont résumées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Anomalies chromosomiques récurrentes dans la LLC.

Anomalies	Fréquences (%)	Gènes associés	Processus cellulaires affectés	Pronostic
dél(13q14)	50	<i>miR15A/miR16-1</i> , <i>DLEU2</i> , <i>RB1</i> , <i>DLEU7</i>	Régulation de l'expression de Bcl-2, control du cycle cellulaire, signalisation NF-κB	Bon
Trisomie 12	20	Inconnu	Inconnu	Bon/Intermédiaire
dél(11q22-23)	6-20	<i>ATM</i> , <i>BIRC3</i>	Réparation de l'AND, signalisation NF-κB	Mauvais
dél(17p13)	5-10	<i>TP53</i>	Perte des suppresseurs de tumeurs	Mauvais
dél(6q21)	5-7	<i>ZNF292</i>	Régulation transcriptionnelle	Inonnu
Gain 2p	5-28	<i>XPO1</i> , <i>REL</i> , <i>BCL11A</i> , <i>MYCN</i>	Fabrication de l'ARN, signalisation NF-κB, prolifération	Mauvais
amp(8q24.21)	5	<i>MYC</i>	Prolifération, apoptose	Mauvais
dél(8p)	5	<i>TRAIL-R</i>	Apoptose	Mauvais
dél(15q15.1)	4	<i>MGA</i>	Régulation transcriptionnelle	Aucun
dél(2q37)	2	<i>SP140/SP110</i>	Régulation transcriptionnelle	Aucun
dél(3p21)	2	<i>SMARCC1/SETD2</i>	Epissage de l'ARN et réparation de l'ADN	Mauvais
dél(10q24)	2	<i>NFKB2</i>	Signalisation NF-κB	Inconnu

(d'après Ghamlouch et al., 2017)

I.8.2.2. Le statut mutationnel IgVH

Le statut mutationnel des gènes des IgVH était le premier marqueur biologique à prédire de manière significative le pronostic clinique au moment du diagnostic. L'expression des gènes *IGVH* mutés est corrélée avec une médiane de survie plus longue, comparé aux cas exprimant des *IGVH* non mutés (Hamblin et al., 1999; Hayat et al., 2006; Kröber et al., 2002; Oscier et al., 2002). Le statut IgVH permet de prédire le pronostic au moment du



diagnostic initial, indépendamment de la masse tumorale réelle. Alors que les modifications du caryotype s'effectuent tout au long de la maladie (Stilgenbauer et al., 2007; Zenz et al., 2008), le statut IgVH reste constant dans le temps (Kröber et al., 2002; Oscier et al., 2002). Étant donné que le statut mutationnel IgVH est l'un des facteurs pronostiques le plus utilisé actuellement pour inclure ou classer les patients atteints d'une LLC dans les essais cliniques, il est très important d'effectuer cette analyse d'une façon standardisée.

Les patients atteints d'une leucémie exprimant des *IGVH* avec des mutations somatiques sont susceptibles d'avoir un stade A de Binet et une dél(13q), ce qui est associé à un pronostic favorable (Kröber et al., 2002; Oscier et al., 2002). En revanche, les patients exprimant des IgVH non mutés ont tendance à avoir des stades plus avancés et une forme plus agressive de la maladie avec une rémission et une PFS plus courtes, ainsi qu'une tendance à l'acquisition d'anomalies cytogénétiques à haut risque (Kröber et al., 2002; Stilgenbauer et al., 2007). En outre, la survie des patients avec des *IGVH* non mutés est nettement plus courte quel que soit le stade de la maladie (Jelinek et al., 2001; Kröber et al., 2002). Le réarrangement d'un gène *IGVH* spécifique codé par le réarrangement du gène *IgVH3-21* représente une exception; les patients avec des cellules B exprimant le gène *IgVH3-21* ont un pronostic défavorable indépendamment de leur statut mutationnel IgVH (Ghia et al., 2008; Tobin et al., 2003). La détection du statut mutationnel IgVH est coûteuse et nécessite une certaine expertise dans l'analyse. Par conséquent, d'autres marqueurs tels que l'expression cellulaire de CD38 et de ZAP-70 en corrélation avec le statut mutationnel IgVH ont été recherchés (Damle et al., 1999; Orchard et al., 2004).

I.8.2.3. L'expression de CD38

Le CD38 est une glycoprotéine transmembranaire qui est régulée par le microenvironnement tumoral et peut fonctionner comme un récepteur ou une enzyme (Damle et al., 1999; Orchard et al., 2004). Dans la LLC, l'expression élevée de CD38 est associée à plusieurs facteurs de pronostiques défavorables, généralement un stade avancé de la maladie, une incidence plus élevée de lymphadénopathies et d'hépatomégalie, une cytogénétique à haut risque, un taux élevé de β 2-m, un temps court pour l'initiation du premier traitement, une mauvaise réponse au traitement et une survie sans progression et globale plus courte (Oscier et al., 2013; Rassenti et al., 2008; Wang et al., 2011). L'expression de CD38 a été proposée comme marqueur de substitution pour le statut mutationnel IgVH, car les cellules leucémiques présentant des gènes *IGVH* non mutés expriment fortement le CD38 (Damle et al., 1999; Ghia et al., 2003). Cependant, l'association entre l'expression de CD38 et le statut mutationnel IgVH n'est pas absolue (Jelinek et al., 2001) et l'expression de CD38 peut varier au cours de la maladie (Ghia et al., 2003; Ibrahim



et al., 2001). Par conséquent, l'expression de CD38 peut ne pas être un marqueur de substitution adéquat pour le statut mutationnel IgVH, mais reste néanmoins un très bon facteur de pronostic largement utilisé.

I.8.2.4. L'expression de ZAP-70

La protéine de signalisation du complexe TCR/ZAP-70, est exprimée sur les cellules leucémiques mais pas sur les lymphocytes B normaux (Chen et al., 2002). L'expression de ZAP-70 semble être constante au cours de la maladie (Crespo et al., 2003; Oscier et al., 2013) et est un facteur prédictif de la survie sans traitement, de la PFS et de la SG (Orchard et al., 2004; Rassenti et al., 2008). En outre, l'expression de ZAP-70 semble être meilleure dans la prédiction du temps du traitement initial par rapport à l'expression de CD38 et le statut mutationnel IgVH, même chez les patients présentant une maladie asymptomatique en phase précoce (Rassenti et al., 2004, 2008). Dans certains cas, l'expression du gène *IgVH3-21* est associée à l'expression positive de ZAP-70 ou à des *IGVH* mutés. En revanche, dans d'autres cas la dél(11q) ou la dél(17p) est associée à une expression presque négatif de ZAP-70 ou à des *IGVH* non mutés (Kröber et al., 2006). Les expressions de CD38 et ZAP-70 sont des facteurs pronostiques significatifs et peuvent être plus adaptées à l'analyse en routine par cytométrie de flux que l'analyse plus coûteuse et techniquement exigeante du statut mutationnel IgVH.

I.8.3. Les nouvelles mutations

I.8.3.1. NOTCH1

NOTCH1 est muté de façon récurrente chez 10 à 15% de patients atteints de la LLC; le gène code pour une protéine transmembranaire de classe I agissant comme facteur de transcription activé par le ligand. Il est impliqué dans la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Scarfò et al., 2016). Plus de 90% des mutations *NOTCH1* sont situées dans l'exon 34 provoquant une perturbation du domaine PEST (riche en proline [P], acide glutamique [E], sérine [S] et thréonine [T]) et sont fréquemment associées à la trisomie 12, au gène *IGVH* non muté, à l'évolution clinique agressive et à un haut risque de transformation en un lymphome diffus à grandes cellules B (RS) (Mansouri et al., 2013; Del Poeta et al., 2013; Rossi et al., 2012).

I.8.3.2. SF3B1

Les mutations *SF3B1* (*Splicing Factor 3b Subunit 1*) peuvent être trouvées chez environ 10% des patients atteints de LLC au moment du diagnostic et chez 17% des patients



atteints d'une maladie réfractaire à la fludarabine. Une étude suggère que seulement 6% des patients atteints d'un syndrome de Richter présentent des mutations *SF3B1* qui jouent un rôle mineur dans l'agressivité de la maladie (Rossi et al., 2011). La présence des mutations *SF3B1* conduit à un épissage anormal de l'ARN messager et à une rétention d'intron qui modifie les transcrits spécifiques impliqués dans des processus liés au cancer, comme le contrôle du cycle cellulaire, l'angiogenèse et l'apoptose (Wang et al., 2011). Certains auteurs suggèrent que les mutations *SF3B1* sont un facteur indépendant de mauvais pronostic dans la LLC et sont présentes chez les patients indépendamment d'autres marqueurs de mauvais pronostic (statut mutationnel IgVH ou l'expression de ZAP-70) (Rassenti et al., 2008). Des analyses rétrospectives ont montré que les patients atteints de la LLC avec des mutations de *SF3B1* avaient une PFS et une survie sans traitement plus longues par rapport aux patients non mutés. Cependant, les mutations *SF3B1* n'ont pas été associées à une diminution de la SG (Hallek et al., 2010).

I.8.3.3. ATM

Les mutations *ATM* sont présentes chez 25% des patients atteints de la LLC au moment du diagnostic et sont associées aux *IGVH* non mutés, à l'expression de ZAP-70 et à la dél(11q). Les premières études de génétique moléculaire de la LLC ont révélé que les délétions 11q22-q23 sont des déterminants majeurs de la LLC réfractaire (Amaya-Chanaga and Rassenti, 2016). En outre, ces délétions incluent presque toujours le gène *ATM* (Rossi et al., 2012). Les mutations du gène *ATM* se trouvent dans 30% à 40% des patients portant la dél(11q). Cependant, l'incidence de la dél(11q) chez les patients porteurs des mutations *ATM* varie de 22% à 75% (Guarini et al., 2012). Austen et al, ont proposé une classification des patients atteints de la LLC avec des mutations *ATM* en 4 catégories. Cette classification a pris en compte la présence de la délétion 11q, les délétions associées à des mutations *ATM* dans l'allèle restant et la mutation *ATM* hétérozygote ou homozygote. Les 4 catégories ont démontré que le pronostic est défavorable pour les patients présentant des dél(11q) et des mutations *ATM* comparé aux patients avec la dél(11q) seule, et aussi avec une SG diminuée par rapport aux patients sans dél(11q) (Austen et al., 2007).

I.8.3.4. MYD88

Les mutations dans le gène *MYD88* (*Myeloid Differentiation primary response 88*) ont été trouvées dans 3% à 5% des LLC. Contrairement aux patients atteints de mutations *NOCTH1*, *SF3B1*, *TP53* et *ATM*, les patients présentant des mutations *MYD88* ont des pronostics favorables. Les mutations *MYD88* sont associées aux *IGVH* muté, aux faibles niveaux d'expression de ZAP-70, CD38 et à des niveaux normaux de β 2-m. On les retrouve



plus fréquemment chez les patients plus jeunes (âge médian de 47 ans) indépendamment de leur stade clinique (Amaya-Chanaga and Rassenti, 2016). Ces patients ont une SG proche de celle de la population générale. De plus, le temps pour le prochain traitement (mesuré à partir de la première réponse) est significativement plus long chez les patients présentant des mutations *MYD88* (Martínez-Trillos et al., 2014).

I.9. Les traitements

Les traitements utilisés dans la LLC incluent les agents alkylants, les analogues de la purine, les combinaisons chimiothérapeutiques, les anticorps monoclonaux, les inhibiteurs de tyrosine-kinase et la transplantation (Gribben and O'Brien, 2011). Cependant, à l'exception de la transplantation de la moelle osseuse, qui est rarement considérée comme une option pour les patients âgés, les traitements ne sont pas curatifs mais permettent d'améliorer la survie (Cassaday et al., 2015; Dreger et al., 2013). Les décisions thérapeutiques sont essentiellement fondées sur le stade de la maladie et la présence de marqueurs cliniques, cellulaires et génétiques. Puisque la probabilité de progression est variable d'un patient à l'autre, même en présence de marqueurs de mauvais pronostic au moment du diagnostic, une observation régulière et attentive est nécessaire pour surveiller l'évolution de la maladie (Arruga and Deaglio, 2017). De plus, le traitement des complications infectieuses, hémorragiques ou immunologiques fait également partie de la gestion thérapeutique de la maladie (Arruga and Deaglio, 2017).

Schématiquement, selon les recommandations de la Société Française d'Hématologie, en première ligne de traitement, chez les patients sans comorbidité significative, l'association FCR est le traitement de référence. Chez les patients atteints d'une LLC avec comorbidités (insuffisance rénale sévère et poly-pathologiques) non éligibles au protocole standard FCR, le traitement par chlorambucil (Clb) en monothérapie était historiquement considéré comme le traitement habituel de première ligne mais avec un taux de réponse complète faible (<10%). Les nouvelles voies thérapeutiques viennent modifier ce schéma thérapeutique « historique ». (Hallek, 2013)

I.9.1. Les inhibiteurs de la voie de signalisation du BCR

La signalisation du BCR joue un rôle important dans la survie des cellules leucémiques (Petlickovski et al., 2005; Stevenson et al., 2011). Différents éléments du BCR ont été reconnus comme marqueurs pronostiques dans la pathologie, tels que la région variable du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgVH) ou la stéréotypie. La signalisation du BCR continue ou répétitive appuie la survie des cellules leucémiques



(Stevenson et al., 2011). Cela pourrait expliquer pourquoi l'inhibition de la signalisation du BCR est une nouvelle stratégie potentielle pour traiter la LLC (Wiestner, 2012). La signalisation du BCR dans les cellules leucémiques est soutenue par différentes tyrosines kinases, telles que BTK, Syk, ZAP-70, les kinases de la famille Src (en particulier la kinase Lyn) ainsi que PI3K (Wiestner, 2012) (Figure 9). Parmi ces inhibiteurs on retrouve :

I.9.1.1. Les inhibiteurs de BTK

L'ibrutinib (PCI-32765), un inhibiteur spécifique de BTK, peut perturber plusieurs voies de signalisation impliquées dans les interactions du microenvironnement tumoral, induit l'apoptose, inhibe la migration et l'adhésion des cellules B malignes (de Rooij et al., 2012). L'analyse précoce de la phase 1b/2 de l'essai PCYC-1102 a montré que l'ibrutinib était très actif et tolérable chez les patients atteints de la LLC (Byrd et al., 2011). L'ibrutinib est actuellement utilisé en thérapie de seconde ligne ou de première ligne en monothérapie, pour le traitement des patients atteints de la LLC non précédemment traités, non éligibles à un traitement à base de fludarabine à pleine dose ou chez les patients présentant une délétion 17p ou *P53* muté (Autorisation de mise sur le marché française). Le profil de tolérance à court terme fait apparaître un risque de survenue de complications hémorragiques; la toxicité à long terme n'a pas encore été totalement déterminée (Barrientos, 2016). Les nouveaux inhibiteurs de BTK sont actuellement en développement et en essais cliniques, montrant des effets prometteurs étant donné que l'effet non spécifique sur d'autres kinases de la famille Tec a été considérablement réduit (Byrd et al., 2016; Walter et al., 2016).

I.9.1.2. Les inhibiteurs de la tyrosine kinase de la rate (Syk)

Syk est une protéine tyrosine kinase qui intervient dans la signalisation du BCR, induisant l'activation et la migration des cellules. Dans la LLC, Syk pourrait être activée par des signaux externes du microenvironnement tissulaire. Le fostamatinib disodium (R788) est le premier inhibiteur oral de Syk disponible en clinique, ayant mis en évidence une activité clinique (étude de phase 1) chez des patients présentant une LLC réfractaire. *In vitro*, le fostamatinib n'a qu'une action pro-apoptotique directe, suggérant que son activité clinique passe avant tout par la modulation du signal du BCR ou des modifications du microenvironnement (Friedberg et al., 2010; Hoellenriegel et al., 2012). D'autres inhibiteurs de Syk tels que le R406 et deux inhibiteurs hautement sélectifs (PRT318 et P505-15) sont capables de diminuer la survie des cellules leucémiques dans un modèle de co-culture avec des cellules NLCs. Ces deux inhibiteurs inhibent également la sécrétion BCR-dépendante des chemokines CCL3 et CCL4 (*C-C motif chemokine 3 et 4*) par les cellules de la LLC,



interrompant ainsi les phénomènes de « homing cellulaire » (Hoellenriegel et al., 2012). Ces molécules peuvent donc être considérées comme une nouvelle approche thérapeutique pour la LLC et d'autres hémopathies malignes B (Hoellenriegel et al., 2012; Quiroga et al., 2009).

I.9.1.3. Les inhibiteurs de la tyrosine-kinase (Lyn)

Le dasatinib un inhibiteur de la tyrosine kinase développé à l'origine en tant qu'inhibiteur de pan-Src, peut inhiber la kinase Lyn et conduire à une apoptose des cellules leucémiques *in vitro* (Al-Ameri et al., 2010). Il a été utilisé en clinique dans quelques cas de LLC réfractaire (Russwurm et al., 2010). Le bafetinib, un autre inhibiteur de la kinase Lyn, a également montré une efficacité chez les patients en rechute ou réfractaires dans un essai de phase 2 (Kadia et al., 2011).

I.9.1.4. Les inhibiteurs de la signalisation PI3K

Dans les lymphocytes, l'isoforme PI3K p110 δ (PI3K δ) transmet des signaux provenant des récepteurs de surface incluant le BCR. L'idelalisib (GS-1101, CAL-101), un inhibiteur sélectif de l'isoforme PI3K δ qui inhibe la signalisation PI3K, induit l'apoptose des cellules leucémiques et diminue l'adhésion des cellules tumorales aux cellules endothéliales ainsi qu'aux cellules stromales médullaires *in vitro* (Fiorcari et al., 2013). L'essai de phase I a montré un taux de réponse primaire de 81% chez 54 patients présentant des LLC réfractaires, caractérisées par des facteurs de résistance thérapeutique (80% de syndrome tumoral hématopoïétique clinique, 91% *IGHV* non muté) (Brown et al., 2014). Quatre essais cliniques en combinaison thérapeutiques sont actuellement listés dans clinical-trial (Hoellenriegel et al., 2011). Des résultats préliminaires d'une étude de phase 1 de SAR245408, un inhibiteur oral de pan-PI3K, suggèrent qu'il est généralement bien toléré dans le cas d'une LLC récidivante/réfractaire fortement prétraité (Brown et al., 2015).

I.9.2. Les inhibiteurs de Bcl-2

Les protéines de la famille de Bcl-2 sont des régulateurs clés du processus apoptotique (Chao and Korsmeyer, 1998). La famille Bcl-2 comprend des protéines pro- et anti-apoptotiques. Le déséquilibre du processus apoptotique est un mécanisme établi par lequel les cellules cancéreuses échappent à l'apoptose. Bcl-2, l'élément fondateur de cette famille de protéines, est codé par le gène *BCL2*. La protéine Bcl-2 a été décrite par Tsujimoto et al, dans le lymphome folliculaire. En étudiant les translocations impliquant les chromosomes 14 et 18, ces auteurs ont mis en évidence le gène *BCL2*, au niveau 18q22, ses différents transcrits ainsi que leur produit protéique, Bcl-2 (Tsujimoto et al., 1984).



Le navitoclax (ABT-263) est une petite molécule BH3 mimétique qui inhibe fortement Bcl-2, Bcl-xL, et Bcl-w et est capable d'induire l'apoptose des cellules primaires leucémiques. Le risque de thrombocytopénie peut limiter l'utilisation du navitoclax chez les patients réfractaires fortement prétraités à la fludarabine (Roberts et al., 2012). La combinaison de navitoclax avec le bendamustine et le rituximab (BR) est bien tolérée et possède une activité anti-tumorale, notamment chez les patients présentant une dél(17p) ou une forte expression lymphocytaire de Bcl-2 (Kipps et al., 2010).

D'autres inhibiteurs de Bcl-2 incluant l'oblimersen, le gossypol (AT-101), l'obatoclax, et le SPC2996 sont également en phase d'expérimentation *in vitro* ou ont fait l'objet d'essais contrôlés. Le gossypol, inhibiteur naturel de Bcl-2 possède une activité pro-apoptotique sur les cellules leucémiques et a été testé sur quelques patients réfractaires (Soderquist et al., 2013). L'obatoclax combiné au rituximab a été testé dans un essai de phase I sur 13 patients en rechute avec un taux de réponse complète de plus de 80% (Brown et al., 2015). L'oblimersen combiné à la fludarabine et au cyclophosphamide a ainsi démontré son efficacité clinique (40% de rémission complète, augmentation de la survie à 3 ans) dans un essai de phase 3 (Balakrishnan et al., 2009; Dürig et al., 2011; O'Brien et al., 2009).

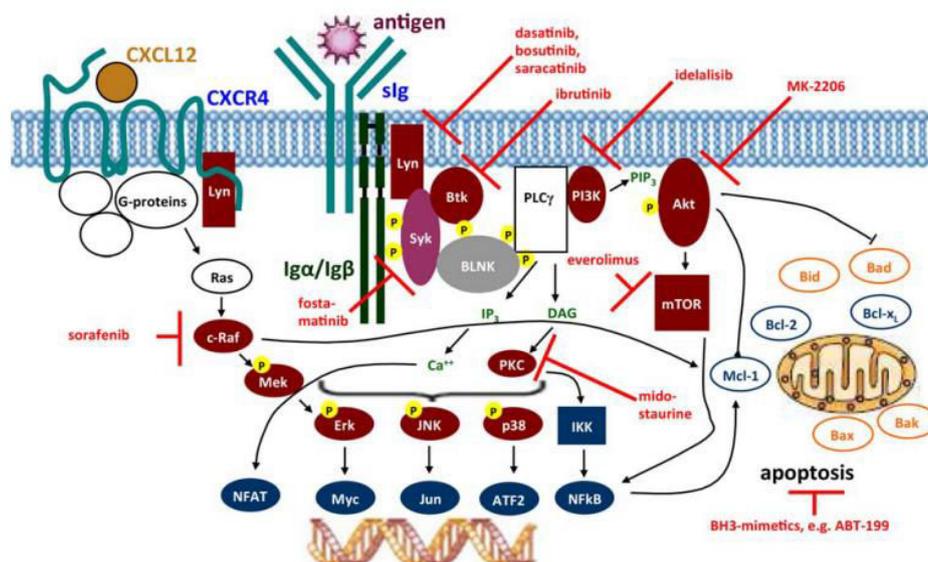


Figure 9 : La signalisation du BCR comme cible thérapeutique dans le traitement de la LLC. (d'après Hallek, 2015)



I.9.3. Les anticorps monoclonaux

I.9.3.1. Les anticorps anti-CD20

Le CD20 est une phosphoprotéine glycosylée, activée et exprimée à la surface de cellules B matures. La protéine n'a aucun ligand naturel connu (Cragg et al., 2005) et sa fonction n'est pas encore claire. Elle est supposée agir comme un canal calcique dans la membrane cellulaire. Comme le CD20 est exprimé sur la plupart des cellules B malignes, l'introduction du premier anticorps anti-CD20 humanisé à visée thérapeutique, le rituximab en 1998, a amélioré le traitement de la plupart des lymphomes non hodgkiniens CD20-positifs, incluant la LLC (Hagemeister, 2010). Les anticorps monoclonaux anti-CD20 en général ont trois mécanismes d'action possibles (Figure 10). Ceux-ci comprennent : *i*) la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), *ii*) la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et *iii*) l'inhibition directe de la croissance et l'apoptose, appelée mort cellulaire directe (DCD) (Beers et al., 2010).

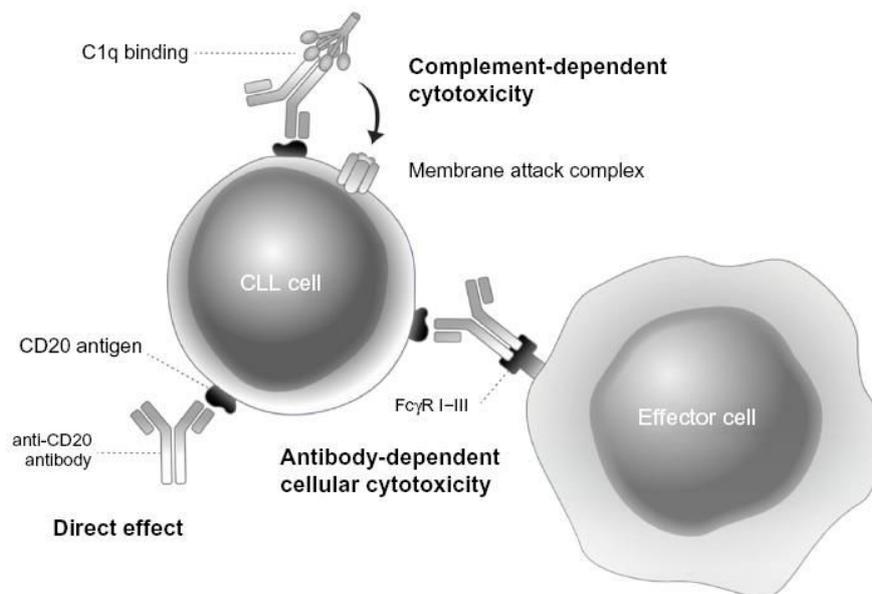


Figure 10 : Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux anti-CD20.
(d'après Smolej, 2015)

Dans la LLC, le rituximab est indiqué en traitement de première ligne en association à une chimiothérapie conventionnelle du fait de son action limitée s'il est utilisé seul (Huhn et al., 2001; O'Brien et al., 2009). Les premières associations comportaient rituximab et fludarabine puis l'association FCR est devenue la thérapeutique standard de première ligne chez le patient de moins de 65 ans



L'obinutuzumab (GA101), un anticorps monoclonal humanisé de deuxième génération a montré des résultats remarquables *in vitro* avec des taux d'apoptose plus élevés dans les cellules B comparé au rituximab (Patz et al., 2011). Il présente une forte affinité à un épitope CD20 de type II, une augmentation de l'ADCC, une faible activité CDC et une augmentation de l'induction directe de la mort cellulaire (Mössner et al., 2010). Son efficacité a été montrée dans une étude *versus* rituximab plus chlorambucil (R-Clb) et chlorambucil seul en termes de PFS et de taux de maladie résiduelle, sans toutefois de gain démontré sur la SG (Goede et al., 2014). Il est actuellement indiqué en association au chlorambucil pour le traitement des patients non précédemment traités et présentant des comorbidités les rendant inéligibles à un traitement par fludarabine à pleine dose.

I.9.3.2. Autres anticorps monoclonaux

L'alemtuzumab est un anticorps monoclonal recombinant anti-CD52, complètement humanisé. La monothérapie avec l'alemtuzumab a montré des taux de réponse de 33 à 53%, avec une durée médiane de réponse (DMR) allant de 8,7 à 15,4 mois, chez des patients atteints d'une LLC avancée et qui ont déjà été traités avec des agents alkylants et ayant échoués ou rechutés après une thérapie par la fludarabine en deuxième ligne (Keating et al., 2002; Rai et al., 2002). De plus, l'alemtuzumab s'est révélé efficace chez les patients présentant les délétions des chromosomes 11 ou 17 (dél (11q) et dél (17p)) et des mutations de *P53* (Lozanski et al., 2004; Stilgenbauer and Döhner, 2002). Par conséquent, l'alemtuzumab est une alternative thérapeutique pour les patients présentant ces caractéristiques de mauvais pronostic. En revanche, l'alemtuzumab induit une immunosuppression sévère entraînant un risque non négligeable d'infections opportunistes, notamment à cytomégalovirus (CMV), limitant ainsi son utilisation (Cheson, 2010).

I.9.4. Les agents alkylants

En monothérapie, l'agent alkylant le plus utilisé est le chlorambucil, mais parfois il peut être utilisé en association avec une corticothérapie. Le cyclophosphamide est essentiellement utilisé en association avec les analogues des purines tels que la fludarabine (Lepretre and Neste, 2006). Les avantages du chlorambucil sont sa faible toxicité, son faible coût et sa commodité en tant que médicament oral. Les inconvénients majeurs sont une absence ou une faible rémission complète et certains effets secondaires qui surviennent après une utilisation prolongée (cytopénie prolongée, myélodysplasie et une leucémie aiguë secondaire). Les traitements en monothérapie disparaissent actuellement, la combinaison avec un anti-CD20 s'est avéré plus efficace (Hallek, 2015).



I.9.5. Les analogues de purines

Trois analogues de purines sont actuellement utilisés dans le traitement de la LLC : la fludarabine, la pentostatine et la cladribine (2-CdA). Les plus utilisés sont la fludarabine et la cladribine, en monothérapie ou essentiellement associés avec des agents alkylants et/ou des anticorps monoclonaux (Hallek and Pflug, 2011). En monothérapie, la fludarabine produit une SG supérieure par rapport à d'autres traitements contenant des agents alkylants ou des corticostéroïdes (Anaissie et al., 1998; Rai et al., 2000). Elle induit plus de rémission et des rémissions plus complètes (7 à 40%) que les autres chimiothérapies classiques, comme l'association CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone), CAP (cyclophosphamide, doxorubicine, prednisone) ou le chlorambucil, mais n'améliore pas la SG lorsqu'on l'utilise seule (Leporrier et al., 2001; Rai et al., 2000; Steurer et al., 2006). De même, il a été montré que la cladribine en monothérapie produisait un taux de rémission complète (CR) plus élevé que l'association du chlorambucil avec la prednisone (47% contre 12%) sans qu'il en résulte une survie plus longue (Robak et al., 2000). La bendamustine, un autre agent alkylant qui a également une action d'analogue de la purine, peut être utilisé chez les patients en rechute ou réfractaires seul ou en association avec le rituximab (Knauf et al., 2009).

I.9.6. Les immunomodulateurs

Le lénalidomide, immunomodulateur structurellement proche du thalidomide présente des propriétés anti-néoplasiques, anti-angiogéniques ainsi qu'immunomodulatrices par activation des cellules T et des cellules NK (*Natural Killer*) et modulation de la libération de cytokines. Il est largement utilisé chez les patients atteints de myélome multiple (Lapalombella et al., 2010; Neri et al., 2016). Plusieurs études de phase II ont montré qu'un ORR (taux de réponse objectif) allant jusqu'à 47% peut être atteint avec le lénalidomide chez les patients atteints d'une LLC récidivante/réfractaire, cependant, en raison d'une toxicité élevée, la meilleure dose pour les patients leucémiques n'a pas encore été déterminée (Chanan-Khan et al., 2006; Ferrajoli et al., 2008). Parmi les effets indésirables les plus fréquents, on retrouve le syndrome de lyse tumorale. La plupart des patients atteints de la LLC ne tolèrent pas une dose de 25 mg qui est une dose standard pour le traitement du myélome multiple. Une autre indication possible du lénalidomide dans la LLC est le maintien du traitement après une chimiothérapie chez des patients présentant un risque élevé de progression de la maladie (Al-Sawaf et al., 2016)



I.9.7. La chimiothérapie

La combinaison de chimiothérapie cytotoxique avec un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20 est le traitement de première ligne recommandé pour la LLC. L'association de la chimio- et l'immunothérapie est variable en fonction des patients et est plus efficace que l'utilisation des agents thérapeutiques seuls. En effet, pour les plus jeunes patients, le choix le plus courant est l'association FCR, où l'addition de l'anticorps monoclonal anti-CD20 entraîne une prolongation significative de la SG, par rapport à une combinaison FC (Fludarabine-Cyclophosphamide) (Hallek et al., 2010; Robak et al., 2010). Chez les patients âgés ayant des problèmes majeurs de comorbidités, une combinaison d'obinutuzumab (GA101, un anti-CD20 humanisé de deuxième génération) avec le chlorambucile (G-C1b) s'est avéré efficace et bien tolérée (Goede et al., 2014, 2015). Pour les patients âgés, avec de légères comorbidités, la combinaison BR ou une dose réduite de FCR sont des options thérapeutiques considérées comme réalisables et efficaces (Eichhorst et al., 2016; Foon et al., 2012).

La présence de comorbidités augmente la possibilité des toxicités associées au traitement FCR, qui sont principalement représentées par le risque élevé d'infections en raison d'une myélosuppression sévère. Ainsi, ce traitement est déconseillé pour les patients atteints de la LLC âgés de plus de 65 ans. Pour une meilleure tolérance, la combinaison BR a été largement adoptée comme alternative chez les patients âgés (Eichhorst et al., 2016). Toutefois, les traitements FCR et BR ne sont pas indiqués pour les patients atteints de graves comorbidités. La majorité des patients sont diagnostiqués avec une LLC à un âge avancé et au moment où les patients ont besoin d'une thérapie, ils pourraient acquérir des comorbidités médicales supplémentaires limitant leur qualité de vie (Baumann et al., 2014). Le but pour ces patients est de choisir une thérapie qui contrôle les manifestations liées à la maladie, tout en préservant la qualité de vie. Dans ce contexte, la combinaison G-C1b est mieux adaptée et prouvée pour prolonger la survie (Goede et al., 2014).

I.9.8. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques

Malgré les avancées thérapeutiques majeures, la LLC reste une pathologie incurable. La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSHs) incluant l'autogreffe et l'allogreffe est de plus en plus utilisée dans le traitement de la LLC récidivante ou réfractaire (Wang et al., 2012). Seule la greffe allogénique a permis d'obtenir des rémissions prolongées (dans le cas d'une LLC réfractaire) et une diminution du risque de rechute en cas de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) (Dreger et al., 2007; Paneesha and Milligan, 2005). L'autogreffe n'a pas d'indication en première intention. Elle est recommandée chez des patients en



rechute ou réfractaires non éligibles pour une allogreffe, sous réserve d'une sensibilité au traitement de rattrapage (Dreger et al., 2007).

L'utilisation de ces greffes reste limitée par l'âge avancé des patients et le taux de mortalité dû à la transplantation (20 et 41%) (Montserrat, 2004). En effet, la transplantation allogénique de CSHs représente la seule stratégie de guérison potentielle de la maladie. Mais ce type d'opération peut entraîner de nombreuses complications chez le patient qui peut rejeter la greffe. Par conséquent, elle n'est utilisée que chez les patients jeunes résistants à la fludarabine ou faisant des rechutes précoces avec un statut *P53* muté (Dreger et al., 2007). Une allogreffe représente donc une proposition thérapeutique « raisonnable » en cas *i*) de non-réponse à la fludarabine ou de rechute précoce (dans les 12 mois), *ii*) de rechute dans les 24 mois après association d'immuno-poly-chimiothérapie incluant la fludarabine ou après autogreffe, *iii*) et en présence d'une délétion 17p avec critère de mise en route d'un traitement. L'allogreffe doit alors être envisagée dans les meilleurs délais pour éviter d'augmenter les thérapeutiques cytotoxiques avant la greffe, qui en réduirait les chances de succès (Aurran-Schleinitz et al., 2008).

L'augmentation de la fréquence de résistance à ces traitements et la récurrence chez les patients soulignent l'insuffisance des traitements actuels et suggèrent l'implication d'autres mécanismes dans la pathogénèse de la LLC. En effet, de nombreux travaux ont montré l'implication des RCPGs dans la transduction du signal impliqué dans le contrôle de l'homéostasie, et notamment dans l'équilibre entre la mort et la prolifération cellulaire (Liu et al., 2016). Dans les lymphocytes, les RCPGs notamment ceux qui sont couplés aux sous unités $G_{i\alpha s}$, interagissent avec plusieurs voies de signalisation, conduisant à une activation constitutive des voies MAPKs, ERK, JNK et des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, régulant ainsi de multiples fonctions immunitaires (Barragán et al., 2002; Cuní et al., 2004; Kehrl, 1998, 2016). Ces observations suggèrent que les cellules malignes peuvent détourner la fonction physiologique des RCPGs pour leur survie, et par conséquent, l'activation des RCPGs peut être associée à la pathogénèse de la LLC (Dorsam and Gutkind, 2007).

Au sein de notre équipe des travaux ont permis de caractériser deux récepteurs de la famille des RCPGs dans les cellules B normales et malignes (Saada et al., 2012). Ces récepteurs NTSR1 et NTSR2, sont deux récepteurs de haute et de faible affinité respectivement pour la neurotensine (NTS).



Chapitre II. La neurotensine et ses récepteurs

II.1. La neurotensine (NTS)

II.1.1. Généralités et découvertes de la NTS

La NTS est un neuropeptide avec une séquence primaire de 13 acides aminés (Figure 11), isolé pour la première fois en 1973 par Carraway et Leeman alors qu'ils cherchaient à purifier la substance P à partir d'extraits hypothalamiques bovins (Carraway and Leeman, 1973). Ce tridécapeptide de 1674 Da a été retrouvé plus tard en périphérie dans des extraits intestinaux bovins puis humains (Hammer et al., 1980; Kitabgi et al., 1976). Son nom est dû à ses propriétés hypotensives et vasodilatatrices observées après son injection par voie intraveineuse chez le rat (Carraway and Leeman, 1973). La partie carboxy-terminale (Arg-Leu) de la NTS est responsable de son activité biologique et présente une structure très conservée chez toutes les espèces étudiées y compris chez l'homme (Rostène and Alexander, 1997). Cette activité reste limitée par la présence d'endopeptidases car une fois relâchée, la NTS est dégradée et inactivée par le clivage de sa partie carboxy-terminale (Almenoff et al., 1981; Checler et al., 1986). La NTS est retrouvée au niveau central où elle se comporte comme un neurotransmetteur ou comme un neuromodulateur, mais elle est également présente en périphérie comme hormone, en majorité dans le système digestif (Carraway and Leeman, 1976).



Figure 11 : Séquence peptidique de la NTS.
(d'après Carraway and Leeman, 1975)

II.1.2. La biosynthèse de la NTS

Le gène de la NTS code pour deux peptides, soit la neuromédine N (NN) et la NTS. Chez l'homme, le gène de la NTS est localisé au niveau du chromosome 12 (12q21) (Marondel et al., 1996). L'ADN complémentaire codant le précurseur polypeptidique commun de la NTS et la NN, la pro-NTS, a été cloné à partir de muqueuse intestinale de chien (Dobner et al., 1987). L'équipe de Kislauskis a été la première à déterminer la séquence du gène encodant la pro-NTS dans d'hypothalamus de bœuf et de rat (Kislauskis et al., 1988). Plus tard, une séquence très similaire a été déterminée dans le cerveau humain (Bean et al., 1992). La pro-NTS est une protéine de 170 acides aminés chez le chien (Dobner et al.,



1987) et de 120 acides aminés chez l'homme (Bean et al., 1992). La maturation de ce précurseur après clivage par des prohormones convertases (PC) permet l'obtention de plusieurs peptides dont la NTS et la NN situées dans sa partie carboxy-terminale (Figure 12). La NN est un hexapeptide dont la séquence [Lys-Ile-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH] (Minamino et al., 1984) et est également très conservée chez toutes les espèces étudiées.

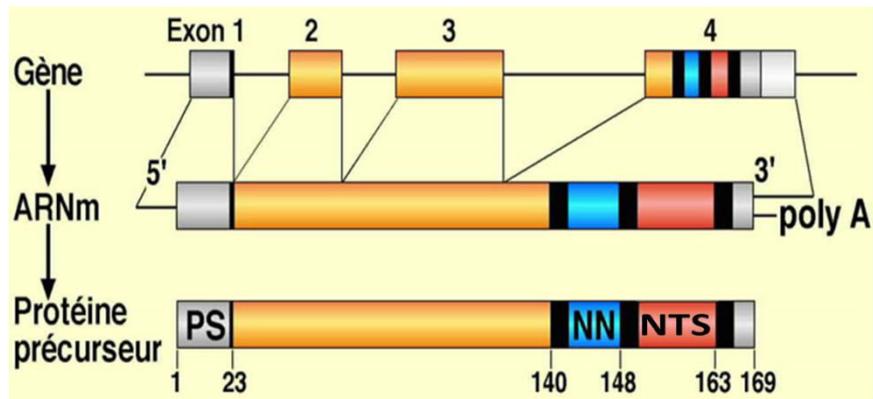


Figure 12 : Transcription du gène commun codant pour la pro-NTS-NN.

En N terminal, un peptide signal (PS) de 22 acides aminés permet la translocation des peptides maturés dans la voie régulée de sécrétion. Des doublets dibasiques en noir (sites de coupures par les prohormones convertases) encadrent les séquences de la Neuromédine N (NN) et de la Neurotensine (NTS) (d'après Dobner et al., 1987; Kislauskis et al., 1988).

Bien que ces deux peptides soient synthétisés à partir du même précurseur, ils sont souvent produits dans des populations cellulaires différentes dans le cerveau, l'intestin et les glandes surrénales. L'expression de la NTS ou de la NN dans ces différentes populations cellulaires dépend de l'expression différentielle d'enzymes de la famille des prohormones convertases (Kitabgi, 2006a). Ces endopeptidases reconnaissent les doublets basiques Lys-Arg qui entourent les deux peptides (Kitabgi, 2010) et permettent l'obtention des deux peptides NTS et NN mais aussi des formes plus longues appelées (Large NN) et (Large NT) avec des profils de maturation différents selon les tissus (Figure 13) (Carraway et al., 1991; Rovère et al., 1996). En effet, les quantités de NTS et de NN sont équivalentes dans le cerveau, alors que dans l'intestin on retrouve plutôt la NTS et la forme longue de NN (Large NN) (Carraway and Mitra, 1987; Kitabgi et al., 1992). La NTS et sa forme longue (Large NT) sont produites par la glande surrénale (Carraway et al., 1993). Après sa synthèse, la NTS mature, est stockée dans des vésicules à cœur dense (Johansson and Folan, 1984) et est libérée de façon calcium dépendante (Iversen et al., 1978). L'arrêt de l'activité biologique de la NTS se fait via sa dégradation par des endopeptidases (Kitabgi, 2006b).



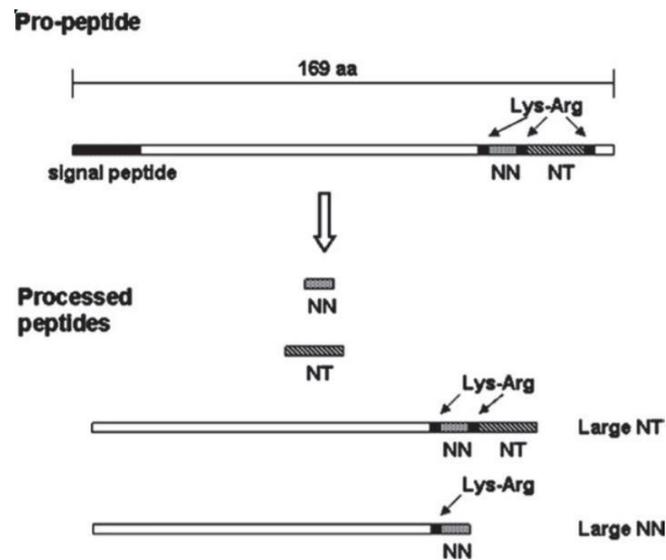


Figure 13 : Représentation schématique du précurseur de la NTS et des peptides issus de son clivage par les prohormones convertases.
(d'après Bugni and Pothoulakis, 2013)

II.1.3. La dégradation de la NTS

Une fois libérée et comme la plupart des peptides impliqués dans la neurotransmission, la NTS est rapidement inactivée par des enzymes protéolytiques. Bien que protégée des activités aminopeptidasiques par le groupement pyroglutamate à son extrémité N-terminale, la NTS est soumise à l'action des métallo-endopeptidases et de carboxypeptidases. Ces enzymes agissent principalement au niveau du segment (8-13) porteur de l'activité biologique du peptide en hydrolysant les liaisons Arg⁸-Arg⁹, Pro¹⁰-Tyr¹¹, et Tyr¹¹-Ile¹² (Figure 14) (Checler et al., 1986, 1988; Dauch et al., 1995). De ce fait, la NTS présente une demie vie courte (de 15 minutes au niveau cortical et de 2 à 6 au niveau périphérique) (Barelli et al., 1994; Checler et al., 1986) et ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique et agit donc de façon indépendante au niveau central et périphérique (Nemeroff et al., 1977). La NN libérée en même temps que la NTS est dégradée beaucoup plus rapidement car son extrémité amino-terminale n'est pas protégée, ce qui conduit à une inactivation rapide par des amino-peptidases (Barelli et al., 1993; Vincent et al., 1994). La liaison de la NTS à ses récepteurs se fait *via* sa terminaison COOH et nécessite au minimum les acides aminés en positions 9 à 13 pour son activation (Kitabgi et al., 1977).



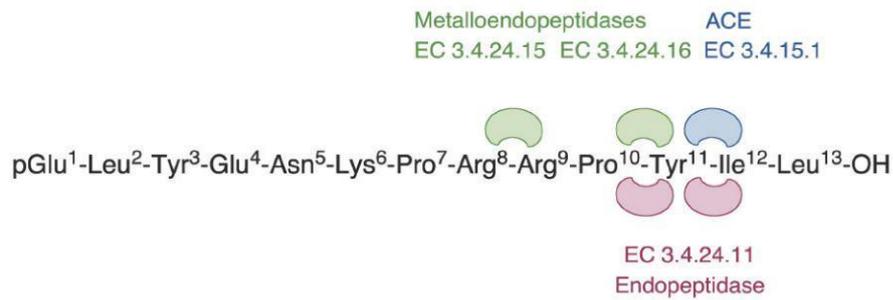


Figure 14 : Peptidases impliquées dans la dégradation de la NTS.

La NTS est dégradée par les métalloendopeptidases 24.16 (EC 3.4.24.16) et 24.15 (EC 3.4.24.15) qui clivent les liaisons Pro¹⁰-Tyr¹¹ et Arg⁸-Arg⁹, respectivement. L'endopeptidase 24.11 (EC 3.4.24.11) clive les liaisons Pro¹⁰-Tyr¹¹ et Try¹¹-Ile¹² et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (EC 3.4.15.1) clive la liaison Try¹¹-Ile¹² (d'après Myers et al., 2009).

II.1.4. Localisation et rôles de la NTS

II.1.4.1. Au niveau central

Comme beaucoup d'autres neuropeptides, la NTS agit comme neurotransmetteur ou neuromodulateur dans le système nerveux central (SNC) où elle est largement distribuée avec une concentration plus élevée dans l'hypothalamus, la substance noire, la substance grise périaqueducule, le tectum mésencéphalique, le locus coeruleus, l'amygdale, l'hippocampe et le thalamus (Cooper et al., 1981; Emson et al., 1985). Au niveau cellulaire, elle est retrouvée uniquement dans les corps cellulaires et/ou les terminaisons nerveuses des neurones. Dans les cellules gliales, la NTS n'a jamais été détectée (Dobner, 2005; Reinecke, 1985; Uhl et al., 1977). La distribution de la NTS dans les régions cérébrales a été mise en évidence par plusieurs techniques qui ont permis de mettre en relation la localisation du peptide et ses différentes propriétés pharmacologiques au niveau central. Ainsi, la NTS est présente dans les régions qui contrôlent la douleur, la thermorégulation et le système cardio-vasculaire (Ciriello et al., 1988; Dobner, 2006; Loewy and McKellar, 1980; Morimoto and Murakami, 1985). Son injection dans le SNC induit des effets hypothermiques et analgésiques puissants (Popp et al., 2007).

La NTS permet également la modulation de l'analgésie naloxone-indépendante, l'inhibition de la prise alimentaire et la modulation de la libération d'hormones hypophysaires (Kitabgi, 2002; Rostène and Alexander, 1997; Vincent et al., 1999). Elle permet également le contrôle de la pression artérielle centrale, de l'inflammation et joue un rôle dans la nociception (Clineschmidt et al., 1979; St-Gelais et al., 2006). En tant que neuromodulateur, la NTS peut agir sur un grand nombre de neurotransmetteurs (dopaminergiques,



sérotoninergiques, GABAergiques, glutamatergiques, et cholinergiques (Boules et al., 2013; Mustain et al., 2011). Enfin, la NTS peut également jouer un rôle dans les maladies neuropsychiatriques et neurodégénératives telles que la schizophrénie et la maladie de Parkinson (Mustain et al., 2011; St-Gelais et al., 2006). La localisation du peptide et du messenger est à la fois concordante pour un certain nombre de zones mais aussi très différente dans plusieurs régions cérébrales. En effet, au niveau de l'hypothalamus et du striatum, c'est le peptide qui est le plus présent, en revanche dans l'hippocampe, le subiculum et le cortex les taux de messagers sont plus élevés (Alexander et al., 1989; Kislauskis et al., 1988; Sato et al., 1991a).

II.1.4.2. Au niveau périphérique

En périphérie, la NTS est retrouvée principalement au niveau du tractus gastro-intestinal (jéjunum et iléon) (Helmstaedter et al., 1977; Orci et al., 1976) mais elle est également présente dans l'ensemble du système cardiovasculaire (Reinecke, 1985). Ainsi, la NTS est détectée dans nombreux organes périphériques comme le cœur, le foie, les poumons, le pancréas, la rate et l'intestin grêle. 90% de la distribution de la NTS est retrouvée au niveau des tissus périphériques (Carraway and Leeman, 1976). Elle agit comme une hormone locale, principalement au niveau du tractus gastro-intestinal où elle joue un rôle dans la motilité intestinale (Vincent et al., 1999). De plus, elle est impliquée dans l'hypotension, la diminution de la sécrétion d'acide gastrique, la digestion lipidique, la réponse pro-inflammatoire et la prolifération des cellules intestinales et cancéreuses (Kitabgi, 2002; Somaï et al., 2002a). Au niveau cellulaire, la NTS est retrouvée à la fois dans les cellules endocrines iléo-jéjunale mais aussi dans les neurones innervant les muscles lisses de l'intestin (Helmstaedter et al., 1977; Schultzberg et al., 1980).

Cette double répartition et fonction peut être retrouvée également dans le cœur ou le pancréas exocrine (Reinecke, 1985; Reinecke et al., 1982), ce qui suggère qu'en périphérie, la NTS peut agir à la fois comme un neurotransmetteur ou comme une hormone. En effet, l'injection intraveineuse de la NTS induit une augmentation de la sécrétion des hormones hypophysaires (prolactine, hormone lutéinisante, thyrostimuline et hormone de croissance), augmente la glycémie, les sécrétions exocrines du pancréas et la perméabilité vasculaire (Rostène and Alexander, 1997). Au niveau des cellules immunitaires, la NTS joue un rôle dans plusieurs processus comme le chimiotactisme, la phagocytose, la prolifération, l'inflammation, la migration et la survie cellulaire (Evers et al., 1994; Fauchais et al., 2008; Goldman et al., 1983; Magazin et al., 2004; Ramez et al., 2001; Saada et al., 2012; Zhao et al., 2003).



La NTS induit ses différents effets biologiques *via* trois sous-types de récepteurs. Deux récepteurs couplés aux protéines G, NTSR1 et NTSR2, et un récepteur de type I avec un seul domaine transmembranaire, NTSR3/sortiline (Mazella and Vincent, 2006; Mazella et al., 1998; Vincent et al., 1999).

II.2. Les récepteurs de la NTS (NTSRs)

Les premières indications sur l'existence de différents récepteurs à la NTS proviennent des travaux menés sur les sites de liaison de ce peptide. En effet, des études dans des membranes de cerveau de rat et de cerveau humain (Mazella et al., 1983) ou des tissus gastro-intestinaux (Kitabgi et al., 1984) ont permis de mettre en évidence deux sites différentes de liaison à la NTS. Des sites de haute affinité ($K_d = 0,1 - 0,3$ nM) sont sensibles aux ions Na^+ et au GTP (*Guanosine triphosphate*), ce qui diminue l'affinité du récepteur pour la NTS (Bozou et al., 1986; Kitabgi et al., 1984). Ces sites sont également insensibles à la lévocabastine, un antihistaminique H1 dépourvu de toute propriété pharmacologique de type NTS, qui peut bloquer sélectivement la liaison de la NTS aux sites de faible affinité sans modifier les propriétés de liaison des sites de haute affinité (Kitabgi et al., 1987; Schotte et al., 1986). En revanche, les sites de faible affinité ($K_d = 3 - 5$ nM) sont moins sensibles aux ions Na^+ , insensibles au GTP (Mazella et al., 1987) et déplacés par la lévocabastine (Schotte et al., 1986). Le premier récepteur de la NTS, NTSR1 (*Neurotensin Receptor 1*) qui correspond au site de haute affinité, a été ensuite cloné et caractérisé chez le rat (Tanaka et al., 1990) puis chez l'homme (Vita et al., 1993).

Le 2^{ème} récepteur à la NTS, NTSR2 (*Neurotensin Receptor 2*) qui correspond au site de faible affinité a quant à lui été cloné pour la première fois par homologie avec le récepteur NTSR1 de rat (Chalon et al., 1996) et de souris (Mazella et al., 1996a). Un peu plus tard, l'équipe de Vita a cloné ce récepteur à partir du cortex humain (Vita et al., 1998). Les deux récepteurs font partie de la famille des RCPGs avec sept domaines transmembranaires (Vincent et al., 1999). Un 3^{ème} récepteur à la NTS, NTSR3/sortiline est un récepteur de tri ayant un seul domaine transmembranaire (Mazella et al., 1998; Vincent et al., 1999). Le 3^{ème} récepteur, NTSR3 ayant une affinité similaire pour la NTS que NTSR1 (Zsürger et al., 1992), a été isolé pour la première fois chez la souris (Mazella et al., 1988). Ce récepteur a été purifié et cloné par la suite chez l'homme en 1998 par la même équipe et s'avère être identique à la protéine gp95/sortiline déjà connue (Mazella et al., 1998; Zsürger et al., 1994). Contrairement aux récepteurs NTSR1 et 2, NTSR3/sortiline fait partie de la famille des récepteurs Vps10p (*Vacuolar protein sorting 10 protein*), famille de récepteurs contrôlant le trafic intracellulaire, de type I, avec un seul domaine transmembranaire (Hermey et al., 1999;



Jacobsen et al., 1996). Ces trois récepteurs lient la même séquence 8-13 C-terminal de la NTS (Kitabgi et al., 1977).

II.2.1. Le récepteur de la NTS de type 1 (NTSR1)

II.2.1.1. L'expression du gène codant pour NTSR1

Chez l'homme, le gène de NTSR1 est localisé sur le bras long du chromosome 20 (20q13) (Laurent et al., 1994). Le gène se présente sous forme de copie unique et contient trois introns dans sa région codante (Le et al., 1997) et une séquence tétranucléotidique répétée très polymorphe, en aval du site de polyadénylation. La région 5' du gène contient plusieurs sites de liaisons pour des facteurs de transcription et une séquence de régulation négative (Tavares et al., 1999). Le transcrit est d'environ 4 kb, présent à la fois dans le cerveau et au niveau du tractus gastro-intestinal (Tanaka et al., 1990; Vita et al., 1993). Des études, effectuées sur les membranes de cerveau de rat et sur des cellules transfectées avec l'ADNc de NTSR1 de rat, ont montré que ce récepteur est produit sous forme de deux protéines différentes avec un poids moléculaires de 50 à 60 kDa. Ces deux protéines sont issues de deux sites d'initiation de la traduction de l'ARNm de NTSR1. Le premier correspond au site initialement identifié comme codant pour la méthionine 1 (Tanaka et al., 1990), alors que le deuxième site reste à identifier (Botto et al., 1997a).

II.2.1.2. La structure peptidique de NTSR1

La structure primaire de NTSR1 est composée de 424 acides aminés chez le rat et de 418 acides aminés chez l'homme et elle est identique à 84% chez les deux espèces (Tanaka et al., 1990; Tyler-McMahon et al., 2000). C'est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (TM1-TM7), principalement de type $G_{\alpha q/11}$ (Pelapat, 2006) et de poids moléculaire de 47 kDa (Vincent et al., 1999). NTSR1 est composé de 3 boucles intracellulaires (I1-I3), 3 boucles extracellulaires (E2-E4), une longue extrémité N-terminale extracellulaire et une courte extrémité carboxy-terminale intracellulaire. Il comporte également des sites de glycosylation (Tanaka et al., 1990; Vincent et al., 1999) (Figure 15), responsables de sa relocalisation membranaire et son activation (Boudin et al., 2000; Heakal et al., 2011). NTSR1 est le récepteur de haute affinité de la NTS avec une affinité de $K_d = 0,1-0,3$ nM chez l'humain (Vincent et al., 1999).

La liaison de la NTS au récepteur NTSR1 au niveau de la troisième boucle extracellulaire, induit l'activation de différentes voies de signalisation impliquant la PLC (*Phospholipase C*), l'AMPc (*Adosin Mono-Phosphate cyclique*), l'IP3 (*Inositol 1,4,5-triPhosphate*), le Ca^{2+} , l'acide arachidonique et les MAPKs (Bozou et al., 1986; Ehlers et al.,



1998; Gailly et al., 2000; Kitabgi, 2002; Poinot-Chazel et al., 1996; Richard et al., 2001a; Yamada et al., 1993). La protéine NTSR1 possède plusieurs sites fonctionnels (Figure 15). Parmi ceux-ci on retrouve : les sites de liaison de la NTS au niveau de la 2^{ème} et 4^{ème} boucle extracellulaire du récepteur (Botto et al., 1997a; Pang et al., 1996), et ceux de l'antagoniste de NTSR1 (SR 48692) qui recouvre partiellement les sites de liaison de la NTS, mais se lie également à d'autres acides aminés au niveau de la 3^{ème} (E3) et 4^{ème} (E4) boucle extracellulaire (Labbé-Jullié et al., 1995, 1998); le site de liaison aux protéines G au niveau de la 3^{ème} boucle intracellulaire (I3) responsable de l'activation de la PLC (Yamada et al., 1994); le site de sensibilité au sodium (Asp113) au niveau du 2^{ème} domaine transmembranaire (TM2) (Martin et al., 1999). De plus, l'extrémité carboxy-terminale de la protéine possède 2 acides aminés impliqués dans l'internalisation du récepteur (Chabry et al., 1995).

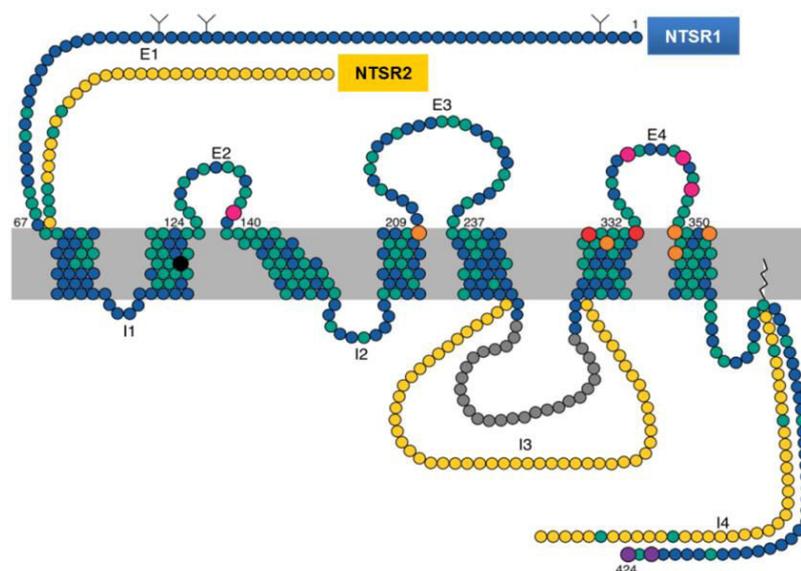


Figure 15 : Structure des récepteurs NTSR1 et NTSR2 chez le rat.

Les résidus de NTSR1 sont indiqués en bleu, les régions du récepteur NTSR2 qui diffèrent fortement de NTSR1 (E1, I3 et I4) sont indiquées en jaune. Les résidus invariants entre les récepteurs NTSR1 et NTSR2 sont indiqués en vert. En noir le site de liaison du Na⁺ (Asp113) du récepteur NTSR1. Les résidus impliqués dans la liaison à la NTS sont en rose, ceux liant le SR48692 en orange, et ceux liant les deux sont en rouge. Les résidus Thr-422 et Tyr-424 indispensables à l'internalisation de NTSR1 sont en violet. La boucle 13 en gris est essentielle pour la liaison de la Phospholipase C. Les sites de glycosylation sont symbolisés (Y) (d'après Vincent et al., 1999).

II.2.1.3. La localisation de NTSR1

Chez l'homme et le rat, les analyses par Northern-Blot ont révélé la présence de l'ARNm de NTSR1 dans le cerveau et l'intestin (Tanaka et al., 1990; Vita et al., 1993). Dans le cerveau, des expériences d'hybridation *in situ* ont montré des niveaux élevés d'ARNm de NTSR1 dans les neurones de la bande diagonale de Broca, noyau septal médian, noyau



basal de Meynert, noyau suprachiasmatique, la zone supramammillaire, la substance noire et l'aire tegmentale ventrale (Elde et al., 1990), ainsi que dans les petits neurones ganglionnaires de la racine dorsale de la moelle épinière (Zhang et al., 1995).

La comparaison de ces données avec celles d'autoradiographie (Moyses et al., 1987) et d'immunohistochimie (Boudin et al., 1996) fournit des informations intéressantes sur la distribution du récepteur NTSR1. Par exemple, il existe un signal d'hybridation fort de l'ARNm de NTSR1 au niveau des corps cellulaires des neurones dans la substance noire alors que de tels signaux manquent dans le striatum. En revanche, la protéine NTSR1 est présente dans les deux régions du cerveau (Boudin et al., 1996; Moyses et al., 1987). Cela confirme l'hypothèse selon laquelle les neurones dopaminergiques de la substance noire synthétisent le récepteur NTSR1. En périphérie, chez le rat, des taux élevés d'ARNm codant pour NTSR1 ont été retrouvés dans le foie, le colon, le pancréas et le duodénum (Méndez et al., 1997). Chez l'homme, les ARNm de NTSR1 ont été identifiés dans l'intestin grêle et dans les cellules sanguines mononucléées (Vita et al., 1993).

II.2.1.4. Les mécanismes de transduction de NTSR1

La liaison du récepteur NTSR1 à la PLC implique la troisième boucle intracellulaire (Yamada et al., 1994). Le résidu Asp113 situé dans le TM2 est responsable de la sensibilité au Na^+ après liaison de la NTS et est également important pour le couplage du récepteur à la PLC car sa substitution par une alanine entraîne une diminution importante de l'activité de la PLC qui stimule la formation d'IP3 (Martin et al., 1999). La stimulation de NTSR1 par la NTS conduit à l'activation de la PLC par sa liaison à la sous-unité $G_{\alpha q/11}$ (Najimi et al., 2002; Wang and Wu, 1996). Cette dernière a été détaillée dans plusieurs modèles cellulaires (Amar et al., 1987; Sato et al., 1991b; Slusher et al., 1994; Turner et al., 1990) et a pour conséquence la production d'IP3 et du DAG (*Diacylglycerol*) à partir de phospholipides membranaires (PIP2, *phosphatidyl Inositol-4,5-bisphosphate*). L'IP3 provoque alors la mobilisation intracellulaire du calcium (Figure 16). Cette signalisation est inhibée par le SR48692 dans l'ensemble des modèles étudiés (Oury-Donat et al., 1995). Dans les cellules (N1E115) de neuroblastome, l'augmentation du calcium intracellulaire conduit à l'activation de la guanylate cyclase et la production de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Amar et al., 1985). Le calcium mobilisé se lie également à la calmoduline et favorise la production de l'oxyde nitrique (NO) en stimulant la NO-synthase. Le NO active à son tour la guanylate cyclase cytosolique responsable de la formation de GMPc (Figure 16) (Marsault and Frelin, 1992). Le couplage avec d'autres protéines G hétérotrimériques, telles que $G_{\alpha i/0}$ a été principalement décrit dans les cellules neuronales, alors que l'activation de $G_{\alpha s}$ a été observée dans les cellules



transfectées par NTSR1, ce qui suggère que le couplage se produit lorsque NTSR1 est surexprimé dans les cellules (Gailly et al., 2000; Yamada et al., 1993).

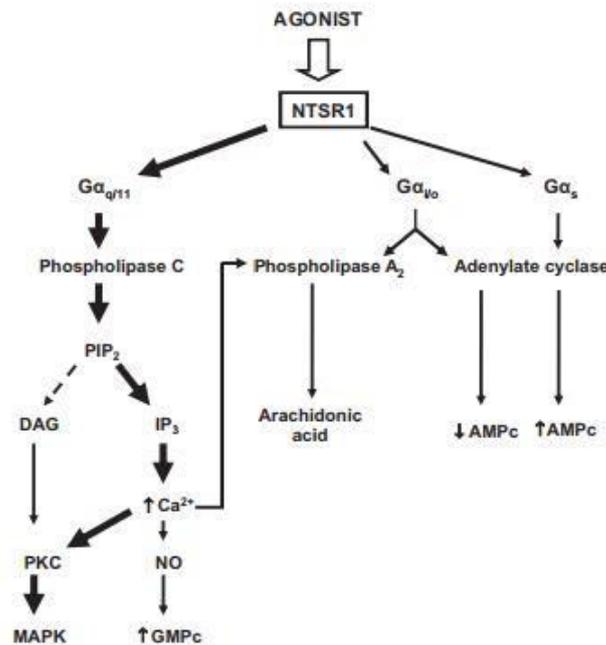


Figure 16 : Effecteurs majeurs activés par l'axe NTS/NTSR1/ $G_{\alpha q/11}$.
(d'après Dupouy et al., 2011)

II.2.1.5. Les fonctions de NTSR1

NTSR1 semble être impliqué dans certains mouvements centraux induits par la NTS. En effet, l'inhibition de NTSR1 par le SR48692 supprime les mouvements rotatoires ainsi que l'hypomotilité induite par la NTS (Dubuc et al., 1994; Gully et al., 1993). En revanche, cet inhibiteur n'a montré aucun effet sur les propriétés hypothermiantes et analgésiantes de la NTS à la fois chez le rat et la souris (Dubuc et al., 1994). Plus tard, des études sur un modèle murin invalidé pour NTSR1 ($NTSR1^{-/-}$) ont montré des résultats contradictoires à ceux obtenus précédemment par l'antagoniste spécifique de NTSR1, SR48692 (Pettibone et al., 2002). En effet, l'injection de la NTS à ces souris n'induit plus de réponse hypothermique indiquant que le récepteur NTSR1 intervient certainement dans cet réponse induite par la NTS (Pettibone et al., 2002). Les travaux réalisés sur ces souris $NTSR1^{-/-}$ ont montré également l'implication de ce récepteur dans le mouvement rotatoire, le comportement alimentaire et la motilité gastro-intestinale (Pettibone et al., 2002; Remaury et al., 2002).

II.2.1.6. L'internalisation de NTSR1

Après interaction avec la NTS, 60 à 70% du récepteur NTSR1 exprimé dans les cellules COS ou LTK s'internalise selon un processus dépendant de la température et du



temps. L'internalisation est inhibée à 0°C, donc c'est un mécanisme qui dépend de la fluidité membranaire. Elle est également inhibée par l'oxyde de phénylarsine ou par une concentration élevée en sucrose, connue pour bloquer l'endocytose intervenant au niveau des puits tapissés de clathrine (Chabry et al., 1994, 1995; Mazella et al., 1991; Turner et al., 1990; Vanisberg et al., 1991). Les preuves biochimiques suggèrent que le récepteur n'est pas recyclé dans la membrane plasmique après une internalisation induite par un ligand (Botto et al., 1998). La région impliquée dans le processus d'internalisation est la queue intracytoplasmique C-terminale et plus particulièrement, les résidus Thr422 et Tyr424 situés à son extrémité (Figure 15) (Chabry et al., 1995). La NTS peut également entraîner la phosphorylation de NTSR1 sur les résidus Ser415 - Thr416 - Ser417 de la séquence carboxy-terminale (Oakley et al., 2001). Cette phosphorylation n'est pas nécessaire pour l'internalisation du complexe NTS-NTSR1 mais est indispensable pour l'interaction du récepteur NTSR1 avec la β -arrestine-2 (Oakley et al., 2001). Ainsi l'interaction β -arrestine-2-NTSR1 pourrait jouer un rôle dans la désensibilisation du complexe.

II.2.2. Le récepteur de la NTS de type 2 (NTSR2)

II.2.2.1. Structure de NTSR2

La structure primaire de NTSR2 est constituée de 416 acides aminés chez le rat et la souris et de 420 acides aminés chez l'homme. Comme NTSR1, NTSR2 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Figure 15) avec une troisième boucle intracellulaire et une partie C-terminale plus longues et une extrémité N-terminale plus courte que NTSR1 (Vincent et al., 1999). Les types de protéines G associées au récepteur NTSR2 n'ont pas été clairement identifiées (Pelaprat, 2006). L'analyse de la structure primaire de NTSR2 a révélé certaines particularités comme l'absence de sites de N-glycosylation à son extrémité N-terminale et aux niveaux des boucles extracellulaires ainsi que l'absence de résidu aspartate dans le second domaine transmembranaire, expliquant sa très faible sensibilité aux ions Na^+ (Martin et al., 1999). Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de resensibiliser le récepteur au sodium en remplaçant l'alanine en position 79 du second domaine transmembranaire par l'aspartate (Martin et al., 1999). L'affinité de NTSR2 à la NTS est de $K_d = 3,7 \text{ nM}$ et $2,6 \text{ nM}$, chez le rat et l'homme respectivement (Chalon et al., 1996; Vita et al., 1998). Cependant, cette affinité reste tout de même plus faible que celle de NTSR1 (Tanaka et al., 1990; Vita et al., 1993). Un variant du récepteur NTSR2 a été identifié dans les astrocytes normaux et de glioblastome (lignée C6) de rat (Ayala-Sarmiento et al., 2015). Cette protéine de 282 acides aminés ne porte que cinq domaines transmembranaires et s'est avérée être sensible aux concentrations non physiologiques de la NTS (10 μM) en activant la voie des MAPKs (Perron et al., 2005).



Cependant, l'absence des deux derniers domaines transmembranaires de la troisième boucle intracellulaire et de la terminaison C-terminale qui sont importantes pour la liaison de la NTS et au couplage du récepteur, n'est pas en faveur d'un rôle fonctionnel de cette forme tronquée dans des conditions physiologiques. L'hypothèse d'une régulation de la signalisation par hétérodimérisation avec la forme totale du récepteur NTSR2 a été proposée (Perron et al., 2005).

II.2.2.2. Localisation de NTSR2

L'analyse par Northern-Blot a révélé que l'ARNm de NTSR2 est exprimé principalement dans le cerveau (Chalon et al., 1996; Mazella et al., 1996a). Des études d'hybridation *in situ* ont montré que la localisation de l'ARNm de NTSR2 chez le rat et la souris est différente de celle de l'ARNm de NTSR1, et que seulement quelques zones dans le cerveau sont enrichies en ARNm des deux récepteurs (Sarret et al., 1998; Walker et al., 1998). L'ARNm de NTSR2 murin n'est détecté qu'à partir du 14^{ème} jour post natal et sa concentration n'atteint pas celle retrouvée chez l'adulte avant 30 jours (Sarret et al., 1998). Ce modèle de développement est différent de celui rapporté pour l'ARNm du récepteur NTSR1 (Hermans et al., 1993; Sato et al., 1992), qui est déjà exprimé à la naissance, puis atteint un pic transitoire entre les sept et dix premiers jours de la vie et diminue progressivement pour atteindre les niveaux adultes après 30 à 40 jours. Au niveau cellulaire, l'ARNm de NTSR2 de rat est exprimé dans les neurones, la glie et les cellules épendymaires (Walker et al., 1998), alors que celui de la souris est principalement concentré dans les neurones (Sarret et al., 1998).

II.2.2.3. Les inhibiteurs de NTSR2

L'anti-histaminique lévocabastine (Figure 17) est décrit comme un inhibiteur de NTSR2 agissant de manière compétitive avec la NTS au niveau de sites de liaison de faible affinité du récepteur (Chalon et al., 1996). Cet antagoniste présente des effets différents et paradoxaux en fonction des espèces et des modèles cellulaires. En effet, dans les tissus cérébraux de souris et de rat (Kitabgi et al., 1987; Schotte et al., 1986), ainsi que dans les lignées COS transféctées par le récepteur NTSR2 humain (Richard et al., 2001b), la lévocabastine agit comme antagoniste. À l'inverse, elle a un effet stimulant sur le récepteur NTSR2 de souris et de rat transféctés dans les lignées cellulaires de xénope et de hamster, respectivement (Mazella et al., 1996b; Richard et al., 2001b).

Le SR142948A, un autre antagoniste non sélectif qui reconnaît les deux récepteurs NTSR1 et NTSR2 (Betancur et al., 1998; Gully et al., 1997), est capable d'inhiber certains



effets induit par la NTS tels que, l'hyperthermie et l'analgésie, suggérant l'implication du récepteur NTSR2 dans ces fonctions (Gully et al., 1997; Kreitel et al., 2002). Il a été également décrit que le SR142948A est un antagoniste potentiel des effets cardiovasculaire de la NTS (Schaeffer et al., 1998).

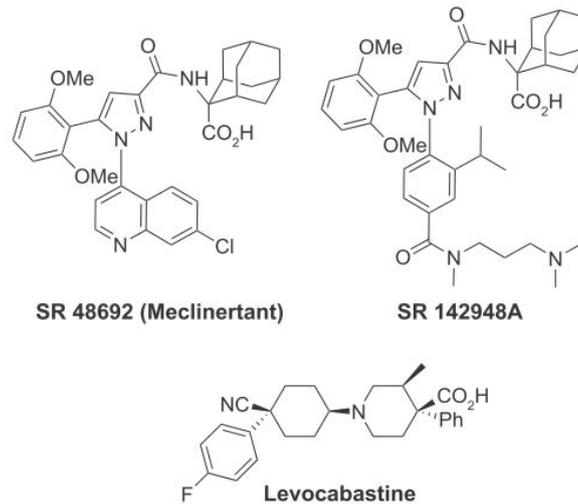


Figure 17 : Structure chimique des antagonistes non peptidiques des NTSRs.

Le SR48692 (Meclinetant) agit spécifiquement et avec une forte affinité sur le récepteur NTSR1. Le SR142948A lie avec une affinité similaire les récepteurs NTSR1 et NTSR2. La lévocabastine, un antihistaminique H1, inhibiteur de NTSR2 (d'après Myers et al., 2009).

II.2.2.4. Les mécanismes de transduction de NTSR2

La première réponse intracellulaire de la signalisation de NTSR2 a été observée en transfectant le récepteur NTSR2 de souris dans les ovocytes de xénope (Botto et al., 1997b; Mazella et al., 1996a). Dans ces cellules, la NTS induit une activation des canaux Cl^- dépendant du calcium, mais de manière surprenante, la lévocabastine et le SR48692 se comportent également comme agonistes de cette réponse (Botto et al., 1997b; Mazella et al., 1996a). D'autres études effectuées sur des cellules CHO exprimant le récepteur NTSR2 humain ou de rat ont fournies des résultats inattendus. En effet, la NTS et son analogue JMV449, induisent une faible stimulation de la mobilisation de Ca^{2+} dans les cellules CHO transfectées par le NTSR2 de rat, tandis que le SR48692 et la lévocabastine stimulent fortement la réponse intracellulaire de Ca^{2+} (Yamada et al., 1998).

Quand le NTSR2 humain est exprimé dans des cellules CHO, SR48692 et SR142948A peuvent agir également comme agonistes en déclenchant la formation d'IP, la mobilisation de Ca^{2+} , la libération de l'acide arachidonique et la stimulation de l'activité des MAPKs. Étonnamment, ces réponses sont inhibées par la NTS et la lévocabastine (Vita et al., 1998). De plus, la NTS est incapable de modifier les niveaux d'IP, d'AMPc et de GMPc dans des cellules HEK transfectées de façon stable avec le NTSR2 de souris, bien que le



récepteur soit internalisé de manière efficace après la liaison à la NTS (Botto et al., 1998). Il a été montré dans une autre étude que l'expression transitoire du récepteur NTSR2 humain dans les cellules COS conduisait à une activation constitutive du récepteur avec une augmentation de la production basale de l'IP (Richard et al., 2001b). D'autres travaux ont montré que la NTS et la lévocabastine mais pas SR48692, sont capable d'activer la phosphorylation d'Erk1/2 de cellules primaires exprimant un NTSR2 endogène (Sarret et al., 2003). Cependant, dans la même étude, SR48692 induit une augmentation marquée du Ca^{2+} cytosolique alors que la NTS et la lévocabastine n'induisent pas d'effets. Enfin, d'autres travaux décrivant le rôle du processus d'internalisation dans la signalisation NTSR2 ont rajouté un nouvel élément. En effet, dans ces travaux, la NTS, lévocabastine et le SR48692 induisent tous une phosphorylation de Erk1/2 dans des cellules CHO transfectées avec le NTSR2 humain et de rat (Gendron et al., 2004). Ces données expérimentales montrent que ces inhibiteurs induisent des effets fonctionnels différents et paradoxaux selon les types cellulaires et les espèces (Richard et al., 2001b; Vita et al., 1998; Yamada et al., 1998).

II.2.2.5. Les fonctions de NTSR2

L'inhibition spécifique de l'expression de NTSR2 dans le cerveau de souris a permis d'identifier ce récepteur comme médiateur de l'analgésie induite par la NTS (Dubuc et al., 1999). Ce résultat était en désaccord avec une autre étude qui a indiqué que le inhibition de l'expression de NTSR1 entraîne une perte de l'analgésie induite par la NTS (Tyler et al., 1999). Les travaux réalisés sur les souris NTSR1^{-/-} ont montré deux résultats contradictoires. En effet, Pettibone et al, a décrit que la perte de NTSR1 était corrélée avec la perte de l'effet analgésiant de la NTS (Pettibone et al., 2002), alors que Remaury et al, a montré que NTSR1 n'est pas impliqué dans l'analgésie induite par la NTS (Remaury et al., 2002). D'autres travaux réalisés sur des souris déficientes en NTSR2 ont confirmé son rôle dans l'effet nociceptif induit par la NTS (Maeno et al., 2004). De plus, NTSR2 est localisé dans des zones cérébrales impliquées dans le contrôle de la douleur (Sarret et al., 2003). Ces données constituent de solides arguments pour confirmer l'implication de NTSR2 dans l'analgésie induite par la NTS.

La nécessité d'utiliser des analogues capables de passer la barrière hémato-encéphalique empêche l'étude des propriétés analgésiques et l'hypothermique de la NTS chez les humains. L'association du NTSR2 avec les cellules gliales a été la première suggérée par des études autoradiographiques montrant une distribution ubiquitaire de sites de liaison de la NTS sensibles à la lévocabastine dans la neuroglie (Kitabgi et al., 1987). Le fait que l'expression de NTSR2 augmente dans le cerveau de rat suite à une injection de kaïnate ou à une lésion (Nouel et al., 1997; Schotte et al., 1988), en plus des sites de liaison



de la NTS sensibles à lévocabastine dans les astrocytes en culture (Nouel et al., 1997), suggère un rôle intéressant de NTSR2 en réponse à une lésion cérébrale.

II.2.2.6. L'internalisation de NTSR2

Le récepteur NTSR2 murin est également internalisé après la liaison de la NTS mais avec une efficacité inférieure à celle observée pour le récepteur NTSR1 (Botto et al., 1998). Contrairement au récepteur NTSR1, le NTSR2 murin est internalisé rapidement et recyclé à la surface de la cellule. Ce recyclage implique la protéine chaperonne NEEP21 (*Neuron-Enriched Endosomal Protein 21*) (Debaigt et al., 2004) (Figure 18). L'internalisation du récepteur NTSR2 de souris dépend d'un seul résidu tyrosine en position 237 situé dans la troisième boucle intracellulaire (I3), dont la phosphorylation est cruciale pour le recyclage du récepteur (Martin et al., 2002). Chez l'homme, au niveau du récepteur NTSR2, cette tyrosine est remplacée par un résidu cystéine expliquant l'absence de son recyclage (Vita et al., 1998). La substitution de la Cys237 par une Tyr237 permet au récepteur muté d'acquérir la capacité et d'être recyclé à la membrane (Martin et al., 2002).

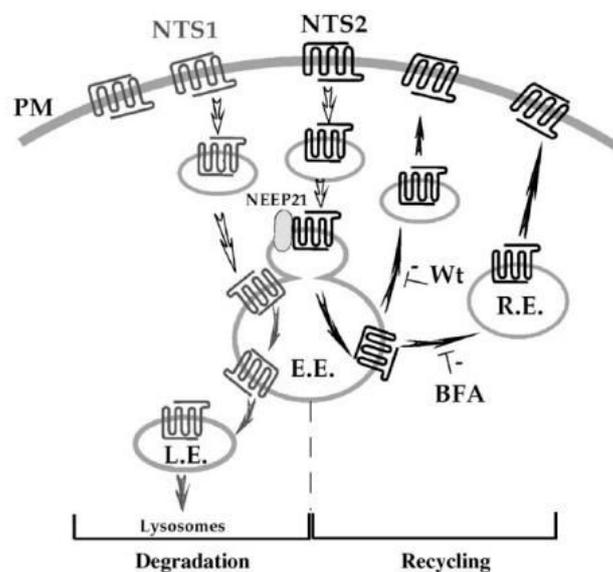


Figure 18 : Représentation schématique du trafic cellulaire des NTSRs après internalisation.

Les récepteurs NTSR1 et 2 sont séquestrés après liaison à la NTS et se retrouvent au niveau des endosomes précoces (EE) enrichis en NEEP21. A ce stade, les récepteurs endocytés peuvent être transportés aux endosomes tardifs (LE), puis aux lysosomes (pour NTSR1), ou recyclés vers la membrane plasmique (pour NTSR2). NEEP21 participe dans cette voie du recyclage soit directement à partir des (EE) par un mécanisme sensible à la wortmannine (Wt), soit au niveau des endosomes de recyclage tardif (RE) par un mécanisme sensible à la bréfeldine A (BFA) (d'après Mazella and Vincent, 2006).



II.2.3. Le récepteur de la NTS de type 3 (NTSR3/sortiline)

II.2.3.1. Structure de NTSR3/sortiline

Le récepteur NTSR3 (*Neurotensin Receptor-3*) ou Sortiline est une glycoprotéine d'environ 100 kDa (Mazella et al., 1989, 1998) appartenant à la famille des protéines de transport à domaine Vps10 avec un seul domaine transmembranaire (Petersen et al., 1997). Chez les mammifères, quatre autres membres de la famille des protéines à domaine Vps10 sont connus : SorLA, SorCS1, SorCS2, SorCS3 (Nykjaer and Willnow, 2012; Wilson et al., 2014a) (Figure 19a). L'autre caractéristique de la famille des récepteurs à domaine Vps10 est l'existence d'au moins un site de clivage pour la protéine convertase furine dans la séquence N-terminale de la protéine précurseur conduisant à des récepteurs matures (Petersen et al., 1997). Ce site est impliqué dans l'affinité du récepteur à la NTS qui est de 10-20 nM sans clivage et de 0.3 nM après clivage (Mazella et al., 1998). Le domaine transmembranaire du récepteur NTSR3/sortiline est encadré d'un domaine extracellulaire riche en cystéines comparable à celui de la protéine vacuolaire de tri Vps10p de la levure. Elle possède également une courte région peptide signal, un pro-peptide au niveau N-terminal, un domaine transmembranaire unique et un court domaine intracellulaire dépourvu d'activité catalytique intrinsèque et comportant une séquence consensus hexapeptidique impliquée dans son internalisation (Mazella et al., 1998; Petersen et al., 1997; Vincent et al., 1999) (Figure 19b).



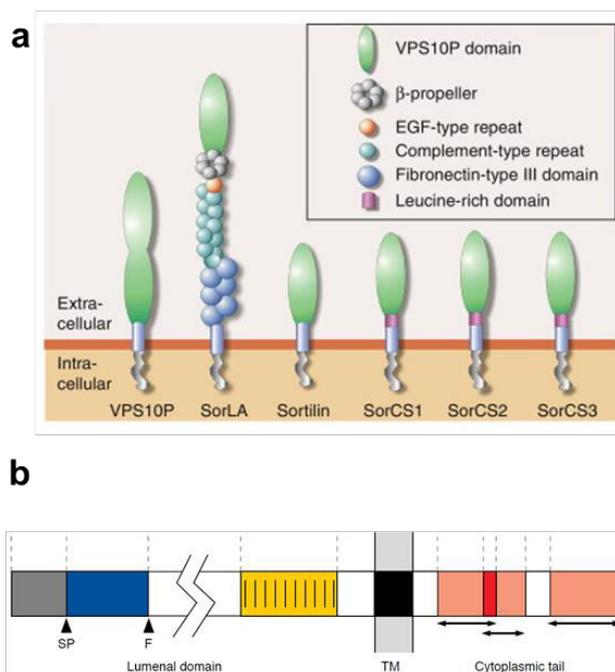


Figure 19 : Structures protéiques des membres de la famille des protéines à domaine Vps10, et du récepteur NTSR3/sortiline.

a) Organisation structurale des récepteurs à domaine Vps10 de la levure (VPS10P) et des mammifères (Sortiline, SorLA (*Sorting protein-related receptor with A-type repeats*), SorCS1, 2 et 3 (*Sortilin-related receptor CNS expressed 1, 2 et 3*). Les domaines extracellulaires des récepteurs sont composés d'un seul domaine Vps10 (Sortiline, SorLA, SorCS1, 2, 3) ou de deux domaines Vps10 (VPS10P). **b)** Le domaine extracellulaire est formé par un peptide signal (gris), un pro-domaine (bleu) clivé par la furine (F), un domaine riche en cystéines (jaune) propre aux protéines Vps10p et par un domaine riche en fibronectine situé entre le pro-domaine et le domaine riche en cystéines. Après le l'unique domaine transmembranaire (TM) (noir), le domaine intracellulaire est composé d'une séquence consensus hexapeptidique d'internalisation dépourvue d'activité catalytique (d'après Nykjaer and Willnow, 2012; Vincent et al., 1999).

II.2.3.2. Localisation tissulaire et cellulaire de NTSR3/sortiline

Le récepteur NTSR3/sortiline est une protéine d'expression ubiquitaire largement exprimée dans le SNC, en particulier dans l'hippocampe, le gyrus denté et le cortex cérébral (Hermans-Borgmeyer et al., 1999). Elle est également présente dans la moelle épinière, le muscle squelettique, les testicules, le cœur, le placenta, le pancréas, la prostate et l'intestin grêle (Petersen et al., 1997). Au niveau cellulaire, NTSR3/sortiline est présente dans les cellules gliales, neurones et adipocytes (Sarret et al., 2003). Elle est majoritairement présente dans les compartiments intracellulaires (appareil de Golgi et vésicules du réticulum endoplasmique), où elle exerce la fonction de transport et de sécrétion des protéines depuis le réticulum endoplasmique vers le réseau trans-golgien ou le milieu extracellulaire (Hassan et al., 2004). Seulement 5 à 10% de la protéine est localisée au niveau de la membrane plasmique (Morris et al., 1998; Sarret et al., 2003).



II.2.3.3. Fonctions de NTSR3/sortiline

Le court domaine carboxyterminal cytoplasmique de la NTSR3/sortiline est dépourvu de fonction catalytique, ce qui implique obligatoirement la présence d'autres partenaires membranaires afin de transmettre un signal intracellulaire. C'est dans ce contexte que les travaux de Nykjaer et ses collaborateurs ont montré que les effets pro-apoptotiques du pro-NGF passent par une interaction directe entre p75^{NTR}, et NTSR3/sortiline (Nykjaer et al., 2004). De même, des travaux ont montré que le pro-BDNF induit l'apoptose *via* l'activation du complexe p75^{NTR}/sortiline (Teng et al., 2005). Cette interaction a été mise en évidence dans plusieurs autres modèles notamment dans le cancer colorectal (Akil et al., 2011) et les cellules B humaines (Fauchais et al., 2008). En plus de sa fonction de corécepteur, la sortiline est impliquée dans le trafic intracellulaire entre différents compartiments. Ainsi, elle est capable de lier et de transporter les NTs matures et leurs précurseurs (Chen et al., 2005; Fauchais et al., 2008; Lee et al., 2002a). Elle présente également une fonction dans le transport des récepteurs Trks (Vaegter et al., 2011).

D'autres travaux indiquent que NTSR3/sortiline pourrait servir de récepteur à la NTS dans les cellules de microglie, dans lesquelles il est connu comme le seul récepteur exogène de la NTS. En effet, dans la lignée cellulaire C13NJ, la NTS induit la migration cellulaire par un mécanisme dépendant des signalisations PI3K et MAPKs (Martin et al., 2003). Dans une lignée cellulaire microgiale murine, la liaison de la NTS à NTSR3/sortiline conduit à la phosphorylation de Erk1/2 et Akt et induit l'expression des gènes de plusieurs cytokines/chimiokines dont MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*), l'interleukine-1 β et le TNF- α (Dicou et al., 2004).

L'ensemble de ces résultats atteste du rôle de la NTS et de NTSR3/sortiline dans l'activation et la migration des cellules microgliales, deux propriétés importantes impliquées dans les processus inflammatoires (Patel et al., 2016), ce qui suggère leur implication dans le processus pro-inflammatoire contribuant à la physiopathologie de maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson (Mazella and Vincent, 2006). En effet, la migration des cellules microgliales induite par la NTS et l'activation de l'expression des cytokines/chimiokines sont bloquées de manière efficace par le pro-peptide de NTSR3 qui pourrait être utilisé comme agent protecteur (Mazella and Vincent, 2006). NTSR3/sortiline est également impliquée dans la survie des cellules pancréatiques B-TC3 par son interaction au récepteur NTSR2. En effet, ce complexe est crucial pour l'effet anti-apoptotique de la NTS dans ces cellules (Béraud-Dufour et al., 2009).

Le récepteur NTSR3/sortiline joue un rôle important dans certains événements de trafic intracellulaire comme démontré pour le trafic lysosomal de protéines activatrices de



sphingolipides, SAP (*Sphingolipides Activator Protein*) et le contrôle de la sécrétion des RTKs *via* les exosomes (Lefrancois et al., 2003; Wilson et al., 2014b). De même, NTSR3/sortiline, par son interaction avec le domaine VHS (Vps27/Hrs/STAM) de GGA2 (*Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding protein*) (Nielsen et al., 2001; Takatsu et al., 2001), peut être partenaire d'un échafaudage intracellulaire responsable du transport des protéines vers les lysosomes et autres compartiments intracellulaires (Tooze, 2001). Cette propriété a été confirmée par d'autres travaux démontrant que NTSR3/sortiline contrôle le tri intracellulaire du BDNF vers la voie sécrétoire (Chen et al., 2005) et est nécessaire et suffisante pour la formation des vésicules de stockage du Glut-4 (*Glucose Transporter Type-4*) dans les adipocytes (Shi and Kandror, 2005). La NTSR3/sortiline peut lier et internaliser la lipoprotéine lipase (LPL) (Nielsen et al., 1999). Enfin, la sortiline est également impliquée dans différentes pathologies, notamment dans les maladies neurodégénératives comme mentionné précédemment, dans le diabète de type 2 ainsi que dans les maladies cardiovasculaires (Wilson et al., 2014a).

II.3. NTS, NTSRs et système immunitaire

Il existe très peu de données concernant l'implication de la NTS et de ses récepteurs au niveau du système immunitaire.

II.3.1. NTS, NTSRs et lymphocytes T

Les études concernant la NTS et ses récepteurs datent en grande majorité des années 90 avec des travaux mettant en évidence la présence des transcrits de NTSR1 au niveau de plusieurs lignées cellulaires T (Cou-L, Molt-4, Jurkat) et dans les lymphocytes T circulants (Evers et al., 1994; Garrido et al., 1992; Ramez et al., 2001; Söder and Hellström, 1987). La NTS peut se fixer sur la membrane des lymphocytes T humains normaux activés ou non ainsi que sur des cellules lymphomateuses T circulantes issues de lymphome de Sezary (Cochrane et al., 2011; Martin et al., 2005; Ramez et al., 2001; da Silva et al., 2011). Cependant, elle inhibe la prolifération de ces dernières (Magazin et al., 2004) ainsi que la prolifération de la lignée lymphocytaire T Cou-L induite par l'IL-2 (Ramez et al., 2001). En revanche, la capacité de migration et de chimiotactisme de ces cellules augmente en présence de la NTS (Ramez et al., 2001).

La NTS stimule la migration des lymphocytes humains périphériques normaux, mais n'a pas d'effet sur les cellules de Sezary circulantes (Evers et al., 1994). Elle peut entraîner également l'adhérence et la migration de lymphocytes péritonéaux *via* un mécanisme dépendant du calcium intracellulaire (Garrido et al., 1992). Chez le rat, la NTS est capable



d'amplifier l'effet mitogénique de la phytohématagglutinine (PHA) sur les lymphocytes T ganglionnaires (Söder and Hellström, 1987). Enfin, l'expression de la NTS et de ses récepteurs a été mise en évidence dans le thymus chez l'homme, le rat et le poulet, suggérant un rôle potentiel du neuropeptide dans la régulation thymique (Atoji et al., 1996; Carraway and Bhatnagar, 1980; Cochrane et al., 2011; Mignini et al., 2011; Vanneste et al., 1997).

II.3.2. NTS, NTSRs et lymphocytes B

Les deux premières études sur la caractérisation et le rôle de la NTS et de ses récepteurs dans les lymphocytes B ont été réalisées par notre équipe. Premièrement, il a été montré que les lignées plasmocytaires et lymphocytaires B matures expriment le 3^{ème} récepteur de la NTS, NTSR3/sortiline (Fauchais et al., 2008). Cette étude a montré une double fonction de NTSR3/sortiline dans les lignées cellulaires B. En effet, ce récepteur peut soit transporter la neurotrophine BDNF (voir chapitre III), qui conduit à une boucle autocrine de survie dans les cellules B par l'activation de son récepteur TrkB, soit servir de corécepteur pour p75^{NTR} dans la liaison de la forme immature pro-apoptotique de BDNF (Bellanger et al., 2011; Fauchais et al., 2008). Cette fonction pro-apoptotique est inhibée par la NTS comme cela a été déjà décrit dans les cellules neuronales (Nykjaer et al., 2004).

Ces travaux ont été complétés par la suite par notre équipe en rapportant l'expression de la NTS et de ses deux récepteurs de haute et de faible affinité NTSR1 et NTSR2 dans les lignées cellulaires B humaines, les cellules B de patients atteints de la LLC et dans les cellules B provenant de donneurs sains (Saada et al., 2012). Dans cette étude, un stress cellulaire induit par la privation sérique favorise l'expression de NTSR1 et de NTSR3/sortiline à la membrane plasmique. De plus, la NTS est fonctionnelle car dans les mêmes conditions de culture en combinaison ou pas avec l'activation de Fas, le traitement à la NTS diminue l'apoptose et augmente la prolifération des différentes lignées cellulaires B (Saada et al., 2012). L'inhibition de NTSR1 par l'antagoniste spécifique SR48692 rétablit l'apoptose dans les lignées plasmocytaires (Saada et al., 2012). La même étude a également montré l'expression transcriptionnelle de la NTS et des récepteurs NTSR1 et 2 dans les lymphocytes B circulants humains. Par contre, une surexpression des transcrits de NTSR2 a été détectée dans les lymphocytes B de patients atteints de la LLC, à l'inverse de la NTS qui est indétectable et de NTSR1 dont l'expression est significativement diminuée. Cette augmentation de l'expression de NTSR2 n'a pas été détectée dans les ganglions tumoraux de patients ayant un DLBCL ni dans les ganglions métastatiques de cancer colorectal (Saada et al., 2012).



II.3.3. NTS, NTSRs et cytokines pro-inflammatoires

L'implication de la NTS dans la réponse inflammatoire a été mise en évidence dans des cas de maladies inflammatoires intestinales où elle joue plusieurs rôles notamment au niveau de la motricité intestinale, la prolifération des cellules épithéliales, le chimiotactisme, l'activation mastocytaire et la libération de cytokines pro-inflammatoires (Castagliuolo et al., 1999; Goldman et al., 1983; Koon et al., 2009; Lemaire, 1988). Dans les cellules épithéliales coliques humaines, la NTS stimule la libération de l'IL-8 conduisant ainsi à une réponse pro-inflammatoire *via* la voie des MAPKs et du facteur de transcription NFκB (Zhao et al., 2003, 2007). Cette réponse peut également passer par la transactivation du récepteur de l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) (Zhao et al., 2011). La NTS induit également la production de l'IL-8 dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines (Olszewski and Hamilton, 2009).

Chez la souris, le traitement des pré-adipocytes et des tissus adipeux par un agent inducteur de colites, TNBS (*2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid*) induit une augmentation de l'expression de la NTS et du récepteur NTSR1. Cela conduit à une production importante de l'IL-6 dépendante de la voie PKCδ et du facteur de transcription NFκB, amplifiant ainsi la réponse pro-inflammatoires (Koon et al., 2009). Cette réponse pro-inflammatoire est fortement diminuée par la neutralisation de l'IL-6, en présence de l'inhibiteur de NTSR1, le SR48692, ou par l'inactivation du gène de la NTS dans le modèle murin (Koon et al., 2009). Enfin, chez la souris, une inflammation provoquée par le dextran sulfate de sodium (DSS) induit une augmentation de l'expression de la NTS et du récepteur NTSR1 au niveau de la muqueuse intestinale, conduisant ainsi à l'activation de la cyclooxygénase 2 (COX-2) et de la voie des prostaglandines (Brun et al., 2005). Ces résultats suggèrent que la NTS module la réparation des muqueuses dans ces modèles murins, en partie, par une voie dépendante de COX-2 (Brun et al., 2005).

II.3.4. NTS, NTSRs et cellules mastocytaires

L'expression de la NTS et de NTSR1 a aussi été mise en évidence dans des lignées mastocytaires humaines ainsi que dans les mastocytes humains dérivés de cordon ombilical. Ainsi, chez l'homme et le rat, la stimulation de ces cellules par la NTS participe à la libération d'histamine (Cochrane et al., 2011). La NTS peut également induire la dégranulation des mastocytes du jéjunum chez l'homme et le rat (Selbekk et al., 1980). Ces données peuvent être renforcées par l'interaction entre la NTS et les cellules mastocytaires, observée chez les patients atteints de dermatite atopique, caractérisée par une concentration sérique élevée de



la NTS. Cette étude suggère que des interactions entre la NTS et les mastocytes contribuent à la pathogenèse de la maladie (Vasiadi et al., 2013).

II.3.5. NTS, NTSRs et cellules dendritiques et phagocytaires

La NTS peut inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires générées par le lipopolysaccharide (LPS) dans les cellules dendritiques de la peau exprimant constitutivement les récepteurs NTSR1 et NTSR3/sortiline (da Silva et al., 2011). Cette étude a révélé que la NTS régule négativement les voies de signalisation NF- κ B et JNK, ainsi que l'expression de l'IL-6, du TNF- α , IL-10 et le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (da Silva et al., 2011). La NTS est également capable d'augmenter la génération d'oxyde nitrique (NO) *via* la voie JAK2-STAT1 dans les macrophages murin co-stimulés par le LPS et l'IFN γ (*Interferon γ*) (Kim et al., 2006). Chez la souris, d'autres travaux ont montré que la NTS et la NN stimulent de façon importante la fonction phagocytaire des macrophages *via* une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ (De la Fuente et al., 1993). La NTS est également capable de réguler positivement la prolifération macrophagique (Moore et al., 1989), et moduler la capacité phagocytaire et migratoire des polynucléaires neutrophiles (PNN) humaines (Goldman et al., 1983).

II.4. NTS, NTSRs, cancers et signalisation oncogénique

II.4.1. NTS, NTSRs et cancers

De nombreuses voies de signalisations activées par la NTS ont été étudiées dans différents types de cancer, y compris les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC), les adénocarcinomes pancréatiques, les cancers de la prostate, le carcinome hépatocellulaire, les tumeurs du côlon, les cancers du sein et le glioblastome (Alifano et al., 2010; Baxendale et al., 2013; Bugni et al., 2012; Dupouy et al., 2014; Ouyang et al., 2015; Wang et al., 2011; Yu et al., 2013). L'implication de NTSR3/sortiline dans les effets de la NTS a été caractérisée dans des cellules qui expriment ce récepteur de manière endogène. Ainsi, la sortiline est exprimée dans plusieurs types cellulaires de cancers humains d'origine différente où elle est impliquée dans la croissance cellulaire induite par la NTS (Baxendale et al., 2013). La NTS participe à chaque étape de la progression tumorale, de la survie et de la croissance à la propagation métastatique, tous ces événements cellulaires étant activés en raison de l'expression anormale des NTSRs.

II.4.1.1. Le cancer bronchique

La surexpression de NTS et de NTSR1 a été détectée dans plusieurs lignées de CBNPC, et de cancer bronchique à petites cellules (CBPC) (Ocejo-Garcia et al., 2001) ainsi



que dans des tumeurs de CBNPC de patients comparé à l'absence d'expression dans le tissu sain (Alifano et al., 2010). Les interactions entre la NTS et NTSR1 induisent la progression tumorale en provoquant une surexpression et une activation des récepteurs de l'EGF, EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et HER 2/3 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2/3*), augmentant ainsi la sensibilité à l'erlotinib qui inhibe les récepteurs à l'EGF (Younes et al., 2014). Dans le CBNPC, l'expression de NTSR1 est un facteur de mauvais pronostic, la NTS augmente la croissance tumorale et induit la formation de métastases ganglionnaires massives. Cet effet est réduit *in vivo* par siNTSR1 ou par traitement au SR48692 (Alifano et al., 2010; Moody et al., 2014). Dans le CBPC, le SR48692 inhibe la prolifération cellulaire et la croissance tumorale induites par la NTS *in vitro* et *in vivo* (Moody et al., 2001). Dans un modèle de cancer bronchique, Il a été démontré au sein de notre équipe que la sortiline est impliquée dans le trafic intracellulaire et la libération des exosomes (Wilson et al., 2014b). En effet, dans ce modèle, la sortiline est associée à deux récepteurs RTKs (TrkB et EGFR) formant ainsi un complexe nommé « TES » dans les cellules tumorales (Wilson et al., 2014b). Ce complexe est ensuite transporté vers les cellules endothéliales *via* les exosomes, augmentant ainsi l'expression des protéines pro-angiogéniques.

II.4.1.2. Le cancer de la prostate

Il a été établi que la NTS est un facteur trophique autocrine stimulé par la privation androgénique dans le cancer de la prostate chez l'homme (Sehgal et al., 1994). Les NTSRs, en particulier NTSR1 est décrit pour être surexprimé dans ce cancer (Swift et al., 2010). Dans le cancer de la prostate résistant au bicalutamide (un anti-androgène), la NTS stimule la prolifération, la progression du cycle cellulaire et l'invasion, ces effets peuvent être réduits en utilisant un siNTS (Vias et al., 2007). Dans les cellules PC3, la NTS stimule la mitogenèse et la synthèse de l'ADN *via* les voies de signalisation des MAPKs et PI3K, ainsi que la voie du récepteur à l'EGF (Hassan et al., 2004). Enfin, le Ca^{2+} est nécessaire pour que la NTS stimulent la synthèse de l'ADN et augmente la formation de l'AMPc. Ces effets sont inhibés par les inhibiteurs des canaux calciques.

II.4.1.3. Le cancer colorectal (CCR)

L'augmentation de l'expression de NTSR1 est un événement précoce lors de la tumorigénèse colique, contribuant à la progression tumorale et un comportement tumoral agressif dans les adénocarcinomes colorectaux (Gui et al., 2008). *In vitro*, la NTS stimule NTSR1, puis induit la prolifération des lignées cellulaires du cancer colique en stimulant la signalisation MAPK/ERK ou par un mécanisme post-transcriptionnel (Bakirtzi et al., 2011;



Massa et al., 2011). *In vivo*, la NTS favorise la croissance tumorale *via* NTSR1 et cet effet est inhibé par le SR48692 (Maoret et al., 1999). De plus, la forme soluble de NTSR3 (sNTSR3), correspondant au domaine extracellulaire de NTSR3, est responsable de la formation de métastases, en induisant une désorganisation du cytosquelette et une rupture des desmosomes, qui entraîne l'étalement des cellules et l'initiation de la séparation cellulaire (Massa et al., 2014).

Dans la lignée cellulaire d'adénocarcinome colique humain HT29, NTSR3/sortiline est co-exprimée avec le récepteur NTSR1. Ce complexe, est internalisé suite à la stimulation par la NTS, et induit une signalisation de survie dépendante de la voie des MAPKs (Martin et al., 2002). Une autre étude a démontré que la régulation positive du récepteur NTSR1 dans le CCR est la conséquence de l'activation de la voie de signalisation Wnt/APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) (Souazé et al., 2006a). En effet, le complexe β -caténine/TCF (*T Cell Factor*) est capable d'induire l'activation du gène *NTSR1* par liaison du facteur de transcription TCF sur son site consensus localisé dans le promoteur du gène *NTSR1*. Cette étude suggère que l'activation du gène *NTSR1* par la voie β -caténine/TCF est liée à un événement précoce dans les adénomes coliques humains (Souazé et al., 2006a). Récemment il a été montré que les niveaux élevés de méthylation du gène *NTSR1* sont associés à un meilleur pronostic. En effet, ces travaux montrent que dans les formes moins agressives de CCR, *NTSR1* est hyperméthylé (Kamimae et al., 2015). En effet, la méthylation du gène *NTSR1* est associée à une croissance non invasive des CCR, alors qu'une faible méthylation peut contribuer au potentiel malin en activant *NTSR1*. Ainsi, ces résultats suggèrent que la méthylation du gène *NTSR1* peut être utilisée comme biomarqueur pronostique dans le CCR (Kamimae et al., 2015).

II.4.1.4. Le cancer du pancréas

Il existe une forte expression de NTSR1 dans le cancer de pancréas comparé à un tissu normal, qui est positivement corrélée avec le grade de la pathologie (Wang et al., 2000). Dans la lignée cellulaire d'adénocarcinome canalaire pancréatique humain (PANC-1), la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire induite par la NTS sont dépendantes de la PKC (*Protein Kinase C*) (Guha et al., 2002). De plus, la stimulation de ERK-1 et ERK-2 par la PKC joue un rôle central dans la croissance induite par la NTS des cellules PANC-1 (Guha et al., 2003). Ces effets stimulants de la NTS sur la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses du pancréas sont inhibées par le SR48692 (Wang et al., 2011). La NTS favorise également la migration des cellules cancéreuses du pancréas, avec deux voies de signalisations différentes. En effet, dans les cellules qui migrent individuellement la NTS



active la voie de signalisation EGFR/ERK, alors que dans les cellules qui migrent ensemble, les effets de NTS dépendent de la voie PI3K (Mijatovic et al., 2007).

II.4.1.5. Le glioblastome

Dans le glioblastome humain, l'expression de la NTS et de NTSR1 est plus élevée par rapport au tissu cérébral normal. Des corrélations positives ont été démontrées entre les niveaux d'expression de l'axe NTS/NTSR1 et le grade pathologique des gliomes. En effet, une forte expression de la NTS et de son récepteur NTSR1 est liée à un mauvais pronostic pour les patients atteints de glioblastome (Ouyang et al., 2015). La prolifération cellulaire augmente par la NTS *via* les voies de signalisation des MAPKs et les microARN liés aux MAPKs, cependant, cette prolifération induite par la NTS dans les cellules de glioblastome peut être réduite par SR48692 ou siNTSR1 (Ouyang et al., 2016), cette inhibition active la voie apoptotique mitochondriale et induit la diminution protéique de Bcl-2 (Dong et al., 2017). La NTS favorise également l'invasion des cellules de glioblastome *in vitro* et *in vivo* *via* le récepteur NTSR1 (Ouyang et al., 2015). Enfin, une étude a révélé que la signalisation induite par l'axe NTS/NTSR1 dans les cellules souches du glioblastome est régulée en partie par l'IL-8/CXCR1 (*Chemokine (C-X-C motif) Receptor 1*) et l'activation de la voie de signalisation STAT3 (Zhou et al., 2014).

II.4.1.6. Le cancer du sein

L'expression de la NTS et de NTSR1 augmente dans le cancer du sein comparé à un tissu mammaire normal. La surexpression de NTSR1 est liée à un mauvais pronostic avec une survie globale de 5 ans dans les carcinomes invasifs du sein (Dupouy et al., 2014). L'axe NTS/NTSR1 améliore la croissance tumorale et le développement des métastases chez les souris, en augmentant l'expression des récepteurs EGFR, HER2, et HER3 qui augmente la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant ces récepteurs (Dupouy et al., 2014). Cependant, l'effet de cette signalisation activée par la NTS est réduit par siNTSR1 ou par l'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur, le SR48692 (Souazé et al., 2006b). De plus, le traitement à la NTS inhibe de manière significative l'apoptose des cellules cancéreuses du sein qui surexpriment NTSR1, avec un mécanisme sous-jacent impliquant une augmentation de l'ARNm de Bcl-2 et les niveaux de protéines qui dépendent de la voie MAPK (Somaï et al., 2002b).

Une étude a révélé que la palmitoylation de NTSR1 est nécessaire pour sa localisation et sa signalisation induite par la NTS dans les rafts lipidiques. En effet, l'inhibition de la palmitoylation du récepteur inhibe la signalisation mitogénique de NTSR1 dans le cancer du sein. Ces travaux démontrent que la palmitoylation de NTSR1 est requise pour la



signalisation des MAPKs *via* NTSR1 et la prolifération cellulaire dans ces cellules (Heakal et al., 2011). Une augmentation de l'expression de NTSR3/sortiline a été décrite dans les tissus de patients atteints de cancer du sein comparé à des tissus normaux (Roselli et al., 2015). Cette expression est associée à une agressivité du cancer et contribue à l'adhésion et à l'invasion des cellules tumorales, dépendantes de l'activation des FAK (*Focal Adhesion Kinase*) et de Src (Roselli et al., 2015). Enfin, une étude a également démontré que l'association sortiline-TrkA dans les cellules cancéreuses du sein induit une signalisation de survie et l'invasion ganglionnaire après stimulation par le pro-NGF (Demont et al., 2012).

II.4.1.7. Autres cancers

Dans le cancer gastrique, des études ont révélé une corrélation positive entre l'augmentation de la concentration de la NTS et l'activité de la métalloprotéinase matricielle-9 (MMP-9). La NTS favorise la migration et l'invasion de cellules cancéreuses *via* les voies de signalisation PKC, ERK et PI3K. Le SR48692 inhibe significativement l'invasion cellulaire et la migration des cellules cancéreuses induites par la NTS (Akter et al., 2015). Dans les cellules de carcinome épidermoïde de la tête et du cou (SCCHN), l'expression de la NTS et NTSR1 favorise l'invasion et la migration cellulaire, et induit l'expression transcriptionnelle de l'IL-8 et de MMP1, tandis que l'inactivation du gène *NTSR1* dans les lignées cellulaires de SCCHN réduit l'invasion et la migration cellulaires (Shimizu et al., 2008).

Dans le carcinome hépatocellulaire ou l'hépatocarcinome (CHC) l'augmentation de l'expression de la NTS s'associe à celle de l'IL-8 et à l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), et est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CHC (Yu et al., 2013). De plus, dans les cellules CD133⁺ initiatrices de tumeurs, la NTS augmente l'expression d'IL-8 et CXCL1 et active la voie de signalisation RAF-1 et la phosphorylation de ERK1/2. L'activation de la cascade de signalisation de l'IL-8 favorise ainsi l'angiogenèse tumorale, la tumorigénèse et l'auto-renouvellement (Tang et al., 2012). L'expression de NTSR1 et de la NTS augmente chez plus de 50% des patients ayant un CHC et est associée à un mauvais pronostic. Cette activation s'accompagne d'une dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine et de l'augmentation d'expression de l'EGFR (Wu et al., 2017). De plus, dans cette pathologie, l'activation NTS/NTSR1 est impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse et les métastases par activation de la voie Wnt/ β -caténine (Ye et al., 2016). Ces conditions expérimentales ont permis d'évaluer la sensibilité *in vitro* et dans les modèles animaux des cellules de CHC surexprimant NTSR1 au sorafenib et à l'erlotinib. L'expression de NTSR1 pourrait ainsi constituer un marqueur théranostique potentiel de réponse thérapeutique chez ces patients. La voie Wnt/ β -caténine est également



impliquée dans l'expression et la sécrétion de la NTS dans des tumeurs neuroendocrines par activation du promoteur de la NTS (Kim et al., 2015a).

Dans les cellules de mélanome, NTSR1 est généralement très exprimé et joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*, alors que le SR48692 réduit la prolifération cellulaire et le potentiel d'auto-renouvellement de ces cellules (Zhang et al., 2014).

L'ensemble, de ces études suggèrent qu'en plus des effets anti-apoptotiques, la NTS et ses récepteurs peuvent augmenter la croissance, la migration et l'invasion dans différents types de cancers. La NTS et ses récepteurs sont activés dans de nombreux cancers et sont impliqués dans les différentes étapes de la progression tumorale. Ainsi, ils peuvent être considérés comme des marqueurs diagnostiques et pronostiques, dans certains cas (sein, bronchique et foie) ils permettent de prédire la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase dont ils augmentent les récepteurs cibles et constituent également de nouvelles voies thérapeutiques potentielles.

II.4.2. La signalisation oncogénique de la NTS et ses récepteurs

La NTS et ses récepteurs activent plusieurs voies de signalisations impliquées dans la prolifération, la survie, la migration et l'invasion cellulaire. Le récepteur NTSR1 est principalement couplé à la sous-unité $G\alpha_{q/11}$, l'activation de ce complexe conduit à la stimulation de la PLC, suivie de l'hydrolyse du PIP2 en DAG et en IP3 (Najimi et al., 2002). Le DAG et l'IP3 stimulent la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire et la PKC respectivement, qui sont des effecteurs clés de l'effet oncogénique de la NTS (Dupouy et al., 2011) (Figure 20).

La voie de signalisation PKC induite par la NTS est la plus étudiée. Une fois activée, la PKC induit la voie des MAPKs *via* une stimulation directe de Raf-1, indépendamment de Ras. L'activation de la voie des MAPKs stimule la transcription des gènes en activant des facteurs de transcription, tels Egr-1 (*Early growth response protein-1*), le facteur de la famille Ets (Elk1), AP-1 (*Activator Protein 1*), et c-myc (Guha et al., 2003). De plus, la NTS active la protéine kinase D (PKD) *via* la PKC et une fois activée, la PKD favorise l'expression du facteur de transcription NF- κ B (Figure 20). L'implication de NTSR1 dans cette signalisation a été confirmée (Kisfalvi et al., 2010). Le récepteur NTSR3/sortiline peut former des hétérodimères avec NTSR1 participant ainsi à la signalisation NTS/NTSR1 en activant les voies de signalisation des MAPK/ERK et PI3K/AKT (Martin et al., 2002) (Figure 20). L'effet stimulant de NTS sur l'expression du facteur de transcription NF- κ B est également en corrélation avec sa capacité à augmenter les taux d'IP3 et à mobiliser le Ca^{2+} intracellulaire.



NF- κ B induit l'expression de miR-21, qui conduit à une diminution de l'expression de PTEN (*Phosphatase and TENSin homolog*), un régulateur négatif de la signalisation AKT, une voie généralement impliquée dans les mécanismes du développement tumoral (Figure 20) (Bakirtzi et al., 2011).

Une autre voie responsable de la migration et/ou de l'invasion cellulaire induite par la NTS implique les membres de la famille des petites Rho-GTPases, telles que Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate-1*), RhoA (Ras-homology gene family, membre A), et Cdc42 (*Cell division control protein 42 homolog*) (Figure 20). Ces Rho-GTPases sont responsables de la dynamique du cytosquelette connue pour contribuer à la formation de diverses expansions cytoplasmiques (Servotte et al., 2006). La NTS et la forme soluble de la sortiline (sNTSR3) (après son internalisation), induisent la protéine FAK (*Focal Adhesion Kinase*) (Figure 20) qui une fois activée, agit sur la signalisation PI3K (Massa et al., 2013). Le complexe NTS/NTSR1 active la signalisation IL-8/CXCR1, qui stimule la protéine JAK (*Janus kinases*) et par la suite favorise l'activité de STAT3 (Figure 20) (Tang et al., 2012).

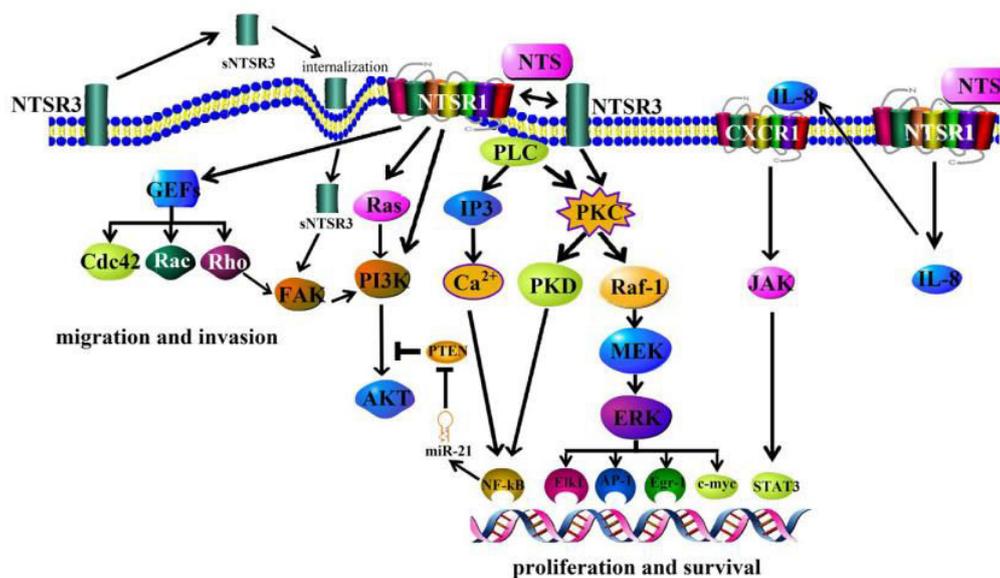


Figure 20 : Représentation des voies de signalisation par lesquelles la NTS et ses récepteurs contribueraient à la progression tumorale.

La NTS interagit avec les NTSRs et active trois voies de signalisations majeures : l'activation des petites GTPases, qui est principalement impliquée dans l'organisation et la mobilité du cytosquelette cellulaire. L'interaction de NTSR1 avec NTSR3 régule la voie Ras/PI3K/AKT, ce qui conduit à la survie et à la prolifération cellulaire. La voie intracellulaire du Ca²⁺ est capable de réguler la prolifération cellulaire et la voie PI3K/AKT de façon post-transcriptionnelle. NTS/NTSRs activent la survie et la prolifération cellulaire par la voie PKC/MEK/ERK. NTS/NTSRs favorise l'activation de JAK/STAT3 en favorisant l'IL-8/CXCR1. La forme soluble de NTSR3 (sNTSR3) stimule FAK suite à son internalisation (d'après Ouyang et al., 2017).



Chapitre III. Les neurotrophines et leurs récepteurs

III.1. Les neurotrophines (NTs)

III.1.1. Généralités et découvertes des NTs

Les NTs sont des facteurs de croissances qui jouent un rôle important dans le développement du système nerveux et sont impliqués dans la survie/apoptose, la prolifération, la différenciation, la myélinisation, ainsi que la croissance axonale et la plasticité synaptique. L'histoire des NTs a commencé il y a 60 ans lorsque Levi-Montalcini, Cohen, et Hamburger ont découvert le NGF comme facteur nécessaire pour la croissance axonale à partir d'explants (Cohen, 1960; Levi-Montalcini and Cohen, 1956; Levi-Montalcini and Hamburger, 1951). Cette découverte a permis de rechercher d'autres facteurs impliqués dans la survie et la différenciation neuronales dans le SNC. Les autres NTs, BDNF (Barde et al., 1982), NT-3 (*neurotrophin-3*) (Maisonpierre et al., 1990), et NT-4/5 (*neurotrophin-4/5*) (Berkemeier et al., 1991; Ip et al., 1992) ont été identifiées 30 ans plus tard. En outre, deux NTs supplémentaires souvent liées au NGF, à savoir NT-6 et NT-7 ont été identifiées chez les téléostéens (poissons) et ne semblent pas avoir d'orthologues chez les mammifères (Götz et al., 1994; Nilsson et al., 1998).

Toutes les NTs sont initialement synthétisées sous forme de précurseurs ou de pro-NTs, (pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT3 et pro-NT4) et ensuite clivées pour former les NTs matures qui se lient à deux catégories de récepteurs transmembranaires. La première catégorie regroupe 3 membres de récepteurs de haute affinité de la famille des Trks (*Tropomyosin-Related Kinase*), composés d'un domaine extracellulaire, d'un seul domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire contenant le domaine catalytique tyrosine kinase. Seules les NTs matures activent les récepteurs Trks et 3 voies principales de signalisation en découlent et incluent, la voie des MAPKs impliquée dans la survie et la différenciation, la voie PI3K/AKT qui contrôle plusieurs fonctions neuronales telles que la survie et la croissance des neurites et enfin, la voie PLC γ /PKC qui est impliquée principalement dans le contrôle de la plasticité synaptique (Deinhardt and Chao, 2014; Skaper, 2012). La deuxième catégorie de récepteur des NTs est représentée par le récepteur p75 (p75^{NTR}), premier récepteur identifié pour le NGF appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (Arévalo and Wu, 2006). p75^{NTR} lie à la fois toutes les NTs matures avec une faible affinité, en revanche il possède une forte affinité pour les pro-NTs (Hempstead, 2014).



III.1.2. Structure et biogenèse des NTs

Comme de nombreuses protéines sécrétées, les NTs sont synthétisées sous forme de précurseurs (pré-pro-NTs) d'environ 27 kDa au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Ces précurseurs sont par la suite clivés au niveau intracellulaire et génèrent des NTs matures de 13 à 15 kDa (Lessmann and Brigadski, 2009; Lessmann et al., 2003) (Figure 21).

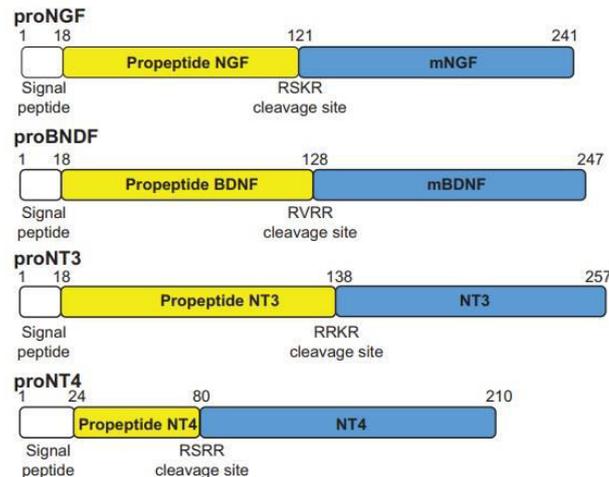


Figure 21 : Synthèse des NTs.

Les ARNm des NTs sont traduits en protéines immatures ou pré-pro-NTs possédant un peptide signal, un propeptide et la protéine mature. Après clivage du peptide signal au niveau du RE, les pro-NTs sont ensuite transportées jusqu'à l'appareil de Golgi, où elles peuvent être soit sécrétées sous forme de pro-NTs ou soit sous forme de NTs matures après clivage intracellulaire par des furines protéases, ou clivage extracellulaires par la plasmine ou certaines métalloprotéases (d'après Gibon and Barker, 2017).

Les pro-NTs peuvent aussi, après sécrétion, être clivées par des protéases extracellulaires comme la plasmine et certaines métalloprotéases matricielles (MMPs). Toutes les formes matures des NTs présentent une forte homologie et des similitudes structurelles. Les formes matures de BDNF, NT-4 et NT-3 ont environ 50% d'homologie en acides aminés avec le NGF. Toutes les NTs matures montrent une forte homologie entre les espèces (90-100%), ce qui a fortement facilité l'utilisation des modèles animaux (Prakash et al., 2010).

III.2. Les récepteurs aux NTs

III.2.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (Trks)

Les récepteurs Trks sont une famille de glycoprotéines transmembranaires composée de TrkA (*NTRK1*), TrkB (*NTRK2*) et TrkC (*NTRK3*). TrkA est le premier récepteur Trk découvert et identifié plus tard comme un récepteur pour le NGF (Klein et al., 1991a). Par la



suite, TrkC et TrkB ont été identifiés grâce à leur homologie de séquence et de structure avec le récepteur TrkA. TrkB fut identifié comme étant le récepteur de haute affinité pour le BDNF et la NT-4/5 et TrkC celui de la NT-3 (Klein et al., 1991b; Lamballe et al., 1991). La NT-3 se lie également à TrkA et TrkB en l'absence de son récepteur spécifique, mais avec moins d'affinité (Arévalo and Wu, 2006; Chao, 2003a). Toutes les NTs matures se lient au récepteur p75^{NTR} avec la même affinité. Cependant, les précurseurs des NTs, les pro-NTs, ont été identifiés comme étant des ligands de haute affinité pour p75^{NTR} lorsqu'il est associé à NTSR3/sortiline (Figure 22).

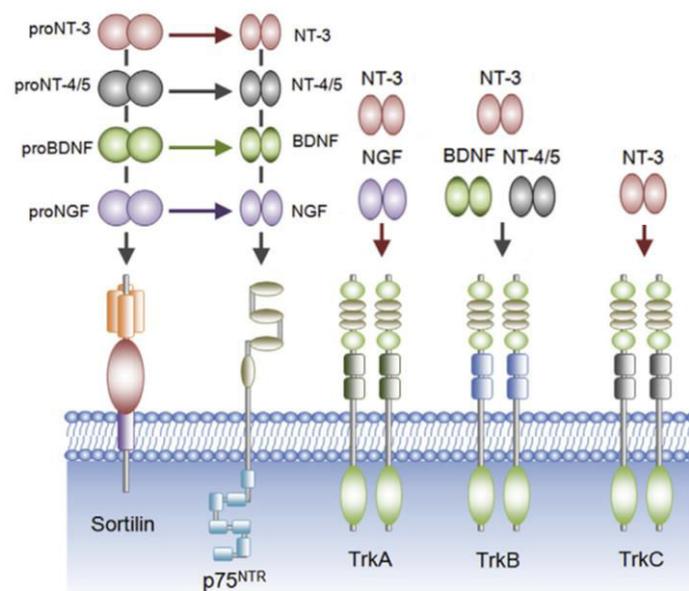


Figure 22 : Interaction des pro-NTs et des NTs matures avec les récepteurs Trks et p75^{NTR}.

Les NTs présentent des interactions spécifiques avec trois récepteurs Trks: NGF lie TrkA, BDNF et NT-4/5 lient TrkB, et NT-3 lie TrkC. Dans certains cas, NT-3 peut également activer TrkA et TrkB avec une faible affinité. Les pro-NTs et toutes les NTs se lient à p75^{NTR} (adapté de Bradshaw et al., 2015).

III.2.2. Structure et isoformes des Trks

III.2.2.1. Structure des Trks

Les trois récepteurs Trks partagent tous une structure commune et se présentent sous la forme de protéines transmembranaires. Ces dernières sont constituées d'un domaine extracellulaire fortement glycosylé composé de trois régions riches en leucines flanquées de deux régions riches en cystéines, suivis de deux domaines immunoglobuline-like de type C2 (Ig-C2) (Figure 23).

La liaison des NTs aux récepteurs Trks se fait principalement à travers les domaines Ig-C2, comme décrit dans les expériences de délétions et de constructions chimériques



(Arevalo et al., 2001; Pérez et al., 1995). Les motifs riches en leucines et cystéines peuvent également être impliqués (MacDonald and Meakin, 1996). En plus de leur implication dans la liaison du ligand, les domaines Ig-C2 peuvent également stabiliser les formes monomériques des récepteurs Trks pour empêcher leurs dimérisations spontanées et leurs activations en l'absence des NTs (Arevalo et al., 2000). Les glycosylations au niveau de la partie extracellulaire sont également impliquées dans le contrôle de l'activation des récepteurs Trks. En effet, en plus de leur rôle dans le bon adressage de ces derniers à la membrane, elles semblent prévenir leur activation spontanée en l'absence de leurs ligands (Watson et al., 1999). Le domaine intracellulaire conservé entre les différents Trks et contenant un domaine tyrosine kinase est phosphorylable sur de nombreuses tyrosines. En effet, les tyrosines Y670, Y674, et Y675 sont situées dans le domaine tyrosine kinase responsable de la trans-autophosphorylation du récepteur. La tyrosine phosphorylable Y490 est située du côté N-terminal et constitue un site de fixation des protéines adaptatrices Shc (*Src homology 2 domain-containing protein*) et FRS-2 (*Fibroblast growth factor Receptor Substrate-2*). Du côté C-terminal, on retrouve la tyrosine Y785 qui constitue un site de fixation de la PLC γ (Huang and Reichardt, 2003).

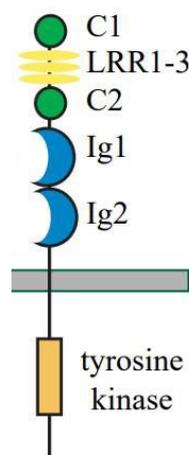


Figure 23 : Structure des récepteurs Trks.

Chaque Trk se compose d'un domaine extracellulaire constitué de régions riches en cystéines C1/C2, leucines LRR1-3 et deux domaines Immunoglobuline-like «Ig-like» Ig1/Ig2, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire composé d'un large domaine tyrosine kinase responsable de sa trans-autophosphorylation donc de son activation (d'après Reichardt, 2006).

III.2.2.2. Les isoformes des Trks

Les principales isoformes des récepteurs Trks sont le résultat d'épissages alternatifs conduisant à de nombreuses isoformes de fonctions biologiques diverses :

III.2.2.2.1. TrkA



Il existe 3 isoformes de TrkA nommées TrkA-I, -II, -III. TrkA-III est l'isoforme principale de TrkA, elle est exprimée dans la plupart des cellules non neuronales et possède 796 acides aminés. L'isoforme neuronale TrkA-I est dépourvue de l'exon 9 (790 acides aminés) (Barker et al., 1993) qui code 6 acides aminés dans le domaine extracellulaire près de la région transmembranaire de TrkA et ne modifie pas le cadre de lecture. La présence de cet insert n'affecte pas la liaison de NGF ni l'activation du récepteur, en revanche, elle participerait à la sélectivité de TrkA pour la NT-3 qui ne se lie pas sur TrkA-I (Clary and Reichardt, 1994). La troisième isoforme, TrkA-III qui résulte de l'épissage alternatif des exons 6, 7 et 9 est constitutivement active indépendamment de son ligand et serait impliquée dans l'agressivité des neuroblastomes (Tacconelli et al., 2004) et le développement des thymocytes (Tacconelli et al., 2007) (Figure 24).

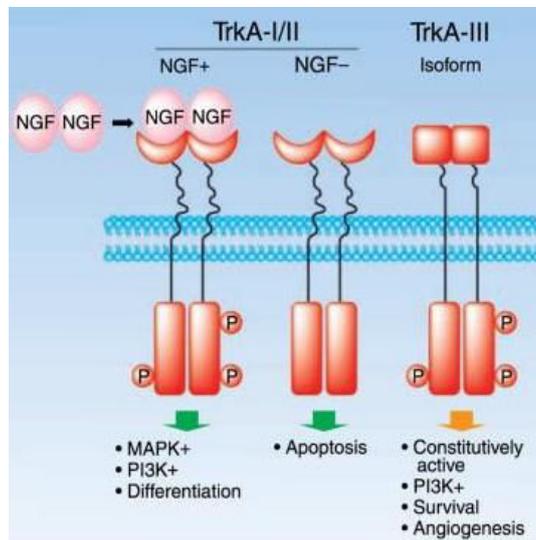


Figure 24 : Les isoformes de TrkA.

L'activation des isoformes TrkA-I (neuronales) ou TrkA-II (non-neuronales) par le NGF conduit à l'activation et à la signalisation de TrkA, entraînant finalement une survie et une différenciation neuronale. En l'absence de ligand, des voies alternatives sont activées conduisant à l'apoptose. L'isoforme TrkA-III est constitutivement active, indépendante du ligand et favorise la survie principalement à travers la voie PI3K/AKT (d'après Brodeur et al., 2009).

III.2.2.2.2. TrkB

Il existe 3 isoformes majoritaires issues des épissages alternatifs de l'ARNm du gène *NTRK2* humain. L'isoforme la plus longue, TrkB-FL (*Full Length*) est épissée des exons 16 et 19, et contient un codon stop dans l'exon 24 du gène *NTRK2* (Luberg et al., 2010; Stoilov et al., 2002). TrkB-FL garde son activité catalytique et sa capacité à induire la survie, l'angiogénèse ou la différenciation grâce son domaine tyrosine kinase conservé (Figure 25). TrkB-T1 est l'isoforme la plus courte constituée de 11 acides aminés dans sa partie



intracellulaire et possède un codon stop dans l'exon 16. Elle est tronquée de la quasi-totalité de sa partie intracellulaire, mais présente l'intégralité des domaines extracellulaires et transmembranaires et peut donc se lier aux ligands BDNF et/ou NT4/5 (Figure 25) (Biffo et al., 1995; Luberg et al., 2010).

L'expression de TrkB-T1 est ubiquitaire et présente dans les tissus neuronaux et non-neuronaux tels que la moelle osseuse (Labouyrie et al., 1999), le cœur, les muscles squelettiques, les poumons, les reins et le pancréas (Stoilov et al., 2002). Le rôle exact de TrkB-T1 n'est pas encore défini mais plusieurs hypothèses ont été avancées. En effet, certaines études montrent qu'il pourrait agir comme un dominant négatif de TrkB-FL en séquestrant le BDNF, ou en formant un hétérodimère avec ce dernier empêchant ainsi son activation (Brodeur et al., 2009; Haapasalo et al., 2002). Cependant, certaines études montrent que cette isoforme pourrait avoir sa propre signalisation, et permettre aux astrocytes de réguler le taux du BDNF dans le microenvironnement des neurones (Fryer et al., 1997). Dans les mêmes cellules, elle peut également être responsable du relargage du stock de calcium intracellulaire (Rose et al., 2003), et réguler la morphologie cellulaire par interaction directe avec la protéine Rho-GDI1 (*Rho GDP-Dissociation Inhibitor 1*) (Ohira et al., 2005). Dans le cancer du pancréas, en séquestrant Rho-GDI1 et en activant RhoA, TrkB-T1 induit la formation de métastases hépatiques (Li et al., 2009a).

Enfin, une autre étude a montré que TrkB-T1 est impliqué dans la survie induite par le BDNF et la NT4/5 dans les cellules cancéreuses du sein (Suwaki et al., 2011). La dernière isoforme TrkB-Shc est épissée de l'exon 16 et possède un codon stop dans l'exon 19. Cette isoforme conserve un court domaine cytoplasmique permettant une liaison aux protéines adaptatrices Shc (Figure 25). Contrairement aux deux autres isoformes, TrkB-Shc est retrouvé exclusivement dans le cerveau (Luberg et al., 2010; Stoilov et al., 2002), et pourrait interagir avec le TrkB-FL, mais ce dernier ne peut le phosphoryler suggérant un rôle de régulateur négatif (Stoilov et al., 2002). L'expression de TrkB-Shc varie de la même façon que TrkB-FL et son activité biologique est à étudier (Nishida et al., 2008).



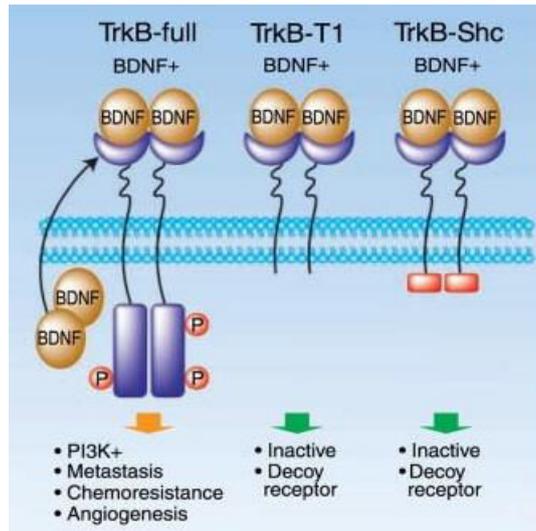


Figure 25 : Les isoformes de TrkB.

Il existe deux isoformes principales du récepteur TrkB. L'une est tronquée et l'autre est dépourvue du domaine kinase. La première isoforme (TrkB-T1) est tronquée juste après le domaine transmembranaire. La deuxième isoforme (TrkB-Shc) est légèrement plus longue et comprend le site de liaison Shc. Les deux contiennent le site de liaison du ligand, de sorte qu'ils peuvent inhiber l'activation soit en compétition pour la liaison du ligand ou en formant des hétérodimères fonctionnellement inactifs avec le TrkB-FL (*Full-Length*) (d'après Nishida et al., 2008).

III.2.2.2.3. Trk

TrkC, le dernier membre de la famille Trk, est lui aussi soumis comme TrkA et TrkB au phénomène d'épissage alternatif aboutissant à 4 isoformes, avec une isoforme prédominante nommée TrkC-T1 (Figure 26). Seule la forme entière du récepteur (TrkC-FL) est capable d'induire une signalisation, et correspond à la forme active du récepteur. En revanche toutes les isoformes sont dépourvues du domaine tyrosine kinase et jouerait un rôle de dominants négatifs ou de récepteurs leurres (Brodeur et al., 2009).



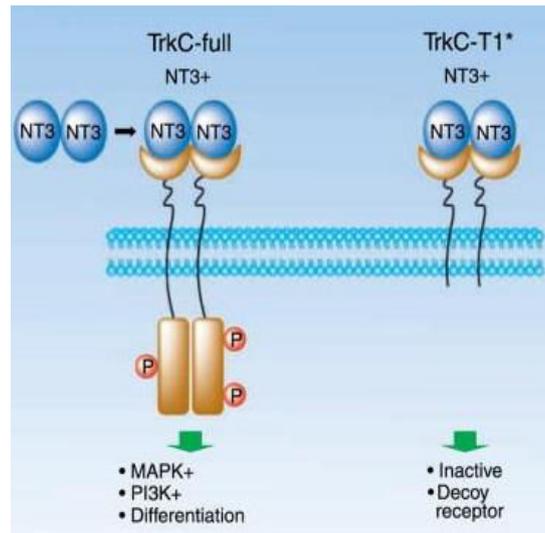


Figure 26 : Les isoformes de TrkC.

La forme TrkC-FL est la forme entière du récepteur, elle possède une partie intracellulaire avec un domaine tyrosine kinase intact induisant une signalisation de survie et de différenciation. Il existe au moins quatre isoformes tronquées qui n'ont pas de domaine kinase. L'isoforme TrkC-T1 est la plus retrouvée et est assimilée à un récepteur leurre qui jouerait un rôle de dominant négatif (d'après Brodeur et al., 2009).

III.2.3. Les voies de signalisation des Trks

Beaucoup de signaux extracellulaires transduisent leurs réponses en régulant la phosphorylation des tyrosines de leurs protéines cibles. L'oligomérisation induite par le ligand du récepteur tyrosine kinase et l'autophosphorylation ont été établies comme un mécanisme général pour l'activation des récepteurs des facteurs de croissance, ainsi que de nombreuses autres familles de récepteurs de surface cellulaire (Weiss and Schlessinger, 1998). Dans les cellules neuronales, les voies de signalisation activées suite à la fixation des NTs sur les Trks aboutissent à de nombreuses fonctions, comme la survie cellulaire, la différenciation, la formation de synapses, la plasticité, la croissance et l'orientation axonale (Arévalo and Wu, 2006). Cette fixation entraîne la dimérisation, et la trans-phosphorylation des récepteurs, le recrutement de différents adaptateurs et enzymes, et l'activation de plusieurs voies de signalisation. Les tyrosines Y490 et Y785 du récepteur TrkA et leurs tyrosines correspondantes au niveau des récepteurs TrkB et TrkC, sont phosphorylées en réponse aux NTs et servent de site de fixation de protéines adaptatrices et enzymes. Y490 et Y785 recrutent principalement Shc et la phospholipase C- γ (PLC- γ), respectivement. Les tyrosines phosphorylées du domaine kinase, Y670, Y674 et Y675, peuvent également engager des protéines adaptatrices, comme SH2B, APS (*Adaptor protein with PH and SH2 domains*) et Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein-2*) (MacDonald et al., 2000; Qian et



al., 1998). Parmi les voies de signalisation activées par les récepteurs Trks en réponse aux NTs, les voies MAPKs, PI3K et PLC- γ /PKC ont été les plus étudiées (Figure 27) (Huang and Reichardt, 2003). La plupart des travaux décrivant ces voies de signalisation ont été réalisées sur des cellules PC12, une lignée cellulaire issue de cellules de phéochromocytome de rat qui répond au NGF. Ces voies ont été étudiées en grande partie dans le contexte de l'activation de TrkA par le NGF, et ont ensuite été extrapolées aux autres récepteurs Trks (Chao, 2003a). Par la suite, plusieurs nouvelles protéines en aval des récepteurs Trks ont été décrites. Ces dernières, peuvent contribuer aux fonctions biologiques induites par les NTs (Arévalo and Wu, 2006).

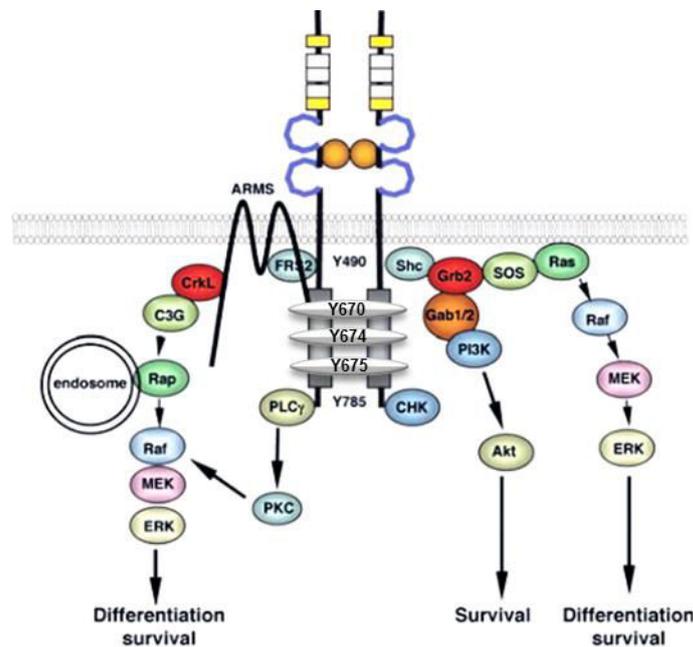


Figure 27 : Les voies de signalisation activées par les Trks.

La fixation des NTs aux récepteurs Trks conduit à leur activation par dimérisations et autophosphorylation des tyrosines Y490, Y670, Y674, Y675 et Y785. Une fois activés, les récepteurs Trks entraînent l'activation des différentes voies de signalisation Ras/Rap-MAPK, PI3K/AKT et PLC γ /PKC, impliquées dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Shc : *Src homology-2 containing protein*; Grb2 : *Growth factor receptor-bound protein* ; Gab1/2 : *Grb2-associated binding protein 1/2* ; PI3K : *Phosphatidyl Inositol Tri-phosphate Kinase* ; AKT: *Protein kinase B* ; SOS : *Son Of Sevenless* ; Ras : *Ras GTPase activating protein* ; Raf : *Raf kinase* ; MEK : *MAP ERK Kinase* ; ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase* ; CHK : *Checkpoint Kinase* ; FRS-2 : *Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2* ; ARMS : *Ankyrin Repeat-rich Membrane Spaning adaptor* ; PLC- γ : *Phospholipase C- γ* ; PKC : *Protein Kinase C* ; CrkL: *Crk-like protein*, C3G : *Crk SH3-domain-binding guanine-nucleotide releasing factor* ; Rap : *Ras-related protein*. (d'après Arévalo and Wu, 2006; Brodeur et al., 2009).



III.2.3.1. La voie des MAP kinases

Les NTs peuvent induire deux types d'activation de la voie des MAPKs (Figure 27). Le premier type est une activation transitoire qui dépend de l'activation de la GTPase Ras et implique Shc-Grb2-SOS-Ras-B-Raf/Raf-1-MAPK. L'activation de la petite GTPase Ras en réponse aux NTs a été mise en évidence dans la signalisation et la régulation de la transcription impliquée dans la survie et la différenciation neuronale (Qiu and Green, 1991).

La protéine Ras transite entre un état actif liée au GTP (*Guanosine triphosphate*), et un état inactif liée au GDP (*Guanosine diphosphate*). Cette activité biologique est contrôlée par des GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) et des GAPs (*Guanosine triphosphatase Activating Proteins*). La stimulation du récepteur TrkA par le NGF engage Shc et Grb2 pour activer GEF/SOS (*Son Of Sevenless*), qui active ensuite Ras (Stephens et al., 1994). L'activation de Raf-1 et B-Raf en aval de Ras déclenche par la suite l'activation de ERK/MAPK (Thomas et al., 1992; Troppmair et al., 1992). La stimulation de Ras à travers cette voie favorise uniquement l'activation transitoire des MAPKs (Marshall, 1995). L'ensemble de cette signalisation peut être régulée négativement d'une part, par les MAPKs elles-mêmes, qui, en phosphorylant GEF/SOS, vont conduire à une dissociation du complexe Grb2-SOS (Kao et al., 2001), et d'autre part, par la protéine neurofibromine, qui semblerait jouer un rôle dans l'arrêt de cette voie de signalisation (Vogel et al., 2000).

Le second type d'activation de la voie des MAPKs par les NTs, permet une signalisation prolongée qui implique les adaptateurs CrkII/CrkL, GEF C3G, la petite GTPase Rap1 et B-Raf (Figure 27) (Wu et al., 2001; York et al., 1998). L'activation de TrkA par le NGF entraîne une activation de C3G par CrkII/CrkL. C3G active alors Rap1 qui signale plus en aval par B-Raf, ce qui entraîne l'activation constitutive des MAPKs. Cette voie requiert l'internalisation du récepteur Trks dans le compartiment endosomal (York et al., 2000). Les mécanismes menant à l'activation de CrkL reste inconnus, mais pour certains le recrutement de CrkL au récepteur se fait *via* la protéine adaptatrice FRS-2 qui peut servir de lien (Kao et al., 2001). *In vitro*, FRS-2 peut se lier au résidu tyrosine en position Y490 de TrkA après phosphorylation et rentrer en compétition avec Shc, et il peut également interagir avec le domaine SH2 de CrkII. Pour d'autres, l'activation prolongée des MAPKs n'impliquerait pas FRS-2 (Postigo et al., 2002).

D'autres études ont montré que la protéine ARMS (*Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning adaptor*) pourrait intervenir dans le recrutement de CrkL au niveau des récepteurs Trks. En effet, ARMS devient rapidement phosphorylée en réponse aux NTs et reste active pendant longtemps et s'associe aux récepteurs Trks par des interactions transmembranaires (Arévalo et al., 2004; Kong et al., 2001). Que ce soit par une activation transitoire ou une



activation prolongée, les MAPKs vont activer plusieurs kinases comme Rsk (*Ribosomal S6 Kinase*) et MSK1 (*Mitogen- and stress-activated protein kinase-1*) permettant la phosphorylation de CREB (*C-AMP Response Element-Binding protein*), qui contrôle l'expression des gènes liés à la survie et la différenciation cellulaire (Deak et al., 1998; Xing et al., 1996).

III.2.3.2. La voie PI3K/AKT

Les NTs jouent un rôle important dans la survie de plusieurs populations neuronales pendant le développement, et la voie de signalisation PI3K/AKT est essentielle pour cette fonction. Les récepteurs Trks actifs engagent Shc, qui s'associe à Grb2 et Gab1 (*GRB2-associated-binding protein-1*) pour activer PI3K et, par la suite, Akt (Figure 27). La liaison de PI3K à Gab1 est requise pour l'activation de PI3K, car une étude a montré que la rupture de cette association diminue la survie dépendante du NGF dans les cellules PC12 (Holgado-Madruga et al., 1997). Le rôle de la signalisation PI3K/AKT dans la survie a également été montré dans les neurones de culture primaire et dans la lignée de neuroblastome SH-SY5Y (Atwal et al., 2000; Encinas et al., 1999).

Plusieurs effecteurs différents, pro-apoptotiques et pro-survie, en aval d'Akt peuvent participer à la survie induite par les NTs. Par exemple, une phosphorylation de Bad (*Bcl2-antagonist of cell death*) par Akt conduit à une phosphorylation supplémentaire de Bad par d'autres kinases, ce qui empêche les effets pro-apoptotiques de la protéine (Datta et al., 1997). De même, le facteur de transcription forkhead, FKHRL1, qui régule l'expression de plusieurs protéines pro-apoptotiques, est phosphorylé par Akt en réponse aux NTs, empêchant son activité transcriptionnelle (Zheng et al., 2002). En outre, la voie pro-survie NF- κ B est activée suite à la phosphorylation de l'inhibiteur I κ B (*I-kappa-B-alpha*) par Akt, conduisant à sa dégradation (Foehr et al., 2000; Wooten et al., 2001). PI3K-AKT peut également exercer un effet positif sur la signalisation rétrograde qui module la survie neuronale (Kuruvilla et al., 2000).

III.2.3.3. La voie PLC γ / PKC

La phosphorylation du récepteur Trks sur la tyrosine Y785 conduit au recrutement et à l'activation de PLC γ , ce qui entraîne l'hydrolyse de PIP₂ pour générer de l'IP₃ et du DAG (Obermeier et al., 1993). IP₃ et DAG provoquent l'activation de différentes isoformes de PKC. D'une part, l'IP₃ après fixation sur son récepteur IP₃-R, va entraîner le relargage et l'augmentation de la concentration du stock calcique (Ca²⁺) dans le cytoplasme ce qui stimule les PKC et active les CAMK (*CA²⁺/Calmodulin-regulated protein kinase*). D'autre part, le DAG va concentrer la PKC à la membrane plasmique pour faciliter son activation (Kim et



al., 2000). PKC active ensuite la voie de signalisation Erk1 via Raf (Figure 27) (Corbit et al., 1999). Une autre voie d'activation de la PKC a été décrite, cette dernière implique la protéine adaptatrice FRS-2 qui peut recruter la protéine Src responsable de la phosphorylation de l'isoforme PKC- α (Wooten et al., 2001). La signalisation PLC γ peut être importante pour la signalisation de TrkB en réponse au BDNF qui est impliquée dans la plasticité synaptique dans l'hippocampe (Minichiello et al., 1999; Patterson et al., 1996).

III.2.4. La transactivation des récepteurs Trks

Outre les effets directs induits par leurs ligands, l'activation des récepteurs Trks peut également se produire par interaction avec d'autres récepteurs. Un mécanisme particulier étudié ces dernières années est celui de la transactivation des RTKs par les RCPGs (Cattaneo et al., 2014; Mitre et al., 2017). Ainsi, l'interaction RCPG-RTK forme une plateforme de signalisation conduisant à un signal de survie impliquant le ligand du RCPG ou du récepteur RTK (Pyne and Pyne, 2011). Dans ce contexte, des travaux ont démontré que l'adénosine, un neuromodulateur qui agit grâce à son récepteur A_{2A} (RCPG), augmente la phosphorylation de TrkA et de TrkB dans les cellules PC12 et dans les cellules neuronales de l'hippocampe après 1 à 2 heures de traitement (Lee and Chao, 2001). Cette transactivation qui conduit à l'activation de la voie PI3K/AKT et la survie cellulaire, nécessite le récepteur à l'adénosine A_{2A}, et ne résulte pas de la production des NTs (Lee and Chao, 2001). Le neuropeptide PACAP (*Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*), permet également la transactivation des récepteurs Trks de la même façon que l'adénosine (Lee et al., 2002b). Les effets de l'adénosine et de PACAP peuvent être inhibés par le K252a, un inhibiteur pharmacologique des récepteurs Trks (Skaper, 2008).

La transactivation des récepteurs RTKs est considérée comme essentielle pour les fonctions physiologiques. Par exemple, le récepteur à l'IGF-1, et le récepteur du PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) peuvent être transactivés par les RCPGs, et conduire à des réponses prolifératives et l'activation des MAPKs. De même, la signalisation *via* les récepteurs à la dopamine conduit à une activation de PDGF impliqué dans la transmission synaptique (Kotecha et al., 2002). Une autre étude a révélé que le récepteur D1 de la dopamine stimule le développement des neurones du striatum par transactivation de TrkB. En effet, il a été démontré que l'activation du récepteur D1 est accompagnée d'une augmentation de l'expression de TrkB à la surface et une activation des voies de signalisation PLC γ , Akt et MAPK (Iwakura et al., 2008). Enfin, il a été démontré que la protéine tyrosine kinase Fyn est activée par les RCPGs, et est responsable de la transactivation des récepteurs Trks au niveau intracellulaire (Rajagopal and Chao, 2006; Rajagopal et al., 2004).



L'autre exemple, est celui de la transactivation impliquant l'induction des MMPs par les RCPGs, ce qui conduit à un clivage du pro-EGF et la transactivation de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (Domeniconi and Chao, 2010). La transactivation de l'EGFR par les RCPGs peut se faire également sans l'intervention des MMPs. En effet, cette activation implique directement des messagers secondaires tels que, les kinases de la famille Src et la protéine-tyrosine kinase Pyk2 (*Proline-rich trosine kinase 2*) (Figure 28, a), qui interagissent avec l'EGFR (Keely et al., 2000; Luttrell et al., 1996). De plus, il a même été montré que la kinase Src phosphoryle et active directement l'EGFR (Biscardi et al., 1999). L'activation des RTKs est également associée à la génération du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ce qui entraîne vraisemblablement l'inactivation réversible des protéines tyrosine phosphatases (PTPs) (Sundaresan et al., 1995). Il est intéressant de noter que la stimulation de nombreux RCPGs conduit également à la génération de l' H_2O_2 , ce qui pourrait inactiver les PTPs qui contrôlent négativement les RTKs, conduisant ainsi à leur transactivation (Figure 28, b).

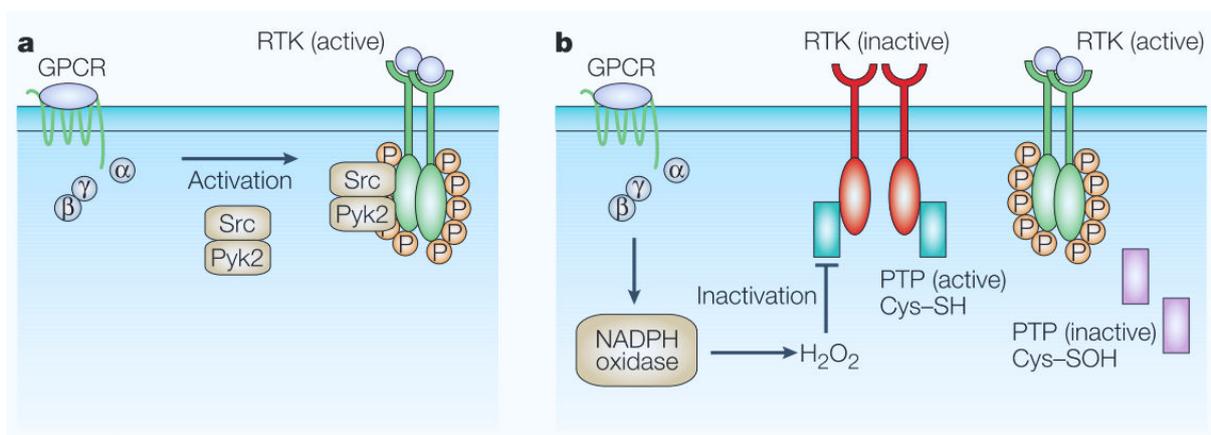


Figure 28 : Transactivation des RTKs par les RCPGs.

D'autres mécanismes d'activation des RTKs en l'absence de leurs ligands ont été proposés. **a** : Un mécanisme impliquant des protéines tyrosines kinases cytoplasmiques (comme par exemple, Src et Pyk) **b** : Alternativement, l'activation des RCPGs pourrait conduire à la production d' H_2O_2 par l'activation de la NADPH oxydase. Les PTPs, qui contrôlent négativement l'activité des RTKs et qui sont très sensibles à l'oxydation, sont inactivées de manière transitoire (Cys-SOH) par l' H_2O_2 . A son tour, la signalisation des RTKs est activée. Cys-SH, Forme réduite de la Cystéine (d'après Wetzker and Böhmer, 2003).

La transactivation de l'EGFR par les RCPGs a été particulièrement décrite en cancérologie, notamment dans les cancers du poumon (Moody et al., 2016; Younes et al., 2014), de la prostate (Amorino et al., 2007), du rein (Thomas et al., 2002), du pancréas (Gilmour et al., 2013), et du colon (Itoh et al., 2005). En effet, il a été démontré que le récepteur de la neurotensine NTSR1 potentialise des récepteurs oncogéniques à tyrosine kinase tels que l'EGFR. Cette transactivation favorise la croissance et l'agressivité tumorale



dans le cancer bronchique (Younes et al., 2014) et le cancer du sein (Dupouy et al., 2014). De plus, Les traitements par l'antagoniste spécifique de NTSR1, SR-48692, ou par l'inhibiteur des métalloprotéinases matricielles (GM6001) inhibent cette transactivation et diminuent la prolifération des cellules du cancer bronchique non à petites cellules (Moody et al., 2014). Enfin, dans le cancer de la prostate, la NTS induit l'activation des récepteurs RTKs et stimule la prolifération cellulaire à travers la voie c-Src/Stat5b (*Signal Transducer And Activator of Transcription 5B*) (Amorino et al., 2007).

III.2.5. Le récepteur p75^{NTR}

P75^{NTR} fut identifié pour la première fois en 1973 comme étant un récepteur capable de lier le NGF, et fut appelé initialement NGFR (*NGF Receptor*) (Herrup and Shooter, 1973). Des expériences de clonage et de séquençage du récepteur en 1986 ont révélé qu'il liait le NGF avec une faible affinité ($k_d=10^{-9}$ M), et fut alors renommé LNGFR pour (*Low affinity Nerve Growth Factor Receptor*) (Chao et al., 1986; Johnson et al., 1986). La découverte et l'étude des autres membres de la famille des NTs a montré que tous liaient ce récepteur de 75 kDa (Large et al., 1989) avec la même affinité quel que soit le type cellulaire, ainsi, LNGFR fut alors appelé p75^{NTR} pour (*Neurotrophin receptor p75NTR*) (Rodriguez-Tébar et al., 1990; Rodríguez-Tébar et al., 1992). Et ce n'est qu'au début des années 2000 que p75^{NTR} fut identifié comme récepteur de forte affinité pour les pro-NTs, avec une affinité 5 fois supérieure à celle des NTs (2.10^{-10} M) (Lee et al., 2001).

III.2.5.1. La structure du récepteur p75^{NTR}

Au niveau structural, après clivage de son peptide signal de 28 acides aminés, P75^{NTR} est une protéine transmembranaire de type I de 399 acides aminés comprenant 3 domaines : un domaine extracellulaire, transmembranaire, et intracellulaire. Son domaine extracellulaire contient quatre domaines riches en cystéines CRD (*Cystein-Rich Domain*), caractéristiques de la famille des récepteurs du TNF (Aggarwal, 2003) (Figure 29). Chacun de ces CRD (chargé négativement et numéroté de 1 à 4 à partir de l'extrémité N-terminale) contient 3 ponts disulfure à l'intérieur de chacun conférant au récepteur une conformation allongée permettant sa liaison aux ligands (Barker, 2009; Yan and Chao, 1991).

Le domaine extracellulaire de p75^{NTR} présente également des sites de N- et O-glycosylations qui seraient impliqués dans l'adressage du récepteur à la membrane (Breuza et al., 2002) ainsi que dans sa liaison aux ligands (Gong et al., 2008). Le domaine transmembranaire de p75^{NTR} est composé d'une hélice α unique, dans laquelle la cystéine C257 joue un rôle important dans la dimérisation du récepteur, le changement conformationnel et par conséquent la traduction du signal (Vilar et al., 2009). Enfin, le



domaine intracellulaire qui est dépourvu d'activité enzymatique intrinsèque, contient un domaine de mort DD (*Death Domain*) de type II et est très conservé entre les espèces (Roux and Barker, 2002) (Figure 29). Il possède également un site de palmitoylation sur la cystéine C279 (Barker et al., 1994), et peut être phosphorylé sur des résidus sérine et thréonine (Grob et al., 1985; Taniuchi et al., 1986). La fonction de ces modifications post-traductionnelles n'est pas totalement connue, mais elle pourrait avoir des rôles dans les interactions protéine-protéine, la multimérisation et la localisation du récepteur dans les rafts lipidiques, l'endocytose, le transport vésiculaire et la signalisation du récepteur dans certains compartiments cellulaires (Bronfman and Fainzilber, 2004; Grob et al., 1985; Higuchi et al., 2003; Underwood et al., 2008).

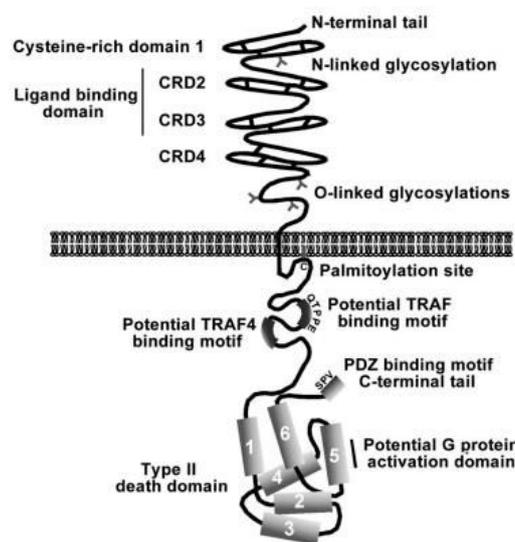


Figure 29 : Structure du récepteur p75^{NTR}.

P75^{NTR} est un récepteur transmembranaire de type I avec un domaine extracellulaire qui contient quatre domaines riches en cystéines (CRD) et des sites de N- et O-glycosylations. Le domaine intracellulaire contient un site de palmitoylation au niveau de la cystéine 279, deux sites potentiels de liaison au TRAF, un domaine de mort de type II, un domaine potentiel d'activation de la protéine G et un motif de liaison au domaine PDZ (d'après Roux and Barker, 2002).

Le domaine de mort de la partie intracellulaire du récepteur p75^{NTR} est une structure globulaire constituée de 6 hélices α (DD1 à DD6) (Figure 29), permettant son interaction avec des protéines adaptatrices responsables de l'activation de la voie des caspases et l'induction de l'apoptose (Roux and Barker, 2002). De plus, le domaine intracellulaire possède un domaine Chopper qui est situé en région juxta-membranaire de p75^{NTR}, et est responsable en grande partie de l'activité pro-apoptotique du récepteur (Coulson et al., 2000). Une étude a révélé que le domaine Chopper comprend des sites de liaison pour tous les TRAFs (*TNF Receptor-Associated Factors*) (Ye et al., 1999). En revanche, d'autres études ont montré que p75^{NTR} ne peut lier que TRAF4 et TRAF6 (Khursigara et al., 1999;



Krajewska et al., 1998). Le recrutement de protéines adaptatrices peut se faire également par le motif SPV (Serine, Proline, Valine) situé en C-terminal du récepteur. Ce dernier interagit avec les protéines à domaines PDZ (*Post-synaptic Disc-large Zona*) (Sheng and Sala, 2001).

III.2.5.2. Les isoformes du récepteur p75^{NTR}

Les formes tronquées de p75^{NTR} sont produites soit par épissage alternatif soit par protéolyse du récepteur (Figure 30). L'épissage alternatif de l'exon III du gène p75^{NTR} conduit à un variant de p75^{NTR} dépourvu des domaines riches en cystéines 2, 3 et 4, générant une isoforme incapable de lier les NTs (Dechant and Barde, 1997; von Schack et al., 2001). Les domaines intracellulaires et transmembranaires de ce variant restent intacts, en revanche, sa fonction biologique demeure inconnue (Roux and Barker, 2002).

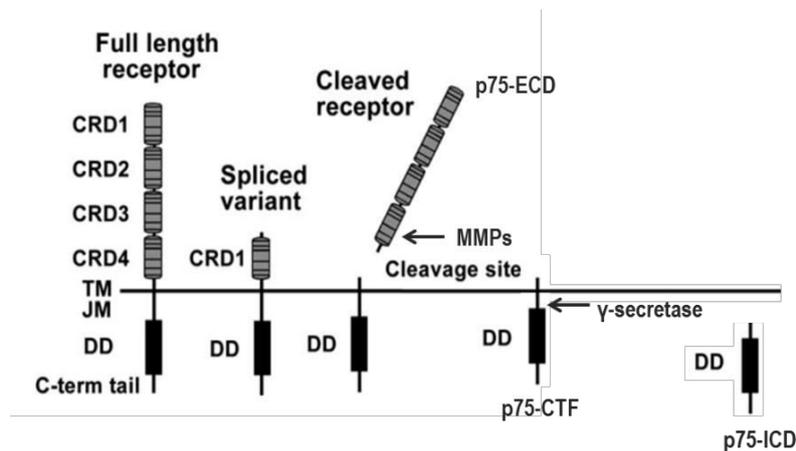


Figure 30 : Les isoformes du récepteur p75^{NTR}.

La transcription du gène p75^{NTR} génère une forme complète du récepteur mais aussi une forme tronquée résultant de l'épissage alternatif de l'exon III. La forme tronquée du récepteur contient un domaine extracellulaire très court composé d'un seul domaine riche en cystéines (CRD1). Les autres formes de p75^{NTR} sont générées par protéolyse. Le clivage par les métalloprotéases (MMPs) conduit à la libération des formes p75-ECD (*Extracellular Domain*) et p75-CTF (*C-terminal fragment*). Enfin, le clivage du CTF par une γ -secrétase libère l'ICD (*Intracellular Domain*) dans le cytoplasme (adapté de (Chao, 2003b; Roux and Barker, 2002).

La forme totale du récepteur p75^{NTR} peut être également clivée par des MMPs extracellulaires dont les ADAM 10 ou 17 (*A Desintegrin And Metalloprotease 10 ou 17*), et libérer un fragment extracellulaire soluble nommé p75-ECD (*Extracellular Domain*), composé des 4 domaines riches en cystéines toujours capable de lier les NTs. L'autre partie du récepteur comportant le domaine transmembranaire et le domaine intracellulaire, est appelé



p75-CTF (*C-Terminal Fragment*). Ce dernier subit à son tour un clivage par un complexe protéique γ -sécrétase générant ainsi un fragment intracellulaire actif appelé p75-ICD (*Intracellular Domain*) (DiStefano et al., 1993; Zupan et al., 1989). P75-CTF peut lier TRAF 6, ainsi activer le facteur de transcription NF- κ B en dégradant son inhibiteur I κ B (Kanning et al., 2003; Powell et al., 2009). De plus, ce fragment a été identifié au niveau nucléaire, suggérant un rôle dans la régulation transcriptionnelle (Bronfman, 2007).

III.2.5.3. Les voies de signalisation induites par p75^{NTR}

Les fonctions attribuées au récepteur p75^{NTR} sont diverses, complexe, et parfois contradictoire. Comme les autres membres de la famille des récepteurs au TNF, p75^{NTR} est dépourvu d'activité catalytique, et sa signalisation dépend des protéines adaptatrices recrutées au niveau de son domaine intracellulaire. L'activation de p75^{NTR} peut mener à l'activation des voies de survie, de différenciation, et de prolifération cellulaire mais aussi à l'induction de l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 31).

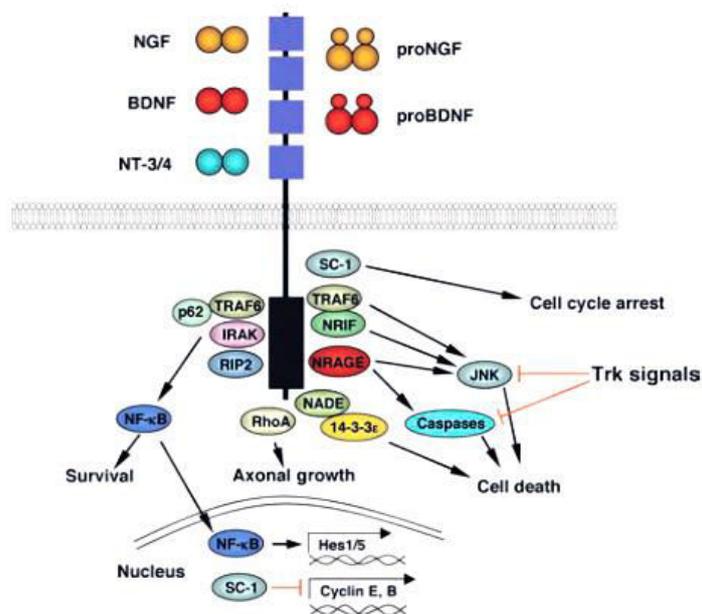


Figure 31 : Les voies de signalisation du récepteur p75^{NTR}.

La liaison des NTs matures ou des pro-NTs à p75^{NTR} induit l'activation de plusieurs voies de signalisations via le recrutement aux domaines intracellulaires du récepteur de différentes molécules adaptatrices, ce qui a pour conséquence des effets parfois opposés tels que la survie, l'apoptose, la croissance axonale ou encore l'arrêt du cycle cellulaire. SC-1: *Schwann Cell factor-1*; TRAF6: *Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6*; NRIF: *Neurotrophin Receptor Interacting Factor*; NRAGE: *Neurotrophin Receptor-interacting MAGe homolog*; NADE: *Neurotrophin receptor Associating Death Effectors*; IRAK: *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*; RIP-2: *Receptor-Interacting Protein-2*; JNK: *c-Jun N-terminal Kinase* (d'après Arévalo and Wu, 2006).



III.2.5.3.1. La signalisation de mort cellulaire

L'activation des voies pro-apoptotiques du récepteurs p75^{NTR} est induite par le recrutement de la protéine Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin*) qui mène à la phosphorylation de la kinase JNK. Cette kinase active à son tour les facteurs de transcription c-Jun et p53, les protéines à domaine BH3 (*Bcl-2 Homology*) comme Bad et Bim (*Bcl-2 Interacting Mediator of cell death*) ainsi que la translocation et l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax. Cette signalisation conduit à la libération du cytochrome c stimulant à son tour une cascade apoptotique par l'activation des caspases 9, 6, et 3 (Nykjaer et al., 2005; Roux and Barker, 2002). L'activation de Rac se ferait par des protéines adaptatrices liées au domaine intracellulaire du récepteur p75^{NTR}. Parmi ces protéines, on trouve NRIF (*Neurotrophin Receptor Interacting Factor*), la NADE (*NT-Associated Cell Death Executor*), la NRAGE (*NT-Receptor-interacting MAGE homolog*), la Sc-1 (*Schwann cell factor-1*) et les TRAFs (Casademunt et al., 1999; Chittka et al., 2004; Geetha et al., 2005; Kimura et al., 2001; Salehi et al., 2000). Ces protéines, peuvent agir seules ou en combinaison, menant à une forte activation de la kinase JNK induisant ainsi l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire (Yeiser et al., 2004) (Figure 31).

III.2.5.3.2. La signalisation de survie cellulaire

Selon le contexte cellulaire, le récepteur p75^{NTR} peut avoir des effets différents en réponse aux NTs. En effet, la liaison des NTs au p75^{NTR} peut induire la survie cellulaire par l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Hamanoue et al., 1999), mais aussi grâce à l'activation de la voie PI3K/AKT qui serait activée indépendamment de la présence de ligand impliquant au moins la protéine adaptatrice Shc (Roux et al., 2001). La voie NF- κ B peut être activée par le NGF, mais pas par le BDNF ni la NT-3 (Carter et al., 1996). Cette activation requière le recrutement de nombreuses protéines adaptatrices telles que TRAF6, p62, IRAK (*Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*), et RIP-2 (*Receptor-Interacting Protein-2*) (Figure 31) (Arévalo and Wu, 2006). P75^{NTR} est impliqué également dans la croissance axonale. En effet, en l'absence de NTs, l'interaction constitutive entre p75^{NTR} et RhoA maintient l'activation de RhoA et l'inhibition de la croissance axonale. Cette inhibition est contrôlée par l'interaction du récepteur p75^{NTR} à d'autres récepteurs comme Nogo-R (*glycolipid-anchored Nogo Receptor*) et la protéine transmembranaire LINGO-1 (*LRR and Ig domain-containing Nogo-receptor interacting protein-1*) (Mi et al., 2004; Wong et al., 2002). En revanche, la liaison des NTs à p75^{NTR}, induit la dissociation de RhoA du récepteur, bloquant l'activité de RhoA et menant à la croissance axonale (Figure 31) (Yamashita et al., 1999).

Comme on vient de le voir, p75^{NTR} lie avec une forte affinité les pro-NTs qui ont été décrites comme ayant des effets pro-apoptotiques (Lee et al., 2001), mais il peut également



lier toutes les NTs. Cependant, les cellules exprimant $p75^{NTR}$ ne répondent pas aux pro-NTs, suggérant l'implication d'un autre acteur pour assurer la signalisation de mort cellulaire. NTSR3/sortiline a été identifié comme étant capable de s'associer à $p75^{NTR}$ pour induire l'apoptose après stimulation par le pro-NGF (Nykjaer et al., 2004), et par le pro-BDNF (Teng et al., 2005) (Figure 32). D'autres études ont également montré l'implication du complexe $p75^{NTR}$ /sortiline dans la mort cellulaire induite par la pro-NT3 (Yano et al., 2009).

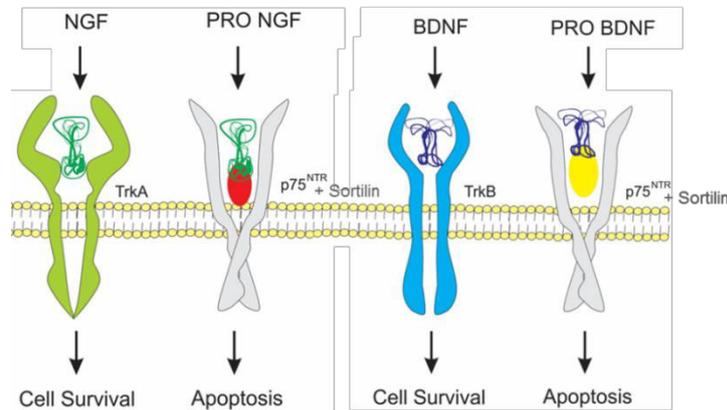


Figure 32 : Implication de NTSR3/sortiline dans le rôle pro-apoptotique du pro-NGF et pro-BDNF (adapté de Budni et al., 2015).

III.2.6. Les interactions entre les différents récepteurs

La signalisation des NTs et des pro-NTs est dépendante à la fois de l'expression des récepteurs Trks, $p75^{NTR}$ et NTSR3/sortiline, mais aussi des différentes interactions possibles entre eux. Ainsi, la liaison des NTs au complexe $p75^{NTR}$ /Trk induit la survie, alors que la liaison des pro-NTs au complexe $p75^{NTR}$ /sortiline favorise une signalisation de mort cellulaire (Nykjaer and Willnow, 2012). Et plus récemment c'est une autre interaction entre la NTSR3/sortiline et TrkA qui a été décrite (Demont et al., 2012) (Figure 33).



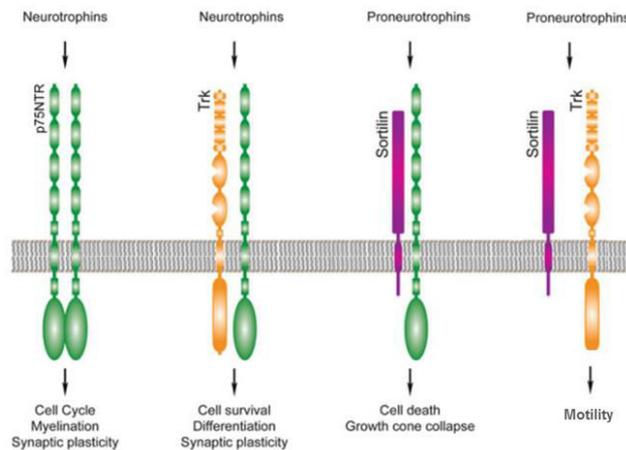


Figure 33 : Les interactions entre les récepteurs Trks, p75^{NTR} et NTSR3/sortiline.

Associé aux Trks, p75^{NTR} permet l'augmentation de l'affinité de chaque NTs pour son récepteur Trk correspondant. P75^{NTR} peut également interagir avec la sortiline suite à une stimulation par les pro-NTs et induire une signalisation de mort. L'interaction de TrkA avec la sortiline suite à la fixation du pro-NGF induit la migration des cellules cancéreuses (adapté de Almeida and Duarte, 2014).

III.2.6.1. L'association de p75^{NTR} aux récepteurs Trks

p75^{NTR} peut interagir directement avec TrkA, TrkB et TrkC au niveau intra- et extracellulaire, et cette interaction peut faciliter la réponse des récepteurs Trks aux NTs (Hantzopoulos et al., 1994). Cette association augmente l'affinité des NTs pour les récepteurs Trks et induit des signalisations de survie, s'opposant à la signalisation apoptotique décrite lors de l'association de p75^{NTR} à la sortiline tel que cela a été décrit dans les neurones (Hempstead et al., 1991). L'interaction p75^{NTR}/TrkA permet d'augmenter l'affinité de TrkA pour le NGF, en revanche elle diminue celle de NT-3. De plus, l'expression de p75^{NTR} induit une apoptose en présence de NGF (Bunone et al., 1997), mais cette signalisation apoptotique est inhibée par la présence du récepteur TrkA (Eggert et al., 2000). De la même façon, le complexe p75^{NTR}/TrkB est activé par le BDNF mais moins par la NT-4/5 et peu par la NT-3 (Dechant, 2001; Yano and Chao, 2000). Plusieurs protéines capables d'interagir avec les récepteurs Trks et p75^{NTR} ont été identifiées et pourraient jouer un rôle dans l'interaction fonctionnelle entre les deux récepteurs. Parmi celles-ci, on retrouve la protéine transmembranaire ARMS (Arévalo et al., 2004; Chang et al., 2004), la cavéoline (Bilderback et al., 1999), et FAIM (*Fas Apoptosis Inhibitor Molecule*) (Sole et al., 2004). Enfin le complexe p62-TRAF6-IRAK est également impliqué dans l'association des deux récepteurs, avec la liaison de TRAF6 à p75^{NTR} et de p62 à TrkA (Wooten et al., 2001).



III.2.6.2. L'association de p75^{NTR} à NTSR3/sortiline

L'association de NTSR3/sortiline au récepteur p75^{NTR} conduit à une signalisation pro-apoptotique activée par le pro-NGF alors que la fixation du NGF mature a ce complexe active la survie cellulaire (Nykjaer et al., 2004). En absence de NTSR3/sortiline, le pro-NGF est incapable d'interagir avec p75^{NTR}. Le NGF mature va pouvoir interagir avec p75^{NTR}/TrkA et conduire à la survie cellulaire (Nykjaer et al., 2004). Au niveau neuronal, la présence du complexe p75^{NTR}/sortiline à la surface cellulaire va donc moduler l'équilibre entre la survie et la mort cellulaire. En outre, dans les cellules de mélanome exprimant des niveaux élevés de NTSR3/sortiline et de p75^{NTR}, le pro-NGF stimule la migration (Truzzi et al., 2008). L'implication de NTSR3/sortiline dans la signalisation pro-apoptotique a été par la suite découverte au niveau des neurones sympathiques. En effet, des travaux ont révélé que le pro-BDNF et le pro-NT3 sont capables d'induire une signalisation de mort cellulaire à travers le complexe p75^{NTR}/sortiline (Teng et al., 2005; Yano et al., 2009). De plus, une étude sur des souris portant une invalidation pour la sortiline (SORT^{-/-}) a montré que ces dernières présentent une diminution de l'apoptose au niveau des neurones, suggérant l'implication du complexe pro-NTs/sortiline/p75^{NTR} dans la régulation de la viabilité neuronale (Jansen et al., 2007). La voie de signalisation intracellulaire de la kinase JNK semble être impliquée dans la mort cellulaire activée par les pro-NTs *via* le complexe p75^{NTR}/sortiline (Nykjaer and Willnow, 2012; Nykjaer et al., 2005). En plus de son implication dans l'affinité entre les pro-NTs et le récepteur p75^{NTR}, NTSR3/sortiline favoriserait le clivage de p75^{NTR} menant à la mort cellulaire (Skeldal et al., 2012). Ainsi en fonction du ligand et du co-récepteur auquel il est associé, p75^{NTR} présente une dualité fonctionnelle activant soit la mort ou la survie cellulaire (Nykjaer and Willnow, 2012; Nykjaer et al., 2005).

III.2.6.3. L'association de NTSR3/sortiline aux récepteurs Trks

Cette association a été mise en évidence par l'interaction TrkA/sortiline dans des cellules cancéreuses du sein (Demont et al., 2012). En effet, dans cette étude le pro-NGF est capable de stimuler l'invasion cellulaire *via* le complexe TrkA/sortiline, indépendamment de p75^{NTR} (Figure 33). Cette signalisation conduit à l'activation des voies PI3K/AKT et Src. D'autres travaux ont montré que le pro-NGF non clivable est capable d'induire une phosphorylation de TrkA et activer la voie des MAPKs dans les cellules PC12 (Armugam et al., 2012; Clewes et al., 2008). L'interaction physique entre la sortiline et les récepteurs Trks a été identifiée par des expériences d'immunofluorescences (Vaegter et al., 2011). Le rôle de la sortiline dans cette signalisation n'est pas très clair, mais il semblerait qu'elle soit impliquée dans le transport des récepteurs Trks à la membrane plasmique. Ces interactions permettraient la fixation des pro-NTs sur les domaines extracellulaires des deux récepteurs,



formant ainsi un complexe ternaire (pro-NGF/Sortiline/TrkA) responsable de la signalisation (Demont et al., 2012; Vaegter et al., 2011).

III.3. Les NTs et leurs récepteurs dans le système immunitaire

En plus de leur rôle largement décrit dans le système nerveux, les NTs sont également impliquées au niveau du système immunitaire (Vega et al., 2003). Les interactions entre les systèmes immunitaire et nerveux ont fait l'objet de plusieurs études, incluant les études d'expression et de sécrétion des NTs par les cellules du système immunitaire, comprenant à la fois les sous-populations cellulaires des organes lymphoïdes primaires et secondaires ainsi que les cellules immunocompétentes (Hillis et al., 2016). Par conséquent, ces tissus et leurs cellules sont des cibles potentielles pour les NTs. En effet, plusieurs travaux ont décrit l'implication des NTs et de leurs récepteurs dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T et B, des monocytes, des neutrophiles, des basophiles, des éosinophiles, et des mastocytes (Bayas et al., 2003; Bürgi et al., 1996; Caroleo et al., 2001; D'Onofrio et al., 2000; Ehrhard et al., 1993; Kobayashi et al., 2002; Kronfeld et al., 2002; Leon et al., 1994; Schenone et al., 1996; Tam et al., 1997). Il est intéressant de noter que, dans toutes les espèces de vertébrés examinées, des êtres humains aux poissons, les NTs et/ou leurs récepteurs ont été retrouvés dans les organes lymphoïdes (Ciriaco et al., 1996; Hannestad et al., 2000). De plus, plusieurs études *in vivo* du phénotype immunitaire des souris dépourvues de NTs ou de leur récepteurs fonctionnels ont permis de mieux comprendre le rôle de ces neuropeptides au niveau des cellules immunitaires (Garcia-Suarez et al., 2002; García-Suárez et al., 2000; Ruberti et al., 2000).

Notre étude a porté sur le BDNF et sur son récepteur TrkB dans les lymphocytes B, par conséquent, nous allons nous intéresser uniquement à l'implication de cet axe dans la survie de ces cellules en conditions physiologiques et dans les hémopathies malignes B.

III.3.1. En conditions physiologiques

Au niveau des lymphocytes B, les NTs et leurs récepteurs sont impliquées dans la prolifération, le développement, la différenciation, la sécrétion d'anticorps et la survie. Bien que la plupart de ces études se rapportent au NGF, l'expression du BDNF a également été détectée dans les cellules B humaines activées (Besser and Wank, 1999), ainsi que dans différentes lignées lymphocytaires B quels que soient leurs stades de maturation (Fauchais et al., 2008). De plus, Il a été démontré que le BDNF est impliqué dans le développement de ces cellules. En effet, les souris K/O BDNF présentent un nombre réduit de cellules B périphériques et un arrêt de la maturation des cellules B au stade pré-B II, sans affecter la différenciation ni le nombre de lymphocytes T (Schuhmann et al., 2005). D'autres travaux ont



démontré que le BDNF provenant de cellules stromales favorise la maturation des cellules pré-B *via* la signalisation de TrkB (Schuhmann et al., 2005). Enfin, en condition de stress sérique, le BDNF protège les cellules B de l'apoptose (D'Onofrio et al., 2000; Fauchais et al., 2008). Concernant les formes précurseurs des NTs (pro-NTs), peu d'études ont décrit leur rôle dans les lymphocytes B, cependant, il a été démontré dans notre équipe que le pro-BDNF est sécrété par des lignées B humaines à différents stades de maturation (Fauchais et al., 2008).

L'expression des récepteurs Trks a été démontrée dans les cellules B humaines (D'Onofrio et al., 2000). En effet, l'expression de TrkB₉₅ a été rapportée dans des lignées cellulaires lymphoblastoïdes B transformées par le virus d'Epstein-Barr (EBV), mais seulement après leur activation (Besser and Wank, 1999). L'expression de la forme totale de TrkB est retrouvée quant à elle dans les cellules B non stimulées et non transformées par l'EBV, mais avec des niveaux d'expression très faibles à la surface cellulaire (Schenone et al., 1996). Il a été démontré que TrkB peut être séquestré au niveau cytoplasmique dans les cellules B en repos, et transloqué à la surface de la cellule après stimulation (Fauchais et al., 2008). Les voies de signalisation intracellulaire activées après la liaison des NTs aux cellules B sont décrites comme étant similaires à celles activées dans d'autres types cellulaires. En effet, il a été suggéré que TrkB₉₅ induit la libération de Ca²⁺ ou la signalisation ERK, comme dans les cellules gliales (Ohira et al., 2006; Rose et al., 2003), ou peut interagir avec des protéines adaptatrices comme par exemple TTIP (*Truncated TrkB Interacting Protein*) (Kryl and Barker, 2000). L'expression de p75^{NTR} a été rapportée dans les lymphocytes B humains au repos et activés (Torcia et al., 1996). Le stress sérique induit l'expression membranaire de p75^{NTR} dans différentes lignées cellulaires B quels que soient leurs stades de maturation (Fauchais et al., 2008). L'expression du co-récepteur de p75^{NTR}, NTSR3/sortiline a été démontrée pour la première fois par notre équipe dans plusieurs lignées lymphocytaires B humaines de différents stades de maturation et dans des cultures primaires de cellules B (Fauchais et al., 2008).

L'ensemble de ces observations indique que les cellules B sont capables de répondre à la fois aux NTs et aux pro-NTs et cela à travers le récepteur p75^{NTR}. La signalisation p75^{NTR} dans les cellules B n'a pas été bien détaillée, cependant, elle est susceptible d'être similaire à celle observée dans les cellules non immunes, c'est-à-dire par un recrutement de partenaires conduisant à une réponse de pro-survie ou pro-apoptotique à travers les voies de signalisation NF-κB ou JNK, respectivement (Allen et al., 2005; Roux and Barker, 2002).



III.3.2. Dans les hémopathies malignes B

- **Leucémies aiguës**

Dans la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), une étude sur deux cohortes différentes de patients a révélé une expression de p75^{NTR} dans 22 et 38% des échantillons analysés (Beutel et al., 2005). Il a également été constaté que p75^{NTR} était préférentiellement exprimé chez tous les patients ayant la translocation *BCR-ABL*. Dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) qui exprime également la mutation *BCR-ABL*, l'expression de p75^{NTR} n'a pas été détectée, suggérant qu'elle est indépendante de la translocation *BCR-ABL* (Beutel et al., 2005). L'expression de NTSR3/sortiline au niveau transcriptionnel et protéique a également été mise en évidence dans la lignée cellulaire de LAL, Nalm-6 (Saada et al., 2012). Sa présence à la membrane cellulaire est très faible, mais augmente de manière significative en condition de privation sérique. L'augmentation de son expression protège les cellules de la mort cellulaire induite par ce stress (Saada et al., 2012). Cela suggère que NTSR3/sortiline, peut être impliqué dans la résistance de la LAL aux chimiothérapies visant à induire l'apoptose. Une autre étude a démontré que les cellules cancéreuses de patients atteints de la leucémie myéloïde aiguë (LMA) exprimaient à 55% les principaux récepteurs aux NTs et leurs ligands respectifs, dont TrkB et le BDNF (Li et al., 2009b). Le modèle de souris leucémiques a démontré que l'activation de TrkB par le BDNF induit la leucémogénèse des cellules hématopoïétiques murines et favorise la survie des cellules cancéreuses (Li et al., 2009b). De plus, la stimulation par le BDNF exogène des lignées murines de leucémie myéloïde réduit l'apoptose induite par la radiothérapie dans ces cellules (Li et al., 2009b).

- **Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL)**

Peu d'études ont montré le rôle des NTs et de leurs récepteurs dans les lymphomes B non hodgkiniens et notamment les DLBCL. Les lignées cellulaires issues de DLBCL expriment et secrètent les formes immatures et matures des NTs dont BDNF, ainsi que les récepteurs TrkB, p75^{NTR} et NTSR3/sortiline, favorisant ainsi la survie cellulaire et la résistance aux traitements (Bellanger et al., 2011; Dubanet et al., 2015; Sniderhan et al., 2009). L'expression des NTs et de leurs récepteurs dans ces lignées est modulée en condition de stress. En effet, il a été démontré que l'expression des récepteurs p75^{NTR} et TrkB est augmentée en privation sérique, conduisant à une activation constitutive de p75^{NTR}. En revanche, dans les mêmes conditions, l'expression de BDNF est diminuée (Bellanger et al., 2011). Le stress cellulaire induit également la translocation du récepteur TrkB₉₅ à la membrane cellulaire suggérant que les cellules de DLBCL répondent au stress en modifiant le rapport NTs/récepteurs. Cela permet aux cellules de mieux survivre et de s'adapter au



microenvironnement tumoral comme les ganglions lymphatiques ou d'augmenter la résistance aux traitements (Bellanger et al., 2011). Enfin, la même étude a montré que l'inhibition pharmacologique des récepteurs Trks, provoquait une forte apoptose et augmentait la sensibilité des cellules à l'effet cytotoxique du rituximab, suggérant un rôle important de la signalisation Trk dans la survie des cellules de DLBCL.

- **Myélome multiple (MM)**

L'axe BDNF/TrkB a été identifié dans plusieurs lignées cellulaires de MM (Pearse et al., 2005). Etant fonctionnelle, la signalisation BDNF/TrkB, induit une augmentation de la phosphorylation d'Akt et des MAPK-Erk1/Erk2. L'étude de la survie cellulaire après traitement à la dexaméthasone a montré une augmentation de l'expression de TrkB et de la mort cellulaire. L'ajout du BDNF protège les cellules de l'apoptose induite par ce traitement (Pearse et al., 2005). Enfin, cette étude a montré qu'en présence ou non de cellules stromales, le BDNF prolonge la survie des cellules primaires de MM. Ces données contribuent à l'hypothèse selon laquelle les NTs ont un rôle de pro-survie, à la fois de manière autocrine et paracrine dans le MM. Chez les patients atteints de MM, l'axe BDNF/TrkB protège les cellules de l'apoptose induite par le bortezomib, notamment par l'activation de la signalisation PI3K (Pearse et al., 2005).

L'expression de NTSR3/sortiline dans les lignées cellulaires de myélome est principalement intracellulaire, et augmente en condition de privation sérique (Saada et al., 2012). L'induction de l'apoptose dans ces lignées a été démontrée par la liaison du pro-BDNF à la sortiline et p75^{NTR}, alors que le BDNF mature réduit la mort cellulaire en activant TrkB (Fauchais et al., 2008). Etant donné que NTSR3/sortiline est impliqué dans la voie de sécrétion, il s'est révélé nécessaire pour la sécrétion du BDNF (Fauchais et al., 2008). Cela identifie un rôle potentiel indirect de ce récepteur dans la signalisation de pro-survie, en favorisant la sécrétion du BDNF mature et en activant la signalisation de l'axe BDNF/TrkB. Dans l'ensemble, cela peut indiquer un double rôle de la sortiline dans la signalisation pro- et anti-apoptotique dans les hémopathies malignes-B.

- **Le lymphome de Burkitt**

La signalisation de survie de l'axe BDNF/TrkB est associée aux lignées cellulaires issues de lymphome de Burkitt. L'inhibition du BDNF par shRNA (*short hairpin RNA*) dans ces cellules induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Cela a été démontré par une régulation négative de Bcl-2, une régulation positive de Bax, une activation des caspases 3 et 9, et le clivage de la PARP (*Poly [ADP-Ribose] Polymerase*) (Xia et al., 2014). L'inhibition du BDNF sensibilise également les cellules au 5-Fluorouracile (un analogue de la pyrimidine) (Xia et al., 2014).





Matériels et méthodes





Chapitre IV. Matériels et méthodes

IV.1. Culture cellulaire

IV.1.1. Les lignées cellulaires

Les lignées BL-41 de phénotype B mature provenant de lymphome de Burkitt EBV négatif, et MEC-1, issue d'un patient atteint de la LLC, ont été obtenues auprès de « DSMZ-German collection of microorganisms and cell cultures ». Les cellules ont été cultivées en flasques de 75 cm³ (Sarstedt) dans un incubateur humide à 37°C et à 5% de CO₂. Le milieu de culture, en condition basale, comporte du RPMI 1640 GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (ID bio), préalablement décomplémenté par chauffage à 56°C, pendant 30 minutes et filtré sur seringue. Il est également rajouté 1% de pénicilline/streptomycine, 1% de pyruvate de sodium, 1% d'acides aminés non essentiels et 1% de vitamines MEM (Thermo Fisher Scientific). Les cellules sont maintenues à une densité optimale de 1 à 2.10⁶/mL et le milieu est remplacé tous les 3 jours.

IV.1.2. Isolement des lymphocytes B (normaux et leucémiques)

Les lymphocytes B humains provenant d'échantillons de sang de donneurs sains ont été inclus dans cette étude, après autorisation du comité d'éthique institutionnel conformément à la déclaration d'Helsinki. Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de ces donneurs sont isolées à partir de 40 mL de sang total par centrifugation en gradient de densité (Ficoll) (Eurobio). Le Ficoll permet de séparer les composants du sang total en différentes phases. Dans un tube 15 mL contenant 5 mL de Ficoll, 7 mL de sang périphérique sont déposés délicatement le long de la paroi du tube en évitant de mélanger les deux phases. Après une centrifugation de 25 minutes à 300 x g le sérum de l'échantillon est prélevé et l'anneau de PBMC est récupéré à l'aide d'une pipette et lavé par centrifugation dans 50 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pendant 10 minutes. Le culot cellulaire est alors repris dans un tampon d'immuno-sélection froid à 4°C (PBS-BSA-0,5% 2mM EDTA (SigmaAldrich)) puis un comptage est effectué sur cellule de Malassez.

Les lymphocytes B circulants sont ensuite isolés par tri magnétique négatif, en utilisant le kit (*B Cell Isolation Kit II, human*) (MACS; Miltenyi Biotec). Après un lavage par centrifugation de 10 minutes à 300 x g dans le tampon d'immuno-sélection à 4°C, les cellules sont resuspendues à une densité de 10⁷ cellules / 40 µL de tampon puis mises en contact avec le cocktail d'anticorps biotinylés (*Biotin-Antibody Cocktail*) (anticorps anti-CD2, -CD14, -CD16, -CD36, -CD43, et CD235a), avec un volume de 10 µL pour 10⁷ cellules. Après 5



minutes d'incubation à 4°C, 30 µL de tampon d'immuno-sélection froid et 20 µL d'anticorps anti-biotine (*Anti-Biotin MicroBeads*) sont rajoutés pour 10^7 cellules. Après 10 minutes d'incubation à 4°C, les cellules sont relavées par centrifugation dans 2 mL de tampon d'immuno-sélection pendant 10 minutes et le culot cellulaire est alors repris dans 500 µL de tampon. L'étape de séparation magnétique s'effectue ensuite à l'aide d'une colonne MS (*Magnetic Separation Column*, Miltenyi Biotec), préalablement rincée avec 500 µL de tampon et placée dans un champ magnétique. Les 500 µL de solution cellulaire sont alors déposées dans la colonne et les cellules non fixées aux billes sont éluées dans un tube de 15 mL et représentent les cellules d'intérêt (cellules B) (Figure 34). Après 3 lavages de 500 µL, la colonne est séparée de son aimant, et les cellules fixées aux billes sont alors récupérées dans un autres tube et correspondent aux cellules non-B.

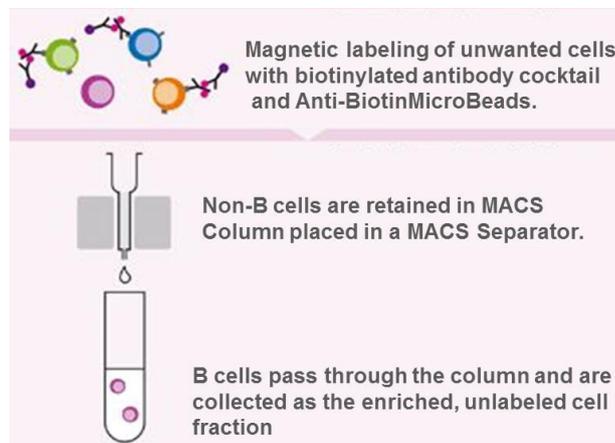


Figure 34 : Sélection négative des cellules B humaines par le kit (B Cell Isolation Kit II, human) (MACS; Miltenyi Biotec).

Les cellules B de patients atteints de LLC proviennent de fonds de tubes prélevés pour des analyses effectuées en routine (numération formule sanguine, cytométrie en flux), obtenus après l'accord du comité d'éthique régional (N° 72-2011-18). Les lymphocytes B ont été isolés à partir de 2-4 mL d'échantillons sanguins en utilisant le kit MACSxpress® *B-CLL Cell Isolation Kit, human* (MACS, Miltenyi Biotec) selon les recommandations du fabricant. Ce kit permet d'isoler les cellules B à partir de sang total fraîchement prélevé sans centrifugation en gradient de densité. Les érythrocytes sont agrégés et sédimentés, tandis que les cellules marquées par les billes MACSxpress contenant le cocktail d'anticorps sont éliminées par tri magnétiques. Les cellules non marquées qui correspondent aux cellules d'intérêt (mêlées avec le surnageant (plasma)) sont collectées après centrifugation du surnageant. En bref, pour 1 volume de sang total, $\frac{1}{4}$ de cocktail d'anticorps monoclonaux conjugués à des billes et $\frac{1}{4}$ de tampon sont rajoutés. Le mélange est ensuite incubé pendant



5 minutes à température ambiante sur un rotateur pour tubes à une vitesse constante d'environ 12 rpm. Les lymphocytes B leucémiques sont ensuite isolés par tri magnétique négatif en plaçant le tube (sans capuchon) contenant le mélange dans un séparateur magnétique pendant 15 minutes. Les cellules marquées adhèrent magnétiquement à la paroi du tube tandis que les érythrocytes agrégés sédimentent vers le bas. Le surnageant contenant les lymphocytes B leucémiques est récupéré délicatement et centrifugé. Le culot cellulaire contenant les lymphocytes B leucémiques est soit remis en culture pour les différentes études, soit congelé à -80 °C jusqu'à utilisation.

La pureté des tris est systématiquement vérifiée par cytométrie à l'aide d'un anti-CD19 humain couplé à la PE-cyanine 7 (Beckman Coulter). Les cellules triées sont conservées pour une pureté $\geq 95\%$.

IV.1.3. Traitements cellulaires

Pour tous les traitements effectués, les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits (Sarstedt) à une densité de 1.10^6 cellules/mL. Elles sont incubées avec $40\mu\text{M}$ de neurotensine (Calbiochem/Merck Millipore) et 100ng/mL de BDNF recombinant (Alomone labs) pendant 24 heures. Les doses utilisées pour ces deux traitements ont été précédemment déterminées par notre équipe. L'antagoniste non peptidique SR142948A (Tocris Biosciences) des récepteurs de type 1 et 2 de la neurotensine a été utilisé à une concentration de 67nM , la toxine pertussique (PTX) (Sigma Aldrich) a été utilisée à 200ng/mL , les inhibiteurs de TrkB, K252a (Alomone Labs) et ANA12 (Tocris Biosciences) ont été utilisés à des concentrations de 100nM et $100\mu\text{M}$ respectivement, tous pendant 24 heures également.

IV.1.4. Transfections

Deux types de transfections ont été réalisés sur les cellules: une pour surexprimer de façon transitoire le récepteur NTSR2 dans les deux lignées cellulaires BL-41 et MEC-1, l'autre pour éteindre l'expression du même récepteur par siRNA (*small interference RNA*) dans les lymphocytes B de patients atteints de la LLC.

IV.1.4.1. Surexpression de NTSR-2 et TrkB par transfection transitoire dans les lignées cellulaires BL-41 et MEC-1

La transfection transitoire des lignées cellulaires BL-41 et MEC-1 a été effectuée à l'aide du Kit *V Amaxa Cell Line Nucleofactor* (Lonza). Pour cela, 5.10^6 cellules ($\approx 10\ \mu\text{g}$ d'ADN) sont mélangées avec $100\ \mu\text{L}$ de nucleofactor contenant l'un des vecteurs de surexpression NTSR-2-pCMV6-XL4 (SC115397, OriGene Technologies) ou TrkB-pCMV6-



XL4 (SC127911, OriGene Technologies) pour la condition de surexpression ou avec 100 μ L de nucleofactor contenant le vecteur vide (PCMV6XL4, OriGene Technologies) pour la condition contrôle. Le programme utilisé pour la transfection de chaque lignée est établi par le fabricant Amaxa™ Nucleofector™ 2b (Lonza). Une électroporation d'environ 2 secondes est effectuée au niveau du mélange avant l'ensemencement des cellules en plaque 6 puits à une densité de 1.10^6 cellules/mL. Les cellules transfectées sont ensuite incubées pendant 24 heures, avant d'être exposées, pendant 24 heures supplémentaires, à différents traitements par du BDNF, de la neurotensine, différents inhibiteurs ou le PBS comme condition contrôle.

IV.1.4.2. Inhibition du récepteur NTSR2 par siRNA

Les lymphocytes B ont été isolés comme décrit précédemment à partir de 2 à 4 mL de sang total fraîchement prélevé de patients atteints de LLC et transfectées transitoirement en utilisant l'interféryne selon les recommandations du fournisseur (Polyplus transfection). Une fois isolées, les cellules sont ensemencées dans une plaque 6 puits à une densité de 2.10^6 cellules/mL dans du milieu complet. Pour chaque condition, 84 ng de siRNA de NTSR2 (ON-TARGETplus Human NTSR2 (23620) siRNA-SMARTpool), ou de si control (ON-TARGETplus Non-targeting pool D-001810-10-20) (Dharmacon) sont rajoutés à 200 μ L de milieu sans sérum auxquels sont additionnés 14 μ L d'agent transfectant, l'interféryne (Polyplus). Après 10 secondes d'agitation (vortex), le mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante pour permettre la formation d'un complexe entre les siRNA et l'interféryne. Le mélange est ensuite déposé sur la suspension cellulaire de 1 mL. Ainsi, le volume final est de 1.2 mL et les concentrations des siRNA sont de 5 nM. La plaque est ensuite incubée entre 4 à 6 heures avant de rajouter 2 mL de milieux complet et une nouvelle incubation. L'incubation est de 48 heures pour les études transcriptionnelles et 72 heures pour les analyses par ECD (*Elisa Cell Death*), cytométrie en flux et western blot. Pour la validation des transfections, les niveaux d'expression de NTSR2 ont été évalués après 48 heures et 72 heures par qRT-PCR et western blot respectivement.

IV.2. Analyse de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée en utilisant la méthode d'exclusion du Bleu Trypan. 1.10^6 cellules ont été transfectées avec le siNTSR2 ou par le siControl et cultivées pendant 72 heures. Les cellules sont ensuite centrifugées et le culot cellulaire est remis en suspension dans 2 mL de milieu. 20 μ L de la suspension cellulaire sont mélangés avec 20 μ L de Trypan Blue à 0,2% (Sigma-Aldrich) et incubés pendant 5 minutes à 37°C sous atmosphère humide et en présence de 5% de CO₂. Les cellules sont comptées à l'aide d'un



microscope inversé (Microscope inversé Carl Zeiss Primo Vert TM), et le pourcentage de cellules viables est estimé par rapport au nombre total de cellules.

IV.3. Etude de l'apoptose

L'apoptose a été étudiée en utilisant deux méthodes. La première consiste à détecter l'apoptose en utilisant un kit de double marquage Annexine-V/IP (Beckman Coulter). L'annexine-V est une protéine présentant une très forte affinité pour la phosphatidylsérine, exposée sur le feuillet externe de la membrane des cellules apoptotiques et nécrotiques. Un marquage à l'Iodure de Propidium (IP) est étudié parallèlement afin de différencier les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques. Cet agent intercalant est imperméant et rend compte ainsi de l'altération membranaire des cellules nécrotiques dont il marque les noyaux en rouge.

En bref, après 72 heures de transfection par siNTSR-2 et siControl, les cellules sont lavées deux fois en PBS puis remises en suspension dans le tampon de liaison (PBS/Ca²⁺ 1X) à une concentration de 1.10⁶ cellules/mL. 100 µL de la suspension cellulaire sont transférées ensuite dans des tubes de cytométrie et incubés 15 minutes sur glace et à l'abri de la lumière avec 1µL d'Annexine-V couplée à la fluorescéine (FITC) et 5µL d'IP. Après ajout de 400 µL de tampon de liaison (PBS/Ca²⁺ 1X), les cellules sont immédiatement analysées par cytométrie en flux (*FACSCalibur flow cytometer*, Becton Dickinson). L'analyse ayant été effectuée avec un minimum de 10 000 cellules.

La seconde méthode d'évaluation de l'apoptose consiste à doser les nucléosomes solubles dans le cytoplasme, par technique ELISA (*Cell Death Detection ELISA PLUS kit*) (Roche), générés au cours de ce processus de mort cellulaire. Les cellules ont été transfectées en condition basale (10% SVF) par le vecteur d'expression NTSR-2 ou par le vecteur vide, et ensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 5.10⁴ cellules/puits pendant 24 heures, suivie de 24 heures de traitement par le BDNF (100 ng/mL), la neurotensine (40 µM) et le PBS comme contrôle. L'étude de l'apoptose par cette méthode concerne également les cellules transfectées par le siNTSR-2 et le siControl. En effet, ces cellules ont été cultivées dans des plaques 96 puits pendant 72 heures en présence ou non de BDNF exogène (100 ng/mL).

Après les différents temps de traitements, les plaques contenant les cellules sont centrifugées à 200 g pendant 10 minutes. Le surnageant de culture est alors enlevé et remplacé par 200 µL de tampon de lyse. Après 30 minutes de lyse, les plaques sont à nouveau centrifugées. 20 µL de surnageant de chaque condition est ajouté à des puits



sensibilisés à la streptavidine et contenant un anticorps anti-histone couplé à la biotine ainsi qu'un anticorps anti-DNA couplé à la peroxydase. Un contrôle positif de réaction, ainsi qu'un contrôle négatif sont systématiquement réalisés. L'ensemble des composants est incubé 2 heures à température ambiante sous agitation douce. Après trois lavages, l'ABTS (ou *2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid*) (substrat de l'enzyme) est incubé 10 à 15 minutes dans l'obscurité à température ambiante jusqu'à l'apparition de la réaction colorimétrique. La quantité d'ABTS oxydé correspondant à la quantité d'ADN fragmenté est immédiatement mesurée grâce à un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 405 nm (Thermo Fisher Scientific). Les résultats sont évalués en index apoptotique. Cet index est déterminé pour chacune des conditions par rapport à l'état basal qui est arbitrairement fixé à 1.

IV.4. Analyse de l'expression protéique par Western Blot

Les protéines ont été obtenues à partir des lysats cellulaires des lignées B, des cellules B normales (provenant de donneurs sains) et des cellules B de patients atteints de LLC. Pour l'extraction des protéines, les culots cellulaires ont été préalablement lavés 2 fois au PBS froid et repris sur glace dans un tampon de lyse RIPA (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1mM PMSF, additionné d'un comprimé d'inhibiteur de phosphatase (Roche) pour 10mL de RIPA). Après 15 minutes d'incubation sur glace, les cellules sont lysées par sonication pendant 1 minute à une amplitude de 40 Hz toutes les 2 secondes. Puis, les extraits sont centrifugés à 14 000 g, pendant 20 minutes à 4°C afin de culotter les débris cellulaires. Les surnageants protéiques sont prélevés et dosés par la méthode de Bradford, en référence à une gamme étalon de BSA (1, 5, 10 et 20 µg/mL). Les échantillons protéiques sont dilués au 200^{ème} et mélangés volume/volume avec le réactif de Bradford (Sigma-Aldrich). La concentration protéique de chaque échantillon est déterminée par mesure de la densité optique, à 595 nm grâce à un spectrophotomètre (Thermo Scientific). 30µg de protéines sont mélangés à un volume identique de tampon de charge 2X (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad), puis dénaturés pendant 5 minutes à 95°C avant d'être séparés sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE (*4-15% Criterion TGX Stain-Free Precast Gel*, Bio-Rad).

La migration des protéines s'effectue, pendant 1 heure à 140V (Système mini protean de Bio-Rad) dans le tampon de migration (10X TGS, Bio-Rad), additionné d'eau distillée. Après la migration, les protéines sont transférées avec un appareil de transfert (TansBlot turbo, Transfer system, Bio-Rad), sur une membrane PVDF (PolyVinylidene Fluoride) (Calbiochem/Merck Millipore) préalablement activée dans du méthanol. Le transfert s'effectue à voltage constant (25 V) pendant 30 minutes selon un montage utilisant des



papiers Whatman imbibés dans le tampon de transfert (10X TG, Bio-Rad), additionné de méthanol et d'eau distillée. Après le transfert, la membrane est immergée quelques secondes dans du rouge ponceau (Sigma-Aldrich) (0,5 g de rouge, 25 mL d'acide acétique, qsp 500 mL d'eau distillée) pour vérifier la qualité du transfert. La membrane est ensuite lavée en tampon TBS-1X Tween-20 0,1% (Sigma-Aldrich), puis incubée pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de saturation (TBS 1X-Tween-20 0,1% (Sigma-Aldrich) contenant 5% de lait écrémé ou 5% de BSA (*Bovine Serum Albumine*) (ID bio) sous agitation afin de saturer les sites aspécifiques. Après élimination de la solution de saturation, la membrane est incubée une nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire (Tableau 7) dilué dans la solution de saturation.

Après trois lavages dans du tampon TBS-1X Tween-20 0,1%, les membranes sont incubées pendant 2 heures à température ambiante avec l'anticorps secondaire adapté couplé à la *Horse Radish Peroxydase* (HRP). Les anticorps secondaires utilisés sont dilués au 1/1000^{ème} dans la solution de saturation (Tableau 8). Les membranes sont ensuite lavées 2 fois avec du TBS-1X Tween-20 0,1%, puis 1 fois avec du TBS-1X seul. Les révélations sont réalisées avec le kit ECL (Millipore, ImmobilonTM) après incubation de la membrane pendant une minute avec le mélange du kit dans les proportions 1:1 (*HRP Substrate Luminol Reagent + HRP Substrate Peroxide Solution*), afin de révéler la réaction antigène-anticorps. Cette dernière est détectée grâce à un analyseur d'image (G-Box, Ozyme). Les Western Blots sont scannés à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (Genesnap, Genetool, Syngene). Les quantifications des expressions protéiques ont été réalisées à l'aide du logiciel IMAGEJ (NIH, Bethesda), en comparant l'intensité d'expression de la protéine d'intérêt à l'intensité de la protéine de ménage.



Tableau 7 : Liste des anticorps primaires utilisés en Western Blot.

Anticorps primaire	Fournisseur	Référence	Dilution	Hôte
Anti-NTSR-1	Alomone Labs	ANT-015	1 : 200	Lapin
Anti-NTSR-2	Alomone Labs	ANT-016	1 : 200	Lapin
Anti-Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology	sc-783	1 : 500	Lapin
Anti-Bcl-xL	Cell Signaling Technology	#2764S	1 : 1000	Lapin
Anti-Phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology	#4060S	1 : 2000	Lapin
Anti Akt-pan	Cell Signaling Technology	#2920S	1 : 2000	Souris
Anti-Phospho-Src (Tyr416)	Cell Signaling Technology	#6943S	1 : 1000	Lapin
Anti-Src	Cell Signaling Technology	#2108S	1 : 1000	Lapin
Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling Technology	#9211S	1 : 1000	Lapin
Anti-p38 MAPK	Cell Signaling Technology	#8690S	1 : 1000	Lapin
anti-Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling Technology	#4668S	1 : 1000	Lapin
Anti-SAPK/JNK	Cell Signaling Technology	#9252	1 : 1000	Lapin
Anti-Trk-B	R&D Systems	MAB3971	1 : 100	Souris
Anti-Trk-B	Biorbyt	orb214339	1 : 200	Lapin
Anti-Phospho-TrkB (Tyr816)	Merck Millipore	ABN1381	1 : 500	Lapin
anti-Giα1/2	Merck Millipore	06-236	1 : 500	Souris
Anti-β-Actine	Sigma-Aldrich	A5441	1 : 10000	Souris

Tableau 8 : Liste des anticorps secondaires utilisés en Western Blot.

Anticorps secondaire	Fournisseur	Référence	Dilution	Hôte
Anti-IgG de souris HRP	Dako/Agilent Technologies	P0447	1 : 1000	Chèvre
Anti-IgG de lapin HRP	Dako/Agilent Technologies	P0448	1 : 1000	Chèvre

IV.5. Immunoprecipitation (IP)

Les culots cellulaires sont lavés au PBS froid puis repris dans 500µL de tampon IP (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 2 mM EDTA) (Sigma-Aldrich), additionné de 1% d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche). Après centrifugation à 18 000 g, le surnageant est récupéré et incubé pendant 1 heure à 4°C avec 10% (v/v) de la protéine A-Sepharose® (issue de la bactérie *Staphylococcus aureus*) (Sigma-Aldrich). Les échantillons sont ensuite centrifugés à 18 000 g pendant 5 minutes et le surnageant est transféré dans des nouveaux tubes. Pour l'immunoprécipitation, les anticorps (Tableau 9) sont rajoutés aux lysats protéiques additionnés de 50µL de la protéine A couplée à des billes de sépharose (Sigma-Aldrich). L'autre partie des lysats protéiques est mélangée avec les contrôles isotypiques IgG de souris ou de lapin (Tableau 9). Les mélanges sont ensuite incubés une nuit sous agitation douce à 4 °C. Le lendemain, après centrifugation à 18 000 g pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé et la protéine A-Sepharose est



culottée. Après 3 lavages, le culot est repris dans 30 μ L de tampon Laemmli contenant 50 mM de DTT (*DichloroDiphenylTrichloro-ethane*) (Sigma-Aldrich). Après une dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, les billes sont éliminées par centrifugation et les échantillons sont analysés par western blot comme mentionné précédemment.

Tableau 9 : Liste des anticorps primaires Contrôles isotypiques utilisés en immunoprécipitation.

Anticorps primaire	Fournisseur	Référence	Dilution	Hôte
Anti-NTSR-2	Alomone Labs	ANT-016	1 : 100	Lapin
Anti-Trk-B	R&D Systems	MAB3971	1 : 100	Souris
anti-Phosphotyrosine antibody, clone 4G10®	Calbiochem/Merck Millipore	05-321	1 : 100	Souris
Contrôle isotypique (Ig de souris)	Santa Cruz Biotechnology	sc-2025	1 : 100	Souris
Contrôle isotypique (Ig de lapin)	Santa Cruz Biotechnology	sc-2027	1 : 200	Lapin

IV.6. Etude de la signalisation cellulaire par phosphoprotéome

Pour analyser les différentes voies de signalisation activées par la surexpression de NTSR2 dans les deux lignées cellulaires BL-41 et MEC-1, un phosphoprotéome (*Human phospho-MAPK Array proteome Profiler™*) (R&D Systems, Réf : ARY002B) a été utilisé.

Pour cette étude, 1.10^6 cellules/mL ont été transfectées par le vecteur d'expression NTSR2 ou par le vecteur vide (EV) et incubées dans des plaques 24 puits pendant 24 heures. Ensuite, les cellules sont centrifugées et les culots cellulaires sont repris dans le tampon de lyse fourni avec le kit. Les lysats protéiques sont ensuite dosés par la méthode de Bradford comme décrit précédemment. 300 μ g de protéines totales sont analysées par phosphoprotéome selon les recommandations du fournisseur. Les membranes sont ensuite scannées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (Genesnap, Genetool, Syngene). La phosphorylation des différentes protéines est quantifiée à l'aide du logiciel IMAGEJ (NIH, Bethesda), en comparant l'intensité d'expression de la protéine d'intérêt dans les cellules surexprimant NTSR2, à l'intensité de la même protéine dans les cellules transfectées par le vecteur vide.

IV.7. Extraction d'ARNs totaux, reverse transcription et PCR quantitative

L'extraction des ARNs totaux est effectuée avec le kit RNeasy (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Un traitement à la DNase 1 (Qiagen) est systématiquement réalisé afin de limiter les contaminations par l'ADN génomique. Les ARNs extraits sont repris dans 20 à 30 μ L d'eau *RNAse free* (Qiagen) puis quantifiés par technique spectrométrique à 260 nm (ND-1000 *Spectrophotometer Nanodrop Technologies*). Les



rapports d'absorbance 260/280 et 260/230 (les protéines absorbent à 280 nm et les polysaccharides à 230 nm) ont été déterminés, afin de vérifier la pureté des ARNs extraits. Lorsque ces rapports approchent une valeur de 2, les solutions sont considérées comme pures. L'intégrité des ARNs a été vérifiée par l'utilisation d'une puce RNA 6000 Labchip kit (Agilent Technologies).

Les ARNs sont ensuite rétro transcrits en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant le kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystem), où 2 µg d'ARN sont dilués dans de l'eau *RNAse free* (volume final de 10 µl) auxquels sont rajoutés 10 µl du mélange. Il contient 2,5 U d'enzyme (*MultiScribe™ Reverse Transcriptase*), dans son tampon (*RT Buffer*), un mélange d'hexamères aléatoires (*Random Primers*) et 4 mM de nucléotides (mélange de dNTP) dilués dans de l'eau *RNAse free*. Le mélange réactionnel (20 µl) est placé dans un Thermocycler (VWR). Les hexamères aléatoires sont d'abord hybridés par une incubation de 10 minutes à 25°C, ceci évite un éventuel décrochage des oligonucléotides de l'ADN matrice au cours de l'étape suivante. Ensuite, une incubation de 2 heures à 37°C est réalisée pour permettre la fixation des oligonucléotides, ainsi que la synthèse de l'ADN. Enfin, la réaction est terminée par une incubation de 5 minutes à 85°C afin d'inactiver la reverse transcriptase.

Les ADNc résultants de la RT-PCR, sont ensuite dilués afin de pouvoir en prélever au minimum 4 µl. La réaction de qPCR est réalisée en plaque de 96 puits, et chaque puits contient 100 ng d'ADNc et 1X du mix de la réaction. Le mix utilisé correspond au master mix Taqman rapide (*TaqMan Fast-Univ Master Mix 2X*, Applied Biosystems) contenant la Taq polymérase (*AmpliTaq® Fast DNA Polymerase*), des dNTP avec des dUTP ainsi qu'un tampon de réaction. 400 nM des amorces sens et anti-sens (Tableau 10) ainsi que 200 nM des sondes Taqman (Tableau 10) sont rajoutés au mix. Dans notre travail, toutes les sondes Taqman utilisées sont couplées en 5' avec le *6-CarboxyFluorescein* ou 6-FAM (*Reporter*) et en 3' par le *Minor Groove Binder-Non Fluorescent Quencher* ou MGB-NFQ (*Quencher*). Le gène de référence utilisé est le HPRT1 (Applied Biosystems).

La réaction de qPCR est réalisée à l'aide du StepOne™ System (Applied Biosystems). Le programme d'amplification effectué commence par une première dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, cette étape sert également à activer la Taq polymérase (enzyme dite « Hot Strat »). Elle est suivie de 40 cycles comprenant chacun une dénaturation à 95°C de 3 secondes, suivie d'une hybridation des amorces et sondes à 60°C pendant 30 secondes. Au fur et à mesure des cycles de la qPCR, les sondes sont dégradées ce qui est à l'origine d'émission de fluorescence. Un seuil de fluorescence est établi par le



StepOne. Quand celui-ci est dépassé, un nombre de cycles PCR appelé "Ct" pour "*Cycle Threshold*" ou cycle seuil est déterminé. Cela permet de calculer le ΔCt de chaque échantillon : $\Delta Ct = Ct$ (gène d'intérêt) – Ct (gène de référence), puis le $\Delta\Delta Ct$: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (condition contrôle) – ΔCt (condition traitée), enfin le RQ ou Relative Quantity de chaque échantillon : $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tableau 10 : Séquences d'amorces Sens et anti-sens ainsi que les sondes utilisées pour amplifier les gènes d'intérêt.

Nom		Séquences	Taille (pb)	Référence GenBank
BDNF	Sens	GGCTATGTGGAGTTGGCATT	123	NM_170735.5
	Anti-sens	CAAACGAAGGCCTCTGAAG		
	Sonde	ATTTCTGAGTGGCCATCCCAAGGTCTAG		
Neurotensin	Sens	TGACCAATATGCATACATCAAAGA	105	NM_006183.4
	Anti-sens	TAATTTGAACAGCCAGCTG		
	Sonde	CATGTTCCCTCTTGGAAGATGACTCTGCTA		
NTSR1	Sens	CGCCTCATGTTCTGCTACAT	113	NM_002531.2
	Anti-sens	TACGTCAGCTCCACCATCAA		
	Sonde	AGCAGTGGACTCCGTTCCCTCTATGACTTCT		
NTSR2	Sens	ATCCAGGTGAATGTGCTGGT	114	NM_012344.3
	Anti-sens	CCAAGTGCCGTCCTTCTA		
	Sonde	ACTAACTGCTTTCTGAATGGGGTCACAGT		
TrkB-FL	Sens	CTGGTGAAAATCGGGGACT	137	NM_006180.4
	Anti-sens	AGGAAATTCACGACGGAAAG		
	Sonde	TGTACAGCACTGACTACTACAGGGTCCGGTG		
BCL2	Applied Biosystems™ TaqMan™ Gene Expression Assay/Catalogue number 4331182		81	NM_000633.2
HPRT	HPRT1 Control mix, Applied Biosystems™, TaqMan™, VIC® Référence : 4326321E			NM_000194.1

IV.8. Immunofluorescence indirecte (IFI)

Après deux lavages en PBS, 1.10^6 cellules sont fixées en PBS/Paraformaldéhyde 4% (Sigma Aldrich) pendant 15 minutes sous agitation douce à température ambiante. Après lavages, les cellules sont perméabilisées avec une solution de PBS-BSA 1%-Saponine 0.1% (Sigma Aldrich) pendant 30 minutes sous agitation. Après deux lavages en PBS, une saturation des sites non spécifiques est réalisée en incubant les cellules pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation, dans une solution de saturation PBS/BSA 2%. Puis, les cellules sont incubées avec les anticorps primaires et les isotypes respectifs dilués dans la solution de saturation pendant une nuit à 4°C sous agitation (Tableau 11). Après deux lavages au PBS, les cellules sont incubées 1h30 à température ambiante et à l'abri de la lumière en PBS/BSA 2% avec les anticorps secondaires (Tableau 11) couplés à



l'AlexaFluor-488 ou -594 spécifiques des isotypes respectifs des anticorps primaires. Après 2 autres lavages en PBS, les cellules sont montées entre lame et lamelle e utilisant un milieu de montage contenant du DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) pour colorer les noyaux (Sigma-Aldrich). Après une nuit à 4°C, les lames sont observées en microscopie confocale (Carl Zeiss, LSM 880) et les analyses de co-localisation ont été obtenues en utilisant la fonction Z-stack.

Tableau 11 : Liste des anticorps primaires, secondaires et les contrôles isotopiques utilisés en immunofluorescence et en cytométrie en flux.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution	Hôte
Anti-NTSR-2	Alomone Labs	ANT-016	1 : 200	Lapin
Anti-Trk-B	R&D Systems	MAB3971	1 : 100	Souris
Alexa Fluor-488	Invitrogen™	A11008	1 : 1000	Chèvre
Alexa Fluor-594	Invitrogen™	A11005	1 : 1000	Chèvre
Controle isotypique (Ig de souris)	Santa Cruz Biotechnology	sc-2025	1 : 100	Souris
Controle isotypique (Ig de lapin)	Santa Cruz Biotechnology	sc-2027	1 : 200	Lapin

IV.9. Cytométrie en flux

L'expression de NTSR-2 et TrkB a été étudiée dans les cellules B de patients atteints de LLC et mise en évidence par la technique de cytométrie en flux. $2 \cdot 10^6$ cellules/mL sont lavées au PBS par centrifugation et fixées ensuite par une solution PBS/Paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes sous agitation douce à température ambiante. Après lavage par centrifugation pendant 5 minutes en PBS-BSA 1%, les cellules sont perméabilisées en PBS-TritonX-100 0.3% pendant 30 minutes à température ambiante. Après deux lavages en PBS-BSA 1%, et une incubation de 30 minutes en PBS-BSA 5% à température ambiante, les cellules sont incubées une nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires dilués dans la solution PBS-BSA 1%. Après lavage, les cellules sont incubées 1 heure à 4°C sous agitation douce à température ambiante avec les anticorps secondaires. Les cellules sont ensuite lavées puis remises en suspension dans 500µL de PBS avant analyse par cytométrie en flux (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson). L'analyse ayant été effectuée sur un minimum de 10000 cellules. Les différents anticorps primaires, secondaires et contrôles isotopiques utilisés en cytométrie de flux sont récapitulés dans le tableau 11.



IV.10. Dosage du BDNF et de la neurotensine dans le plasma par la méthode ELISA

Les concentrations plasmatiques de BDNF et de neurotensine des donneurs sains et des patients atteints de LLC ont été déterminées par ELISA. Le protocole a été suivi selon les instructions des fabricants (BDNF Emax® *ELISA ImmunoAssay System*, Promega, Réf : G7610) pour le BDNF et (*Human Neurotensin*, NT ELISA Kit, CUSABIO Life science, Réf : CSB-E09144h) pour la neurotensine. Chaque échantillon a été testé en triplicate et exprimé en pg/mL.

IV.11. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été analysés à partir des données obtenues lors d'au moins 3 tests indépendants, à l'aide du logiciel Statview 5.0 software (Abacus Concepts) et en utilisant les tests ANOVA et Fisher. Tous les résultats sont exprimés en valeur moyenne \pm écart moyen (s.e.m.), une valeur de $p \leq 0,05$ étant considérée comme statistiquement significative (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).





Résultats





Implication du complexe NTSR2-TrkB dans la résistance à l'apoptose des lymphocytes B de patients atteints de la leucémie lymphoïde chronique (LLC)

V.1. Préambule

Les résultats précédents de notre équipe ont montré une expression différentielle des NTSRs dans les lymphocytes malins résistants à l'apoptose, ainsi qu'une augmentation transcriptionnelle du récepteur NTSR2 chez les patients atteints de la LLC (Saada et al., 2012). Ces résultats nous ont conduits à émettre l'hypothèse d'une implication de ce récepteur dans la résistance à l'apoptose des cellules leucémiques et à caractériser sa fonction dans ces cellules.

L'analyse transcriptionnelle de NTSR1 et NTSR2 dans les lymphocytes B normaux et les lymphocytes B issus de patients atteints de la LLC, a révélé une absence des transcrits de NTSR1 et une forte expression des transcrits de NTSR2 dans les cellules leucémiques comparé aux lymphocytes B normaux. Le profil d'expression des ARNm de NTSR2, était similaire chez les patients ayant des formes indolentes ou progressives de la maladie, et semble être indépendant des marqueurs connus de la pathologie, tels que la délétion du gène *P53*, la mutation *IGHV*, la délétion 13q14 et l'expression de CD38. Cela indique que l'expression de NTSR2 ne représente pas un marqueur discriminant de la LLC et dans notre série, est indépendant des autres marqueurs identifiés. En revanche, l'augmentation de l'expression transcriptionnelle et protéique de NTSR2 nous a amené à émettre l'hypothèse que ce récepteur dit de faible affinité de la NTS pourrait être impliqué dans la pathogenèse de la LLC.

Étant donné que les lymphocytes leucémiques sont constitutivement résistants à l'apoptose, caractéristique majeure de cette maladie (Schriever and Huhn, 2003), nous avons cherché à déterminer si la régulation négative du récepteur NTSR2 par siRNA sensibiliserait ces cellules à la mort cellulaire programmée. De façon intéressante, l'inhibition de NTSR2 par siRNA dans ces cellules induit une diminution drastique de la viabilité cellulaire accompagnée d'un taux élevé d'apoptose spontanée, reflétant une implication de ce récepteur dans des voies de survie lymphocytaire. Sachant que ces dernières sont souvent dérégulées dans la LLC, nous nous sommes intéressés à l'étude de la voie de survie Src et à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules leucémiques dont



l'expression de NTSR2 était inhibée. Bien que Bcl-2 soit fortement exprimé dans les cellules leucémiques, caractéristique connue de la LLC (Calin et al., 2005; Cimmino et al., 2005), son expression diminue significativement après inhibition de NTSR2. De même, la phosphorylation constitutive de la protéine kinase Src est diminuée, ce qui suggère que le récepteur NTSR2 est essentiel à l'activation de Src et à l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2.

Des modèles de surexpression de NTSR2 *in vitro* ont été utilisés afin de déterminer les conséquences de cette surexpression. Ceci a été effectué en utilisant deux lignées lymphocytaires B humaines, une provenant d'un lymphome EBV-négatif (BL-41), et une autre issue d'une LLC (MEC-1). Ces modèles de transfection nous ont permis de compléter cette étude sur les voies de signalisations. De façon intéressante, et comparé aux cellules contrôles, la surexpression de NTSR2 dans ces deux lignées en conditions basales et de privation sérique induit une augmentation de la phosphorylation de plusieurs protéines engagées dans des voies de survie comme Src, JNK, p38 et Akt. De même, le niveau d'apoptose dans ces cellules est diminué suite à une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2. Ces résultats suggèrent que la surexpression de NTSR2 agit comme un oncogène *via* la stimulation de Src et des MAPKs, ainsi que par l'augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques, favorisant ainsi la survie cellulaire et la résistance à l'apoptose des cellules leucémiques.

Notre hypothèse était que la stimulation de NTSR2 pouvait dépendre de l'activation des boucles autocrines et/ou paracrines après la libération de la NTS, comme nous l'avons précédemment montré pour le récepteur NTSR1 dans les lymphocytes B normaux (Saada et al., 2012).

Afin de comprendre le rôle de la NTS dans la modulation de l'apoptose, et de voir si elle agit sur la stimulation de NTSR2 par l'activation de boucles autocrines/paracrines, nous avons étudié ses conséquences fonctionnelles dans les lymphocytes B de patients atteints de la LLC. L'ajout de la NTS à ces cellules induit une activation soutenue de NTSR2 et un signal d'activation en aval incluant la phosphorylation de Src, l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL et une diminution significative de la mort cellulaire. L'absence de l'expression de NTSR1 dans ces cellules (ainsi que de NTSR3/sortiline) suggère que ce rôle protecteur pourrait être assuré par NTSR2, qui serait activé indépendamment de son ligand non détecté au niveau transcriptionnel dans les cellules leucémiques, et faiblement présent dans le plasma des patients atteints de la LLC, par comparaison à des sujets sains.



Ce résultat exclut ainsi la possibilité d'une boucle autocrine et/ou paracrine de survie induite par l'interaction NTS-NTSR2 à la surface des cellules leucémiques.

Parallèlement, dans les lignées cellulaires BL-41 et MEC-1, la NTS n'est pas modifiée après surexpression de NTSR2, malgré l'activation soutenue de NTSR2. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'activation de NTSR2 doit être soutenue par un mécanisme alternatif qui n'implique pas son ligand, la NTS. Ainsi, l'activation de NTSR2 serait induite par la liaison à un autre récepteur, comme cela a été précédemment observé pour NTSR1 (Dupouy et al., 2014; Younes et al., 2014) et NTSR3/sortiline (Wilson et al., 2014a, 2014b).

Pour explorer cette possibilité, et en se basant sur nos précédentes études (Wilson et al., 2014b; Fauchais et al., 2008) et celles de la littérature (Thiele et al., 2009; Pearse et al., 2005), nous avons supposé que le récepteur à domaine tyrosine kinase, TrkB, pourrait servir de corécepteur pour NTSR2. L'analyse transcriptionnelle a révélé des niveaux d'expression élevés d'ARNm de *NTRK2* (gène codant pour TrkB) dans les lymphocytes leucémiques comparés aux lymphocytes B normaux. Cette expression a également été confirmée au niveau protéique. Les études d'interaction entre les deux récepteurs ont montré que NTSR2 et TrkB sont colocalisés et interagissent physiquement à la surface des cellules leucémiques. De plus, ces études ont révélé que la stimulation du complexe NTSR2-TrkB par le BDNF, le ligand de TrkB, favorise cette interaction en activant TrkB. Ces interactions ont également été observées dans les modèles *in vitro* BL-41 et MEC-1 surexprimant NTSR2, mais pas dans les lymphocytes B normaux, ce qui suggère que l'interaction NTSR2-TrkB joue un rôle essentiel dans l'homéostasie des cellules leucémiques.

La stimulation de l'interaction du complexe NTSR2-TrkB par le BDNF nous a conduits à rechercher son expression à la fois dans les lymphocytes B leucémiques, mais aussi au niveau du plasma des patients atteints de la LLC par rapport aux donneurs sains. Contrairement à la NTS, la concentration plasmatique du BDNF ainsi que l'expression de ses transcrits étaient plus élevés dans les cellules leucémiques. De plus, le BDNF mature (mBDNF) et sa forme précurseur (pro-BDNF) ont été détectés dans les surnageants des lymphocytes B leucémiques, mais pas dans le surnageant des cellules B normales, suggérant une possible boucle autocrine et/ou paracrine de survie. Comme pour le NTS, l'addition de BDNF aux lymphocytes leucémiques favorise l'activation de NTSR2 et sa cascade en aval, dont la phosphorylation de Src et l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. L'inhibition de TrkB dans ce complexe conduit à une diminution de l'expression de Src et des protéines anti-apoptotiques ce qui suggère que TrkB et NTSR2 contribuent ensemble dans la voie de signalisation pro-survie. De plus, la stimulation des



cellules B leucémiques par le BDNF diminue la mort cellulaire, ce qui suggère son rôle protecteur dans le complexe NTSR2-TrkB-BDNF.

Pour exclure la possibilité que l'interaction BDNF-TrkB stimule une boucle de survie autocrine indépendamment de NTSR2, des cellules leucémiques invalidées pour NTSR2 ont été stimulées par le BDNF. Le résultat obtenu montre que le BDNF ne protège plus les cellules de l'apoptose induite par le siNTSR2, ce qui suggère que TrkB est un acteur potentiel de survie des cellules leucémiques uniquement lorsque NTSR2 est surexprimé. Nos résultats ont montré également que NTSR2 et TrkB sont co-exprimés à des niveaux similaires par les cellules leucémiques. De façon surprenante, la surexpression de *NTRK2* induit l'augmentation transcriptionnelle de NTSR2 dans les cellules des lignées BL-41 et MEC-1. Ces résultats indiquent une régulation fine et interdépendante de l'expression de NTSR2 et de TrkB. La surexpression concomitante de ces 2 récepteurs chez les patients leucémiques s'intègre dans un mécanisme moléculaire de régulation fine et interdépendante dont les mécanismes restent à définir mais dont la conséquence est la signalisation de survie lymphocytaire B qui conduit à l'activation constitutive de NTSR2.

Afin de préciser les mécanismes associés à l'activation constitutive de NTSR2, notamment *via* le recrutement de protéines G, impliquées dans l'activation des RCPGs (Kehrl, 1998), nous avons identifié, de façon intéressante, que la stimulation par le BDNF des cellules MEC-1 surexprimant NTSR2 et traitées à la toxine pertussique (PTX) (qui interagit avec les sous-unités de protéines G_{α} de la famille G_i) (Kehrl, 1998) ne maintient plus la phosphorylation de Src dans ces cellules. Le recrutement des protéines $G_{i\alpha}$ dans ces cellules a été mis en évidence par l'immunoprécipitation conjointe de NTSR2 et des protéines $G_{i\alpha}$. La dépendance de cette activation avec celle de TrkB a été détectée au moyen d'un inhibiteur de TrkB qui diminue la phosphorylation des Src dans les cellules MEC-1 surexprimant NTSR2. Ceci suggère que l'activation de Src lors de la stimulation par le BDNF dépend du recrutement de protéines G et de l'activation de TrkB.

Nous avons ensuite étudié la capacité de NTSR2 à recruter des protéines G_i lors de la stimulation avec le BDNF dans les cellules leucémiques. Les résultats montrent que $G_{i\alpha1/2}$ est recruté de façon plus efficace en présence de BDNF que de NTS, reflétant probablement un tropisme plus fort pour le BDNF, plus fortement exprimé que la NTS qui est absente dans ces cellules. Ces résultats suggèrent que NTSR2 subit des modifications pour maintenir ses voies de signalisation et recruter des sous-unités de protéines G. Cela nous a conduits à étudier la phosphorylation du récepteur observée précédemment chez la souris (Martin et al., 2002) et chez l'homme (Raijmakers et al., 2010). La phosphorylation de NTSR2 est détectée



dans les cellules MEC-1 surexprimant NTSR2 ainsi que dans les lymphocytes leucémiques, et augmente en présence du BDNF. Cet effet est supprimé en présence de l'inhibiteur des NTSRs, SR142948A. Ce résultat est en accord avec l'augmentation de l'apoptose observée dans ces cellules en présence du SR142948A, suggérant que la phosphorylation de NTSR2 est cruciale pour la survie des cellules leucémiques.

Nos résultats montrent pour la première fois l'implication du récepteur NTSR2 dans la résistance à l'apoptose des lymphocytes B leucémiques. L'activation de NTSR2, fortement exprimé et constitutivement actif dans ces cellules, est indépendante de son ligand naturel, la NTS. Cette activation est plutôt la conséquence de son interaction avec le récepteur tyrosine kinase TrkB et le recrutement de protéines $G_{i\alpha}$. Ainsi, ce complexe agit comme un oncogène conditionnel dépendant du ligand endogène de TrkB, le BDNF, qui est fortement exprimé dans les cellules leucémiques comparé à la NTS. Le complexe NTSR2-TrkB active les voies de signalisation de survie, comme Src et Akt, ainsi que l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. L'effet protecteur de l'axe BDNF/TrkB est supprimé lorsque NTSR2 est inhibé, induisant ainsi une diminution drastique de la viabilité par apoptose. Nos résultats démontrent que l'interaction NTSR2-TrkB et l'activation soutenue des voies de signalisation sous le contrôle de ces deux acteurs joue un rôle déterminant dans la survie des cellules leucémiques, ce qui suggère que l'inhibition du récepteur NTSR2 représente une stratégie ciblée prometteuse pour le traitement de la LLC.

L'ensemble de ces résultats est illustré dans **l'article** et argumenté plus loin.





Article publié dans le journal **Oncogene**

**Neurotensin receptor type 2 protects B-cell chronic
lymphocytic leukemia cells from apoptosis**

A Abbaci^{*}, H Talbot^{*}, S Saada, N Gachard, J Abraham, A Jaccard, D Bordessoule,
AL Fauchais, T Naves, and MO Jauberteau





ORIGINAL ARTICLE

Neurotensin receptor type 2 protects B-cell chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis

A Abbaci^{1,7}, H Talbot^{1,7}, S Saada¹, N Gachard^{2,3}, J Abraham⁴, A Jaccard^{3,4}, D Bordessoule^{3,4}, AL Fauchais^{1,5,8}, T Naves^{1,8} and MO Jauberteau^{1,6,8}

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells are resistant to apoptosis, and consequently accumulate to the detriment of normal B cells and patient immunity. Because current therapies fail to eradicate these apoptosis-resistant cells, it is essential to identify alternative survival pathways as novel targets for anticancer therapies. Overexpression of cell-surface G protein-coupled receptors drives cell transformation, and thus plays a critical role in malignancies. In this study, we identified neurotensin receptor 2 (NTSR2) as an essential driver of apoptosis resistance in B-CLL. NTSR2 was highly expressed in B-CLL cells, whereas expression of its natural ligand, neurotensin (NTS), was minimal in both B-CLL cells and patient plasma. Surprisingly, NTSR2 remained in a constitutively active phosphorylated state, caused not by a mutation-induced gain-of-function but rather by an interaction with the oncogenic tyrosine kinase receptor TrkB. Functional and biochemical characterization revealed that the NTSR2–TrkB interaction acts as a conditional oncogenic driver requiring the TrkB ligand brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which unlike NTS is highly expressed in B-CLL cells. Together, NTSR2, TrkB and BDNF induce autocrine and/or paracrine survival pathways that are independent of mutation status and indolent or progressive disease course. The NTSR2–TrkB interaction activates survival signaling pathways, including the Src and AKT kinase pathways, as well as expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL. When NTSR2 was downregulated, TrkB failed to protect B-CLL cells from a drastic decrease in viability via typical apoptotic cell death, reflected by DNA fragmentation and Annexin V presentation. Together, our findings demonstrate that the NTSR2–TrkB interaction plays a crucial role in B-CLL cell survival, suggesting that inhibition of NTSR2 represents a promising targeted strategy for treating B-CLL malignancy.

Oncogene advance online publication, 23 October 2017; doi:10.1038/onc.2017.365

INTRODUCTION

Resistance to cell death is often associated with replicative immortality and chemotherapy evasion, two central hallmarks of cancer. This feature is particularly prominent in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL),¹ in which it leads to the accumulation of malignant mature B lymphocytes.² Several factors have been implicated in CLL development, including mutations in the immunoglobulin heavy-chain variable region gene (*IGHV*) and genomic alterations (deletion, translocation, trisomy and non-synonymous mutations) used as prognostic markers for indolent or aggressive disease course.³ Despite these molecular and genetic findings, however, no curative molecules that can definitively eradicate apoptosis-resistant B-CLL are yet available. Hence, identification of as-yet-unknown mechanisms involved in B-CLL cell survival pathways could provide new targets for anticancer therapies.

Cell-surface receptors, especially G protein-coupled receptors (GPCRs), have emerged as crucial players in malignancies. Several studies show that GPCRs participate actively in signal transduction involved in control of homeostatic processes, including the balance between cell death and proliferation.⁴ In lymphocytes,

GPCRs coupled to heterotrimeric G proteins, notably G_is, regulate multiple immune functions and engage in cross-talk with other signaling pathways, including those mediated by tyrosine kinase receptors (TKRs)^{5,6} such as the Src family of protein kinases (SRC) and the phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B (for example, PI3K/AKT).⁷ Thus, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), for example, ERK and JNK and the expression of anti-apoptotic proteins belonging to the Bcl-2 family (for example, Bcl-2, Bcl-xL) remain constitutively activated.⁸ These observations suggest that malignant cells can hijack the physiological function of GPCRs for their survival.⁹ Accordingly, GPCR activation might be associated with B-CLL pathogenesis.

To more precisely delineate the potential function of GPCRs in apoptosis evasion by B-CLL cells, we investigated the role of the neurotensin receptors (NTSRs). Two of these proteins, NTSR1 and NTSR2, are GPCRs, whereas NTSR3/sortilin, which has a single transmembrane domain, plays a major role as a sorting receptor.¹⁰ NTSR1 drives homeostatic processes in the nervous and gastrointestinal systems, but is also actively involved in overexpression of anti-apoptotic proteins and chemotherapy resistance in cancer.^{11,12}

¹Limoges University, Equipe Accueil 3842, Cellular Homeostasis and Diseases, Faculty of Medicine, Limoges Cedex, France; ²Hematology Laboratory, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex, France; ³CNRS-UMR 7276, Limoges University, Limoges Cedex, France; ⁴Department of Hematology, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex, France; ⁵Department of Internal Medicine, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex, France and ⁶Department of Immunology, Dupuytren Hospital University Center of Limoges, Limoges Cedex, France. Correspondence: Professor M-O Jauberteau, EA3842, Laboratoire Homéostasie Cellulaire et Pathologies, Faculté de Médecine, 2, Rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France.

E-mail: m-o.jauberteau-marchan@unilim.fr

⁷These authors contributed equally to this work.

⁸These authors contributed equally to this work.

Received 5 May 2017; revised 29 July 2017; accepted 25 August 2017



Because NTSR1 is often dysregulated in solid cancers¹³ and previous work by our group showed that NTSRs are differentially expressed in normal and malignant B lymphocytes,¹⁴ we were interested in studying the potential roles of this GPCR subfamily in B-CLL. In this study, we found that NTSR2, but not NTSR1, was aberrantly overexpressed in B-CLL. Both in NTSR2-overexpressing B-cell models and in cells derived from B-CLL patients, inhibition of NTSR2 by mRNA silencing sensitized cells to apoptosis, pursuant to a decrease in expression of anti-apoptotic proteins. We found that NTSR2 in B-CLL cells is in a constitutively active phosphorylated state, which was reversible by a NTSR2-specific inhibitor. NTSR2 activation is independent of its natural ligand, neurotensin (NTS), and is instead the consequence of its interaction with the TKR tropomyosin-related kinase receptor B (TrkB) and the recruitment of G_q proteins. Thus, this complex acts as a conditional oncogene dependent on the TrkB ligand, BDNF, which is highly expressed in B-CLL. We present novel data demonstrating that the NTSR2–TrkB interaction and the sustained activation of the signaling pathways under the control of these two actors constitute an essential driving force for apoptosis evasion in B-CLL.

RESULTS

NTSR2 is overexpressed in B-CLL

Based on our previous observation that NTSRs are differentially expressed in malignant human B lymphocytes and drive resistance to Fas ligand-mediated cell death, we speculated that NTSRs contribute to apoptosis resistance in B-CLL pathogenesis. We first compared expression of *NTSR* genes in B lymphocytes between healthy donors (HDs) (Normal B, $n=15$) and B-CLL patients (B-CLL, $n=30$ patients). *NTSR1* was undetectable in B-CLL cells, whereas *NTSR2* was strongly expressed, at levels 30-fold higher ($P < 0.001$) than in normal B lymphocytes (Figure 1a). The profile of *NTSR2* expression, which was similar between indolent and progressive B-CLL, was independent of B-CLL markers such as *TP53* deletion, *IGHV* mutation, 13q14 deletion and CD38 expression, indicating that *NTSR2* does not represent a discriminant marker for B-CLL stage (Figure 1b). Analysis of NTSR expression at the protein level confirmed the mRNA results: NTSR2 was overexpressed in B-CLL, whereas NTSR1 was undetectable (Figures 1c and d).

The abnormal expression of NTSR2, independent of B-CLL stage and progression, led us to investigate the roles of the primary mechanisms responsible for GPCR overexpression, that is, gene mutations and chromosomal abnormalities.⁹ To this end, we sequenced *NTSR2* and analyzed the karyotypes of 10 B-CLL patients. None of the B-CLL cases harbored mutations in the *NTSR2* gene, except for two patients with a silent polymorphism (*rs114415067*, *pH55H*) (data not shown). Moreover, *NTSR2* mutations are present in only 0.3% of the 19 141 samples in COSMIC v62, indicating that *NTSR2* mutations are rare in all combined pathologies.¹⁵

Together, the significant increase in *NTSR2* mRNA and protein levels suggested that NTSR2 plays a role in the pathogenesis of B-CLL, regardless of the biological and clinical features of this disease.

NTSR2 depletion sensitizes B-CLL lymphocytes to apoptosis

Given that B-CLL lymphocytes exhibit apoptosis resistance, a hallmark of this disease, we sought to determine whether *NTSR2* downregulation would sensitize B-CLL cells to programmed cell death. To this end, we performed mRNA silencing assays with a pool of four different siRNAs directed against *NTSR2* mRNA (Figures 2a–f).

In the four patients tested, *NTSR2* silencing triggered a drastic decrease in cell viability, from 86 to 24%, after 72 h (Figure 2c,

$P < 0.001$). To extend these observations, we investigated the pro-apoptotic effect of NTSR2 silencing after 48 h using flow cytometry to detect Annexin V/PI (propidium iodide) staining (Figures 2d and e). *NTSR2* depletion significantly increased the percentage of Annexin V-positive cells, reflecting induction of apoptosis ($n=4$, $P < 0.01$, Figures 2d and e). However, we observed no alternative cell death (Annexin V^{negative}/PI^{positive}) (Figure 2d). Further evidence for apoptosis was obtained by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect DNA fragmentation.¹⁶ Consistent with the results of flow cytometry, *NTSR2* depletion triggered DNA fragmentation, as demonstrated by elevated levels of cytoplasmic nucleosomes ($P < 0.01$, Figure 2f) in comparison to control and isolated normal B cells (Supplementary Figures 1a–c).

In B-CLL pathogenesis, both survival signaling and anti-apoptotic proteins are often dysregulated (Supplementary Figures 1d–f). Accordingly, we investigated the expression of the Src pro-survival signaling pathways and the anti-apoptotic protein Bcl-2 following *NTSR2* depletion. Although Bcl-2 was highly expressed in B-CLL cells (Supplementary Figure 1f), its levels decreased significantly upon *NTSR2* depletion (Figures 2g and i). Likewise, the pro-survival kinase Src exhibited a decrease in constitutive phosphorylation (Figures 2g and h), suggesting that *NTSR2* makes a major contribution to Src kinase activation and expression of anti-apoptotic proteins.

In the following experiments, we used two human B-lymphocyte cell lines, one from lymphoma (BL-41) and one from B-CLL (MEC-1). Although endogenous expression of NTSR2 was higher in BL-41 and MEC-1 than in normal B cells, it was lower than in B-CLL (Supplementary Figure 1g). Hence, to achieve comparable expression levels between models, we overexpressed NTSR2 in both BL-41 and MEC-1 cells (Supplementary Figure 2a). Because the NTSR2 signaling pathway is connected to three major MAPK pathways, that is, ERK1/2, p38 and JNK, as well as the PI3K/AKT survival pathway, we used arrays to monitor the presence of phosphorylated MAPKs following *NTSR2* overexpression (Supplementary Figure 2b). Strikingly, *NTSR2* overexpression resulted in a 2–3-fold induction (that is, increase in phosphorylation) of several proteins engaged in survival pathways, including Src, JNK, p38 and Akt (Figures 3a and b). In addition, we observed a decrease in the amount of cytoplasmic nucleosomes, reflecting the level of apoptosis (Figure 3c), following an increase in the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-xL and Bcl-2 (Figures 3d and e). Similar results were obtained when cells were deprived of serum for 24 h, ruling out the possibility that NTSR2 is activated by ligands present in calf serum (Figures 3f–i). Together, these results indicate that *NTSR2* overexpression acts as an oncogene via stimulation of the Src and MAP kinases, as well as by upregulating expression of anti-apoptotic proteins, thereby promoting cell survival and apoptosis resistance, respectively. These results reveal a specific effect of NTSR2 on pro-survival signaling in B-CLL cells.

NTSR2 stimulation is independent of its natural ligand, NTS

We hypothesized that NTSR2 stimulation depended on activation of autocrine and/or paracrine loops following release of NTS, as we showed previously for NTSR1 in normal B lymphocytes.¹⁴ To investigate the role of NTS in modulating apoptosis, we monitored its effect on expression in B lymphocytes derived from B-CLL patients. As observed for NTSR1, the addition of NTS to B-CLL lymphocytes promoted sustained activation of NTSR2 and its downstream cascade, including phosphorylation of Src kinase (Figures 4a and b) and expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL (Figures 4a and c). Following this stimulation, the apoptotic ratio of B-CLL cells decreased significantly (Figure 4d). Because NTSR1 was not expressed in B-CLL, these observations suggest that NTSR2 plays a protective role in these cells.



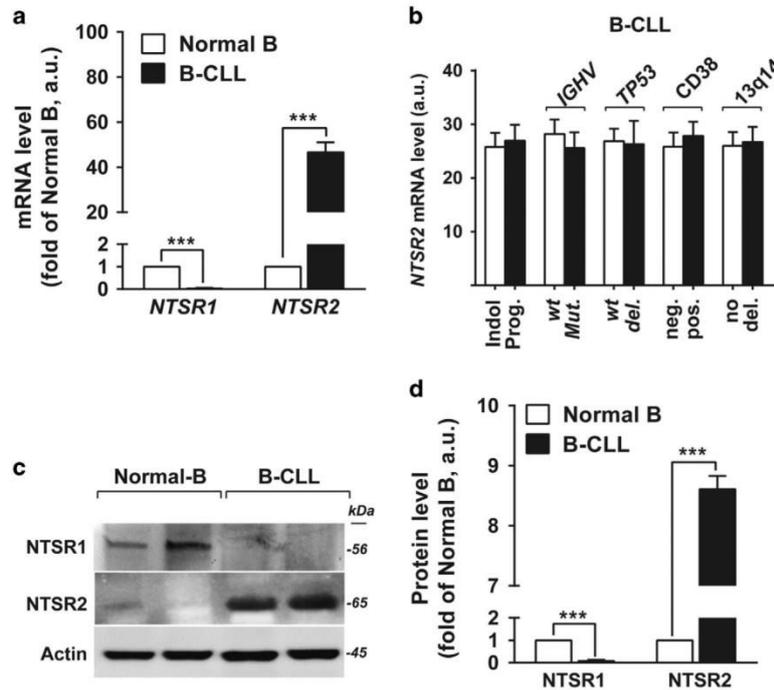


Figure 1. NTSR2, but not NTSR1, is overexpressed in B-CLL. (a) Quantitative analyses of *NTSR1* and *NTSR2* mRNA levels in normal B ($n=15$) and B-CLL ($n=30$) lymphocytes, normalized against *HPRT*. Data are expressed as mean fold change in expression (\pm s.e.m.) vs normal B cells. (b) Quantitative analyses of *NTSR2* mRNA level in indolent (Indol.) vs progressive (prog.) patients, wild-type (*wt*) vs mutant (*Mut.*) *IGHV*, wild-type (*wt*) vs mutant (deleted, *del.*) *p53*, CD38 negative (*neg.*) vs positive (*pos.*), and absence (*no*) vs presence of 13q14 deletion (*del.*); values are given in arbitrary units (a.u.). (c) Representative analysis of *NTSR2* expression from B-lymphocyte lysates from two normal donors (D1, D2) and two B-CLL patients (P1, P2). (d) *NTSR2* expression, normalized against actin, in normal B ($n=6$) and B-CLL ($n=6$) lymphocytes (means \pm s.e.m. of three independent experiments). Significant *P*-values are indicated in the graphs $***P < 0.001$.

To determine whether the autocrine/paracrine interaction of the NTS–NTSR2 complex takes place in B-CLL patients, we performed ELISA to measure the concentration of circulating NTS in plasma from B-CLL patients and HDs. Surprisingly, the concentration of NTS was higher in HD than in B-CLL plasma (80.03 pg/ml vs 48.62 pg/ml, $P < 0.01$, Figure 4e). *NTS* mRNA was not detectable (ND) in B-CLL cells, in contrast to normal B cells (Figure 4f), excluding the possibility of autocrine and/or paracrine survival loops triggered by NTS–NTSR2 on the surface of B-CLL cells. Likewise, in both BL-41 and MEC-1 cell lines, overexpression of *NTSR2* for 24 h did not trigger *NTS* expression (Figure 4g), despite sustained *NTSR2* activation irrespective of growth factor abundance (Figure 3f).

Taken together, these results suggested that *NTSR2* activation must be sustained by an alternative mechanism that does not involve the canonical ligand NTS. We hypothesized (Figure 4h) that, as observed for *NTSR1*^{12,17} and *NTSR3/Sortilin*,^{18,19} *NTSR2* can recruit a TKR as an alternative second messenger, thereby inducing its own activation.

NTSR2 interacts with the oncoreceptor TrkB

We previously demonstrated interactions between *NTSR3* and epidermal growth factor receptor (EGFR) and TrkB.¹⁸ Interestingly, *NTSR1* also interacts with EGFR, although, as mentioned above, neither *NTSR1* nor EGFR is detectably expressed in B-CLL cells.²⁰ Based on our previous findings showing that TrkB and its ligand BDNF are involved in fine-tuning endogenous B-cell survival,²¹ as well as in several malignancies²² including myeloma,^{23,24} we speculated that TrkB might serve as a co-receptor for *NTSR2*.

To explore this possibility, we first compared the levels of *NTRK2* mRNA (encoding TrkB) in B lymphocytes between HDs ($n=15$) and B-CLL patients ($n=30$). *NTRK2* was expressed at 30-fold higher levels ($P < 0.001$) in B-CLL cells than in normal B lymphocytes (Figure 5a). Analysis of TrkB expression at the protein level confirmed the mRNA results (Figures 5b and c), consistent with the notion that TrkB could act as a co-receptor of *NTSR2*.

Confocal analyses revealed that *NTSR2* and TrkB colocalized on the B-CLL cell surface (Figure 5d, insets 1-1 and 1-2). Interestingly, this colocalization was more prominent following activation of TrkB by its ligand BDNF (Figure 5d, insets 2-1 and 2-2). These observations were also supported by colocalization analysis based on Mander's overlap coefficient (Figure 5e). Immunoprecipitation (IP) demonstrated that *NTSR2* interacted physically with TrkB in B-CLL cells, and this interaction was promoted upon BDNF stimulation, as demonstrated by the presence of phosphorylated TrkB (p-TrkB) in the *NTSR2*–TrkB immunocomplex (Figure 5f). These interactions were also observed in BL-41 and MEC-1 models (Supplementary Figure 3a) but were absent from normal B lymphocytes (data not shown), suggesting that the *NTSR2*–TrkB interaction plays a critical role in B-CLL cell homeostasis.

Because BDNF stimulation promoted formation of the *NTSR2*–TrkB complex in leukemia cells, we analyzed both BDNF expression in B-CLL and circulating BDNF in plasma derived from B-CLL patients or HDs. In contrast to NTS, the concentration of BDNF was higher in B-CLL than in HD plasma (155.2 pg/ml vs 54.58 pg/ml, $P < 0.01$, Figure 6a). Likewise, *BDNF* transcript levels were significantly higher in B-CLL than in normal B cells (Figure 6b). Consistent with this, both mature BDNF (mBDNF) and its precursor form (pro-BDNF) were detected in the supernatants of isolated B-CLL lymphocytes, but not normal B cells



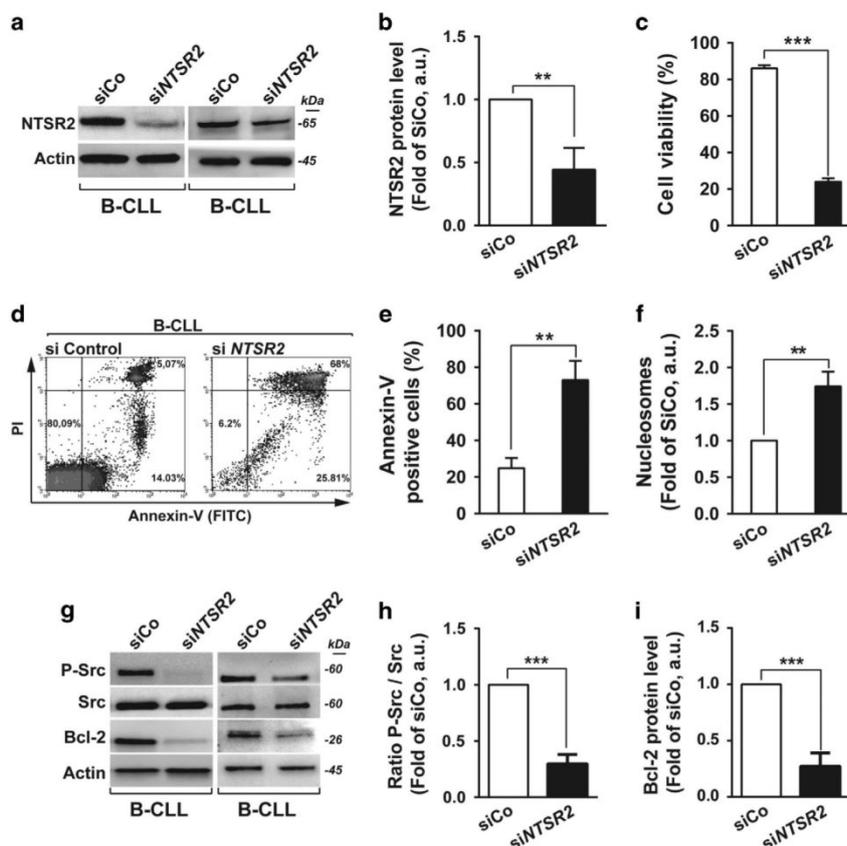


Figure 2. NTSR2 silencing decreases B-CLL viability and induces apoptosis. (a) Representative western blot of B-CLL lymphocytes transfected with either a non-relevant siRNA (siRNA control, siCo) or a pool of four different siRNAs directed against NTSR2 (siNTSR2). (b) NTSR2 protein level, expressed as fold change vs control (siCo), normalized against actin, in three different B-CLL patients. (c) B-CLL cell viability ($n=4$), expressed as a percentage, 72 h after NTSR2 depletion (siCo vs siNTSR2). (d) Representative fluorescence-activated cell sorting analysis of apoptosis induction, assessed by Annexin V-fluorescein Isothiocyanate/PI dual staining of B-CLL cells ($n=4$) depleted or not for NTSR2. (e) Percentage of apoptotic cells (Annexin V-positive cells) after NTSR2 silencing in B-CLL vs siCo. (f) Apoptotic ratio in B-CLL cells ($n=5$) 72 h after NTSR2 depletion, assessed by cell death ELISA, expressed as fold change vs control (siCo). (g) Representative western blot analysis of p-Src and Bcl-2 expression from B-CLL cell lysates, depleted of NTSR2 or not for 72 h. (h, i) Histogram bars represent the fold change in phosphorylation level of Src or Bcl-2 expression in siNTSR2 cells, normalized against actin, in comparison with siCo. Significant P -values are indicated in the graphs $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

(Figure 6c), suggesting activation of autocrine and/or paracrine survival loops. As with NTS, the addition of BDNF to B-CLL lymphocytes promoted sustained activation of NTSR2 and its downstream cascade, including phosphorylation of Src kinase and expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL (Figures 6d–f). Likewise, upon TrkB inhibition, NTSR2 failed to maintain both Src Kinases phosphorylation and anti-apoptotic proteins expression thereby suggesting that TrkB and NTSR2 contribute together in the pro-survival signaling pathway (Supplementary Figures 4a–c).

In addition, *in vitro* experiments performed on B-CLL cells following BDNF stimulation revealed a reduced apoptotic ratio in B-CLL, suggesting a protective role for the NTSR2–TrkB–BDNF complex (Figure 6g). To rule out the possibility that the BDNF–TrkB interaction stimulates an autocrine survival loop independently of NTSR2, we performed NTSR2 silencing prior to BDNF stimulation. BDNF failed to protect B-CLL cells from apoptosis triggered by NTSR2 inactivation, suggesting that TrkB is a potential driver for B-CLL survival only when NTSR2 is overexpressed (Figure 6h).

In both MEC-1 and BL-41 cells, NTSR2 overexpression triggered NTRK2 expression (Supplementary Figure 3b). Likewise, in cells

overexpressing NTRK2, we observed an increase in the level of NTSR2 transcripts (Supplementary Figure 3c). These observations are supported by the flow cytometry results demonstrating that NTSR2 and TrkB are co-expressed with at similar levels by B-CLL cells (Figure 5g). Together, these findings indicate that expression of NTSR2 in leukemic patients results from NTRK2 overexpression, and vice versa, providing a molecular mechanism that could explain NTSR2 overexpression in B-CLL.

Overall, these observations suggested that the NTSR2–TrkB complex is at the center of a regulatory network in B-CLL and acts as a conditional oncogene in the presence of BDNF.

NTSR2 is constitutively phosphorylated both in B-CLL cells and model cell lines

Next, we sought to characterize the activation of NTSR2 through the recruitment of G α proteins, which have been implicated in the activities of several GPCRs such as those observed in immune cell activation.⁵ To this end, we studied the effect of pertussis toxin (PTX), which interferes with the interaction of G α protein subunits of the G $_i$ family (isoforms G α 1, G α 2 and G α 3).⁵ Interestingly, upon



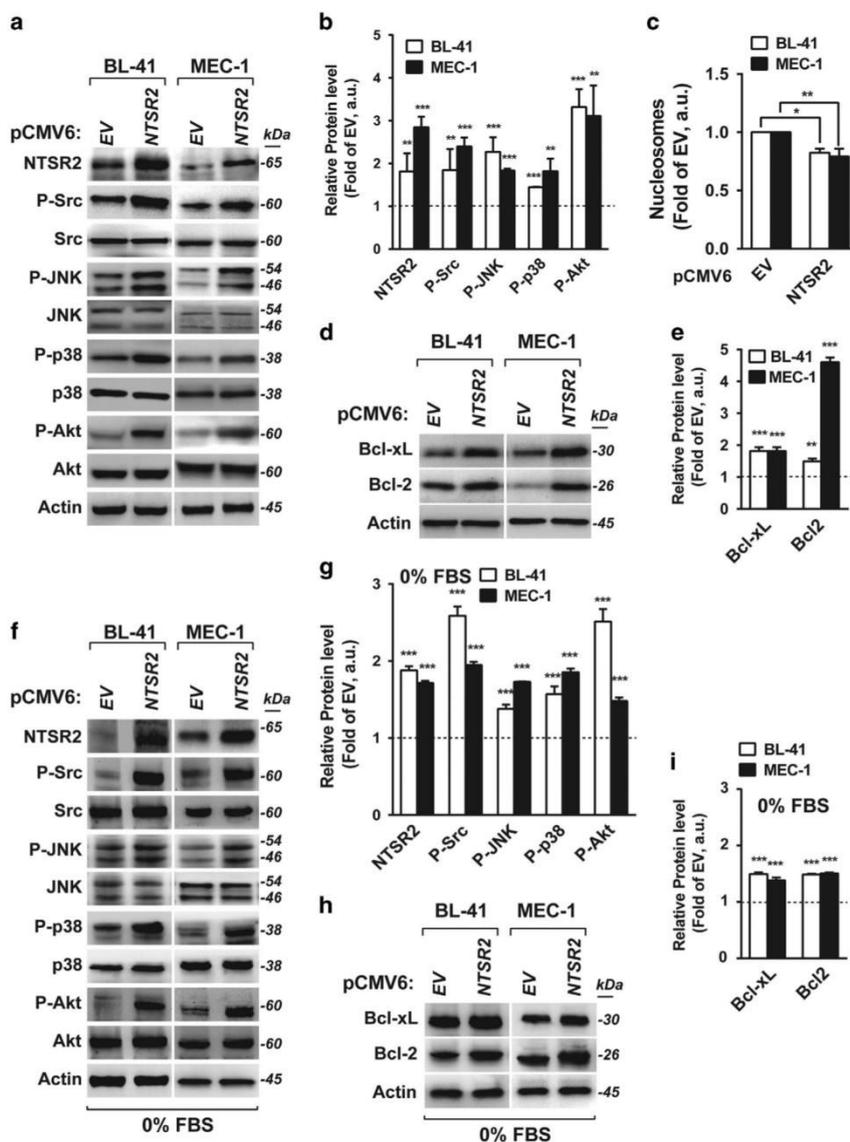


Figure 3. NTSR2 overexpression induces cell survival signaling pathways. (a,b) Western blot analysis of NTSR2, Src, *SAPK/JNK*, p38MAPK, and Akt expression from lysates of BL-41 and MEC-1 cells overexpressing NTSR2 (pCMV6-NTSR2) or empty vector (EV) cultured for 24 h post-transfection in basal conditions (10% fetal bovine serum). (c) Apoptotic ratio following NTSR2 overexpression for 24 h, assessed by cell death ELISA, expressed as fold change vs empty vector (EV). (d, e) Representative western blot analysis of Bcl-xL and Bcl-2 expression in BL-41 and MEC-1 cells overexpressing NTSR2 for 24 h. (h, i) Fold change in Bcl-xL or Bcl-2 expression in BL-41 and MEC-1 cells overexpressing NTSR2 for 24 h, normalized against actin, in comparison with EV. (f-i) Similar analyses performed in cells deprived of serum for 24 h. Significant *P*-values are indicated in the graphs **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

PTX treatment, BDNF stimulation failed to maintain Src phosphorylation in NTSR2-overexpressing MEC-1 cells (Figures 7a and b). Likewise, Src phosphorylation was reduced in the presence of K252a, a TrkB inhibitor (Figures 7a and b), suggesting that activation of Src upon BDNF stimulation depends on G-protein recruitment and TrkB activation. Accordingly, we next investigated the ability of NTSR2 to recruit G α proteins upon stimulation with BDNF, in comparison with its natural ligand NTS. Indeed, IP performed on MEC-1 cells overexpressing NTSR2 indicated that G α 1/2 proteins interacted physically with NTSR2, and that this interaction was strengthened upon BDNF stimulation, as also

observed upon NTS treatment (Figure 7c), suggesting that BDNF can trigger recruitment of G α 1/2. In addition, we detected a physical interaction between G α 1/2 and NTSR2 in isolated B-CLL lymphocytes (Figure 7d). In the B-CLL, G α 1/2 was recruited more efficiently after stimulation with BDNF than with NTS, probably reflecting a stronger tropism for BDNF, which is more highly expressed than NTS in B-CLL cells (Figure 4f). Likewise, in the absence of stimulation, the first patient exhibited strong recruitment of G α 1/2, suggesting a potential difference in the concentration of mBDNF produced and released by B-CLL cells, as observed previously (Figure 6c). Together, these results suggest



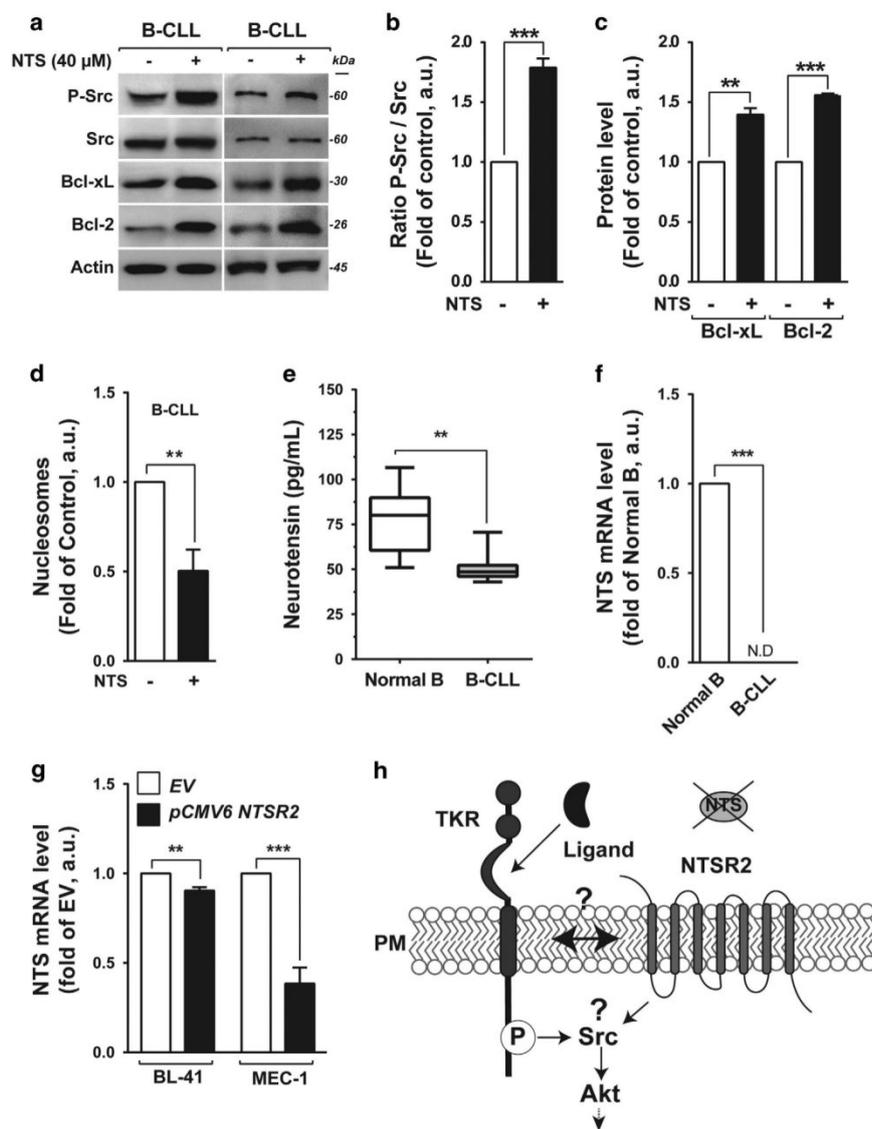


Figure 4. Exogenous neurotensin (NTS) maintains cell survival pathways in B-CLL. **(a)** Representative western blot of p-Src, Bcl-xL and Bcl-2 expression in B-CLL cells after addition of neurotensin (40 μ M) for 24 h. **(b,c)** Expression levels of P-Src **(b)**, Bcl-xL and Bcl-2 **(c)** represented as, respectively, the ratio of phosphorylated Src vs pan-Src protein and the ratios of Bcl-xL and Bcl-2 to actin. Values are means \pm s.e.m. of B-CLL, expressed in a.u. ($n=3$). **(d)** Apoptotic ratio in B-CLL in the presence or absence of 40 μ M NTS for 24 h, assessed by cell death ELISA. Values are proportions of apoptotic cells (\pm s.e.m.) in three independent experiments from different patients ($n=3$). **(e)** Neurotensin concentration, quantified by ELISA, from B-CLL patient plasma ($n=22$, gray boxes), in comparison with healthy donor plasma ($n=8$, white boxes). **(f)** Quantitative analysis of *NTS* mRNA level in normal B cells ($n=15$) and B-CLL ($n=30$). Data are expressed as mean fold change in expression (\pm s.e.m.) in comparison with normal B cells. ND: not detectable. **(g)** Quantitative analysis of *NTS* mRNA level in BL-41 or MEC-1 transfected with either *NTSR2* expression vector (pCMV6 *NTSR2*) or empty vector (EV). Data are expressed as mean fold change (\pm s.e.m.) vs empty vector. **(h)** Schematic representation of hypothetical *NTSR2* activation dependent on recruitment of a tyrosine kinase receptor (TKR). Significant *P*-values are indicated in the graphs ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

that *NTSR2* undergoes modifications to sustain its signaling pathways and recruit G-protein subunits.

Given that phosphorylation of *NTSR2* was previously observed in mouse²⁵ and in human,²⁶ we investigated whether *NTSR2* is phosphorylated in *NTSR2*-OE cell lines and human B-CLL lymphocytes. We detected *NTSR2* phosphorylation in MEC-1 cells overexpressing *NTSR2*, as well as in B-CLL lymphocytes, and the phosphorylation levels increased upon BDNF stimulation (Figure 7e). In the presence of SR142948A, a competitive inhibitor

of *NTSR* ligand binding, *NTSR2* phosphorylation was suppressed, supporting the binding of BDNF (Figure 7f). This result agreed with the increase of apoptosis observed in B-CLL exposed to SR142948A (Figure 7g), suggesting that *NTSR2* phosphorylation is crucial for B-CLL cell survival.

Taken together, our findings show that *NTSR2* overexpression induces *Gia* recruitment and *NTSR2* phosphorylation in B-CLL lymphocytes. The colocalization of *NTSR2* with TrkB, which is promoted by the presence of BDNF, indicates that a GPCR



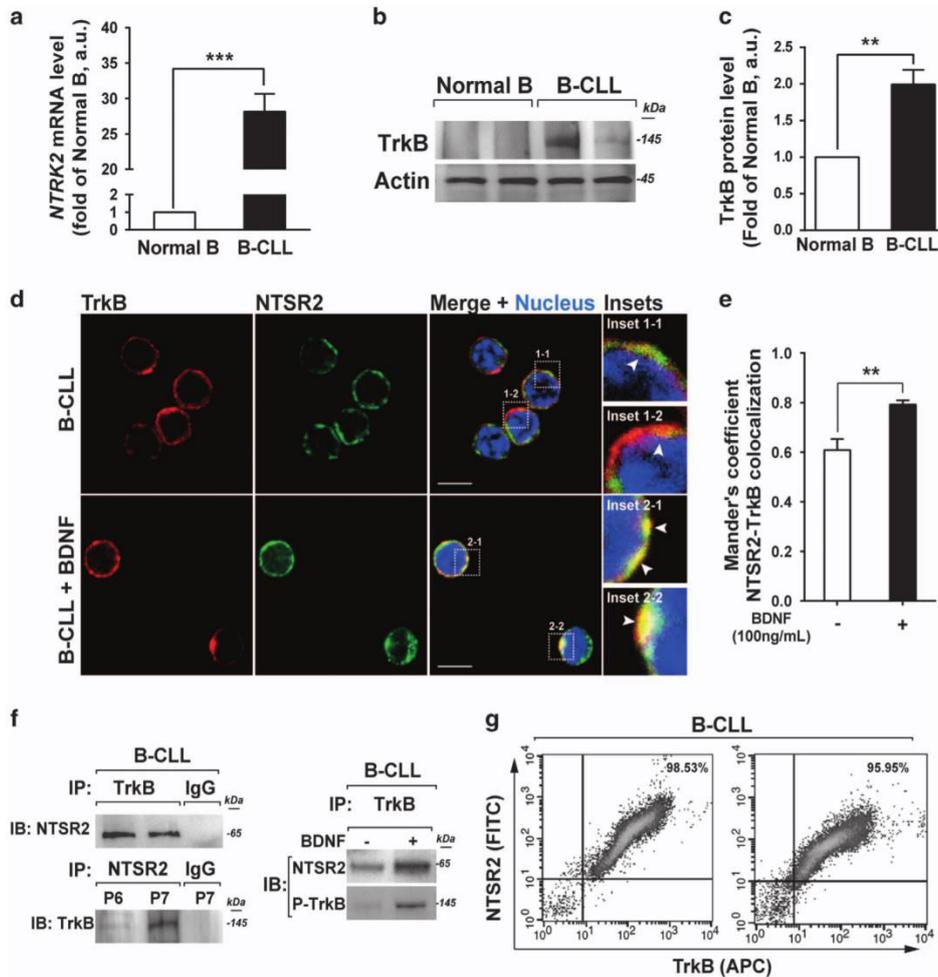


Figure 5. NTSR2 interacts with the tyrosine kinase receptor TrkB. **(a)** Quantitative analysis of the level of *NTRK2* mRNA (encoding TrkB) in normal B ($n = 15$) and B-CLL ($n = 30$) lymphocytes. Data are expressed as mean fold change in *NTRK2* expression (\pm s.e.m.) vs normal B cells. **(b)** Representative analysis of TrkB expression from B-lymphocyte cell lysates from two normal donors (D1, D2) or two B-CLL patients (P1, P2). **(c)** TrkB expression level, normalized against actin, in normal B ($n = 6$) and B-CLL ($n = 6$) cells. Values are means \pm s.e.m. of three independent experiments. **(d)** Confocal microscopy analysis of NTSR2 (green) and TrkB (red) and their colocalization in B-CLL cells (yellow staining in merged image, insets 1-1 to 2-2) in the presence or absence of BDNF (100 ng/ml). **(e)** Mander's overlap coefficient indicating colocalization of NTSR2 and TrkB after BDNF (100 ng/ml) treatment (means \pm s.e.m. of three independent experiments). **(f)** After immunoprecipitation (IP) of TrkB and NTSR2 from B-CLL protein lysates, immunocomplexes were immunoblotted (IB) with the indicated antibodies. **(g)** Representative cytogram showing co-detection of NTSR2 and TrkB by flow cytometry in B-CLL lymphocytes. Significant P -values are indicated in the graphs $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

signaling platform including both receptors is associated with apoptosis resistance in B-CLL pathogenesis.

DISCUSSION

Resistance to apoptosis is a hallmark of B-CLL clonal lymphocytes, which are characterized by elevated expression of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins²⁷ and sustained activation of pro-survival signaling pathways.^{28,29} Several studies have reported various mechanisms associated with B-CLL cell survival, many of which are related to B-cell receptor (BCR) activation. However, despite encouraging results using kinase inhibitors targeting the BCR pathway,³⁰ the frequency of resistance to this treatment and relapse in CLL patients highlights the deficiencies of current treatment protocols and suggests that other mechanisms are involved in CLL pathogenesis.

Independently of BCR activation, several pro-survival B-CLL growth factors and non-BCR receptors have been implicated in the pathogenesis of B-CLL,³¹ including Notch,³² TKR receptors such as insulin-like growth factor-1 receptor,^{33,34} and chemokines and their associated GPCRs.³⁵⁻³⁹ However, other GPCRs have not previously been reported to be involved in B-CLL pathogenesis. In this report, we provide the first evidence for the role of another GPCR, NTSR2, in B-CLL resistance to apoptosis (Figure 8). These data are consistent with our previous results showing that NTSR1 and NTSR2 and their common ligand NTS are involved in fine-tuned regulation of normal B-lymphocyte survival.¹⁴ However, in B-CLL lymphocytes, NTSR2 was drastically overexpressed, whereas NTS and NTSR1 were strongly downregulated. Therefore, we investigated the significance of NTSR2 overexpression in the absence of its ligand in the context of B-CLL lymphocyte survival. Our findings revealed that NTSR2 inactivation by either siRNA or a pharmacological



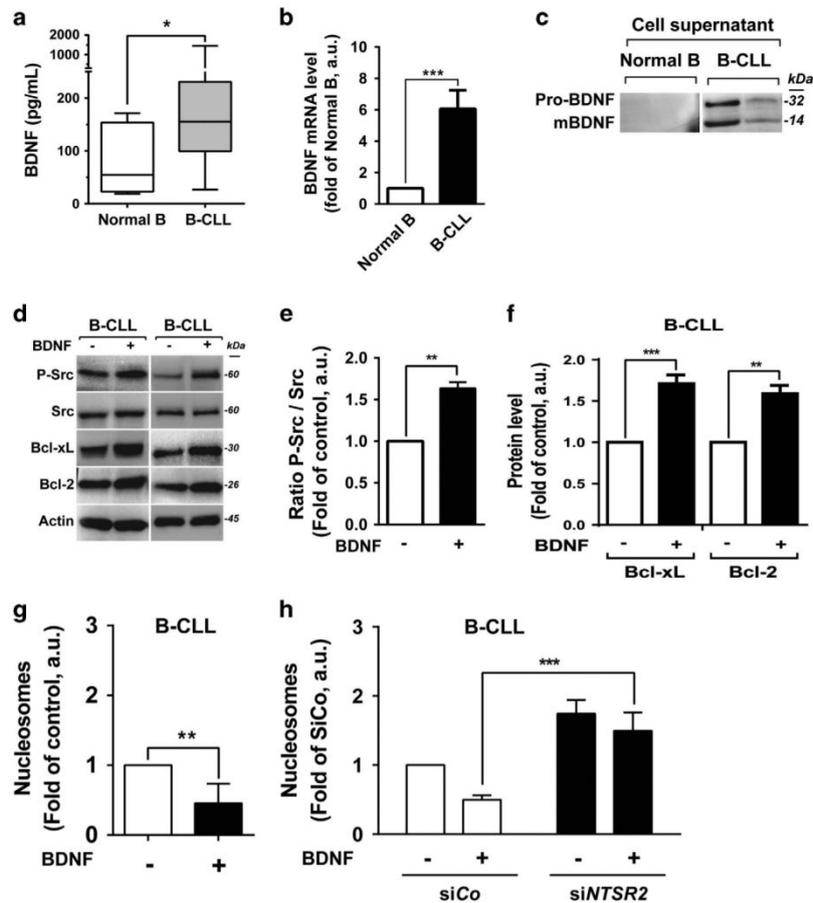


Figure 6. Protective role of BDNF against B-CLL apoptosis. (a) BDNF concentration, quantified by ELISA, in B-CLL patient plasma ($n = 17$, grey boxes) in comparison with healthy donor plasma ($n = 9$, white boxes). (b) Quantitative analysis of *BDNF* mRNA level in normal B ($n = 15$) and B-CLL ($n = 30$) cells. Data are expressed as mean fold change in expression (\pm s.e.m.) vs normal B cells. (c) Representative western blot analysis of pro-BDNF and mature BDNF (mBDNF) expression in normal B and B-CLL supernatants after 24 h of culture post-isolation. (d) Western blot analysis of P-Src, Bcl-xL and Bcl-2 in B-CLL cell lysates from two patients after addition of BDNF (100 ng/ml) for 24 h. (e, f) Expression levels of p-Src (e), Bcl-xL and Bcl-2 (f) represented as, respectively, the ratio of phosphorylated Src vs pan-Src protein and the ratios of Bcl-xL and Bcl-2 to actin (B-CLL, $n = 3$). Values are means \pm s.e.m. of three independent experiments, in a.u. (g, h) Apoptotic ratio, assessed by cell death ELISA, in B-CLL cells cultured with or without 100 ng/ml BDNF for 24 h (B-CLL, $n = 4$) in the presence or absence of siRNA against NTSR2 or control siRNA. Values are the mean ratio of apoptotic cells (\pm s.e.m.) from four independent experiments. Significant P -values are indicated in the graphs * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

inhibitor re-established B-CLL apoptosis (Figure 8, right panel). NTSR2 inactivation was associated with a significant decrease in the levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2, along with reduced activation of Src, which is constitutively phosphorylated in B cells from CLL patients. Strikingly, whereas Bcl-2 protein level changed following NTSR2 stimulation or inhibition, its mRNA level remains unchanged suggesting that Bcl-2 protein undergoes post-translational modifications increasing thereby its stability^{40–42} (Supplementary Figure 5). These observations will need to be resolved more deeply in future studies

Because NTS was undetectable in B-CLL lymphocytes, we investigated the possibility that a cross-pathway interaction with another partner was responsible for activating B-CLL cell survival. Like NTS, the growth factor BDNF, a member of the neurotrophin family, is known to participate in B-cell apoptosis resistance via TrkB, its TKR.²¹ The concomitant effects of TrkB and NTSR2 on B-CLL lymphocyte survival depended on a physical interaction between these receptors, which was strengthened by BDNF activation (Figure 8, left panel). No such interaction was detected

in normal B lymphocytes. This interaction was supported by mutual regulation of these receptors at the transcriptional level. TrkB expression was upregulated in B-CLL cells, as well as in NTSR2-overexpressing BL-41 or MEC-1 cells. Moreover, experimental overexpression of TrkB in MEC-1 and BL-41 cells induced the upregulation of *NTSR2* mRNA. A cross-pathway interaction between GPCRs and TKRs was previously reported for another NTS receptor, NTSR1 and EGFR/HERs in lung, breast and hepatocarcinomas.^{12,17,43} In leukemias or lymphomas, NTSR1 has been characterized in Sezary syndrome and HL-60 cells,^{44,45} whereas NTSR2 has rarely been investigated in cancers, with the exception of prostatic cancer.⁴⁶

In this study, we showed that B-CLL survival is linked to the activation of NTSR2, as assessed by G-protein recruitment and phosphorylation (Figure 8, left panel). NTSR2 activation depends on G α protein, as demonstrated by two observations: G α proteins immunoprecipitate with NTSR2 receptor in lymphocytes from B-CLL patients, and PTX decreases cell activation in NTSR2-overexpressing cells. G α protein recruitment in immune cells



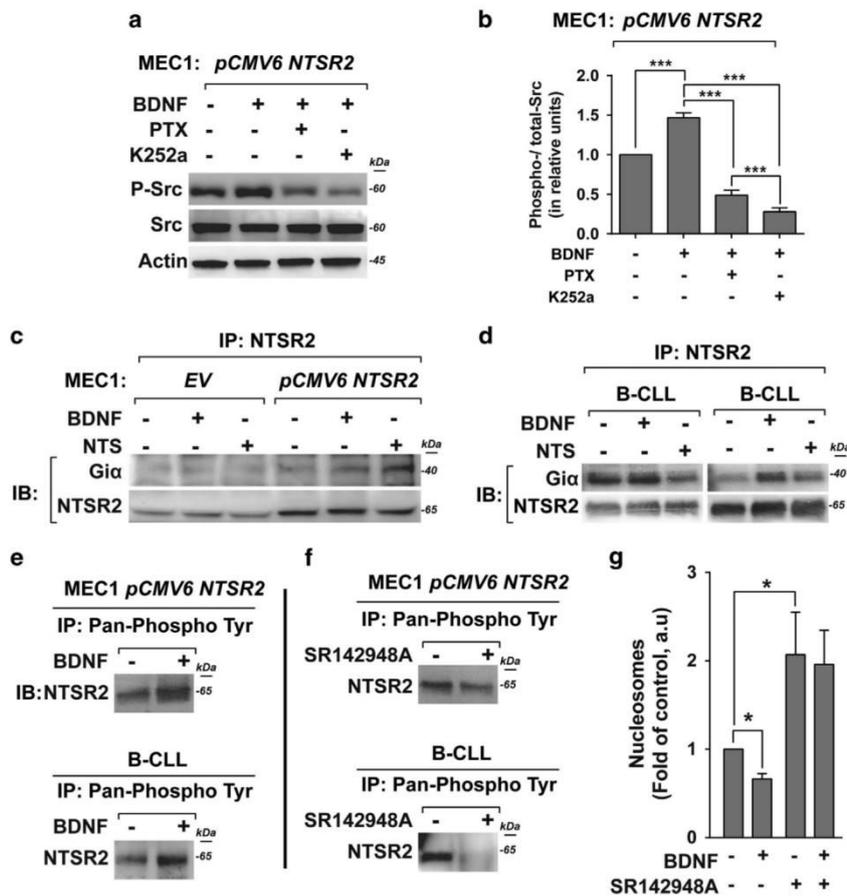


Figure 7. NTSR2 phosphorylation in B-CLL and recruitment of G α proteins. **(a)** Representative western blot analysis of Src phosphorylation in MEC-1 cells overexpressing NTSR2 (pCMV6-NTSR2) in the presence or absence of BDNF (100 ng/ml), pertussis toxin (PTX, 200 ng/ml) or K252a (100 nM) for 24 h. **(b)** Ratio of phosphorylated Src vs pan-Src protein, normalized against actin. Values are means \pm s.e.m. of three independent experiments in a.u. **(c, d)** After immunoprecipitation (IP) of NTSR2 from MEC-1 cells overexpressing NTSR2 (pCMV6-NTSR2) or not (EV), or from B-CLL cells in the presence or absence of BDNF (100 ng/ml) or NTS (40 μ M/ml), the immunocomplexes were immunoblotted (IB) with anti-G α 1/2 antibodies. **(e, f)** After immunoprecipitation (IP) of anti-pan-phosphoprotein was performed on MEC-1 cells overexpressing NTSR2 and B-CLL cells in the presence or absence of BDNF (100 ng/ml) or SR142948A (67 μ M), the phosphorylation of NTSR2 was detected by immunoblotting (IB) with anti-NTSR2 antibodies. **(g)** Apoptotic ratio, assessed by cell death ELISA, in B-CLL in the presence or absence of SR142948A (67 μ M) for 24 h. Values are mean ratios of apoptotic cells (\pm s.e.m.) of three independent experiments from different patients ($n=3$). Significant P -values are indicated in the graphs * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

plays a central role in B-lymphocyte survival, especially in regard to control of Bcl-2 expression, as demonstrated in G α -deficient mouse models showing that downregulated expression of Bcl-2 family proteins.⁴⁷ That, decreases the B-1a B-lymphocyte subpopulation,⁴⁸ equivalent to B-CLL lymphocytes. However, NTSR has not been previously examined with regard to B-CLL survival. This function was assessed by examining the recruitment and activation of Src, which is constitutively activated in B-CLL lymphocytes. The inhibition of NTSR by either a NTSR pharmacological inhibitor or by siNTSR2 in B-CLL lymphocytes restored B-CLL apoptosis.

According to other TKR-GPCR platform studies,^{49–53} NTSR2 activation is associated with the TrkB-NTSR2 complex, an active TKR-GPCR complex that can activate pro-survival signaling pathways including p38MAPK, Erk1/2, JNK and Src. Activation of signaling pathways following BDNF treatment suggests that NTSR2 is activated by TrkB, a finding not previously reported. A TKR-GPCR interaction leading to downstream activation through G α recruitment was reported for another TKR receptor, IGF1R, and another GPCR, CCR5 activated by a chemokine.⁵² TKR/GPCR

complex involving neurotrophin receptors was also previously reported for TrkA interacting with LPA (lysophosphatidate receptor) a GPCR receptor, activated by the TrkA ligand NGF (nerve growth factor), whereas GPCR inhibition causes a decrease in MAPK signaling.^{54,55}

The relationship between anti-apoptotic protein expression, resistance to apoptosis in B-CLL, and NTSR2 overexpression reveals a new mechanism of aberrant B-CLL lymphocyte survival. Knowledge of this mechanism could support the targeting of NTSR2 and its activation, with the ultimate goal of clinical application.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures

BL-41 and MEC-1 cell lines (Leibniz Institute, DSMZ, Germany) were cultured as previously described.¹⁴ Human B lymphocytes from healthy donors blood samples, obtained after approval of the Institutional Ethic Committee in accordance with the Declaration of Helsinki, were isolated as previously reported.^{14,21} Thirty-four B-CLL patients were included in this



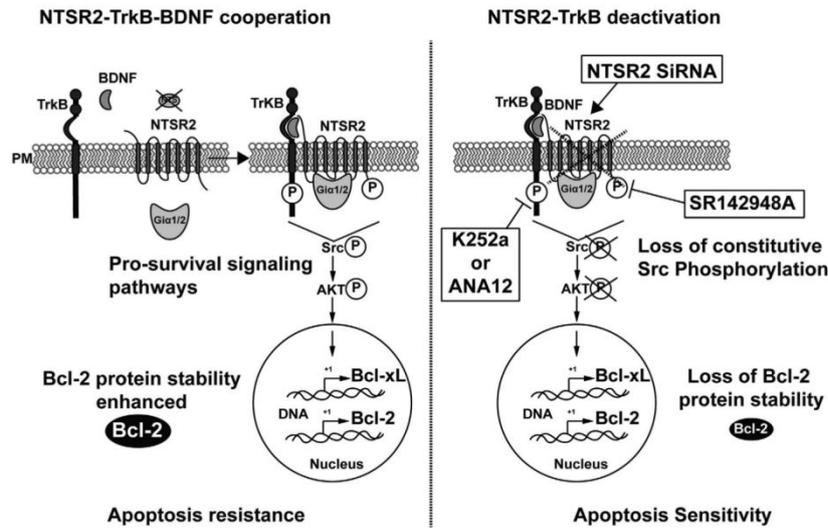


Figure 8. Model of NTSR2 function in B-CLL survival. In this schematic, NTSR2-TrkB-BDNF acts as a key regulator of B-CLL resistance to apoptosis. The NTSR2-TrkB interaction is strengthened upon BDNF stimulation, and triggers pro-survival pathways via phosphorylation of NTSR2, resulting in activation of the phosphorylation cascade of the Src and AKT kinases, as well as expression of the downstream anti-apoptotic proteins Bcl-xL and Bcl-2, leading to B-CLL cell survival and resistance to apoptosis (left panel). NTSR2 inhibition by siRNA-mediated mRNA depletion induces a drastic apoptotic cell death despite the presence of TrkB and BDNF, indicating that TrkB plays a role as a second messenger in NTSR2-mediated apoptotic resistance in B-CLL. NTSR2 deactivation by SR142948A suppresses the ability of NTSR2 to recruit the Gln1/2 subunits upon BDNF stimulation, leading to the suppression of NTSR2 phosphorylation and a decrease in the expression of anti-apoptotic proteins, thereby increasing B-CLL apoptosis (right panel). PM, plasma membrane.

study and approved by Institutional Review Board AC 72-2011-18. B-CLL were isolated from venous blood using the MACSxpress B-CLL Cell Isolation Kit, human (MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Overexpression and RNA interference

cDNAs encoding NTSR2 and TrkB in pCMV6-XL4 expression vectors were purchased from OriGene Technologies (Herford, Germany). For transient overexpression, cells were transfected using Amaxa Nucleofector 2b (Lonza, Levallois-Perret, France) and the Amaxa Nucleofector Kit-V (Lonza) according to the manufacturer's instructions. For interference assays, B-CLL cells were transfected using INTERFERin (Polyplus transfection, Illkirch, France). In each transfection, 84 ng siRNA against *NTSR2* (ON-TARGETplus Human *NTSR2* [23620] siRNA – SMARTpool), or siRNA control (ON-TARGETplus Non-targeting pool D-001810-10-20) (Dharmacon, CO, USA), were used.

Drugs and treatments

Cultured cells were incubated for 24 h with 40 μ M NTS (Calbiochem/Merck Millipore, Fontenay sous Bois, France) or 100 ng/ml human recombinant BDNF (Alomone labs, Jerusalem, Israel). Optimal concentrations of exogenous BDNF and NTS were determined previously.^{14,21} The non-peptide NTSR antagonist SR142948A (Tocris Biosciences, Bristol, UK) was used at 67 nM,⁵⁶ PTX (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 200 ng/ml^{35,57}; TrkB inhibitors were K252a (Alomone Labs) at 100 nM^{58,59} or ANA12 (Tocris Biosciences) at 100 μ M.⁶⁰

Flow cytometry and immunofluorescence

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 15 min at room temperature (RT). After washes in 1% bovine serum albumin/PBS and incubation with 5% bovine serum albumin/PBS for 30 min at RT, cells were incubated overnight at 4 °C with both rabbit polyclonal anti-NTSR2 and mouse anti-TrkB diluted in PBS/1% bovine serum albumin. After washing, samples were incubated with 1 mg/ml Alexa Fluor 488- or 594-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG Ab (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 h at RT. After washes, cells were suspended in 500 μ l of PBS and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) mounted in mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) and

observed under a confocal microscope (Carl Zeiss, LSM 880, Oberkochen Germany).

Western blots

Proteins obtained as described previously⁵⁸ were blotted onto polyvinylidene fluoride membrane (Calbiochem/Merck Millipore) and incubated with following antibodies: rabbit anti-NTSR-1 (ANT-015), rabbit anti-NTSR-2 (ANT-016), Alomone Labs; rabbit anti-Bcl-2 (sc-783, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA); rabbit anti-Bcl-xL (#2764S), rabbit anti-phospho-Akt (Ser473) (#4060S), mouse anti-Akt (pan; #2920S), rabbit anti-phospho-Src family (Tyr416; #6943S), rabbit anti-Src (#2108S), rabbit anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182; #9211S), rabbit anti-p38 MAPK (#8690S), rabbit anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185; #4668S), and rabbit anti-SAPK/JNK (#9252), all from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); mouse anti-Gln1/2 antibody (06-236, Calbiochem/Merck Millipore); and anti-actin (A5441, Sigma-Aldrich). After washing (tris-buffered saline/0.1% Tween-20), the immunoreactions were detected by incubation for 2 h at RT with horseradish peroxidase-conjugated secondary Ab against mouse or rabbit Ig (P0447 and P0448, respectively, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), revealed with the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore). Western blot were detected using Bioimaging Systems (GeneSnap and GeneTool; Syngene, Cambridge, UK). Densitometric analyses were performed using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation were conducted as described previously.⁵⁸ For IP assays, rabbit anti-NTSR-2 (ANT-016, Alomone Labs), mouse anti-TrkB (MAB3971, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and mouse anti-phosphotyrosine antibody clone 4G10 (05-321, Calbiochem/Merck Millipore) were used along with 50 μ l of protein A Sepharose (Sigma-Aldrich), and samples were incubated overnight at 4 °C. After centrifugation, the pellets were washed three times with IP buffer,⁵⁸ and then resuspended in 30 μ l of SDS-PAGE sample buffer containing DTT (50 mM) and analyzed by SDS-PAGE as described above for western blotting.

Analysis of cell viability and apoptosis

Cell viability was assessed using Trypan Blue exclusion method.⁶¹ Apoptosis was evaluated using either the PI/Annexin V-fluorescein



Table 1. Primers and probes sequences

Names		Sequences	Length (pb)	GenBank Reference
BDNF	Forward	5'-GGCTATGTGGAGTTGGCATT-3'	123	NM_170735.5
	Reverse	5'-CAAACGAAGGCTCTGAAG-3'		
	Probe	5'-ATTCTGAGTGGCCATCCCAAGTCTAG-3'		
Neurotensin	Forward	5'-TGACCAATATGCATACATAAGA-3'	105	NM_006183.4
	Reverse	5'-TAATTTGAACAGCCAGCTG-3'		
	Probe	5'-CATGTTCCCTCTTGAAGATGACTCTGCTA-3'		
NTSR1	Forward	5'-CGCCTCATGTTCTGCTACAT-3'	113	NM_002531.2
	Reverse	5'-TACGTCAGTCCACCATCAA-3'		
	Probe	5'-AGCAGTGGACTCCGTTCTCTATGACTTCT-3'		
NTSR2	Forward	5'-ATCCAGGTGAATGTGCTGGT-3'	114	NM_012344.3
	Reverse	5'-CCAAGTCCGTCACCTTCTA-3'		
	Probe	5'-ACTAACTGCTTTCCTGAATGGGGTCACAGT-3'		
TrkB-FL	Forward	5'-CTGGTGAAAATCGGGGACT-3'	137	NM_006180.4
	Reverse	5'-AGGAAATTCACGACGGAAAG-3'		
	Probe	5'-TGTACAGCACTACTACAGGGTCGGTG-3'		
BCL2	Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assay/Catalogue number 4331182		81	NM_000633.2
HPRT	HPRT1 Control mix, Applied Biosystems, TaqMan, VIC Catalogue number 4326321E			

isothiocyanate double staining method as described previously⁶² or the Cell Death Detection ELISA PLUS kit (Roche, Basel, Switzerland) colorimetric assay according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were transfected either with plasmids or siRNA as described above and cultured with or without exogenous BDNF or NTS for 24 additional hours in a 96-multiwell plate (5×10^4 cells/well). Absorbance values were measured at 405–490 nm with an ELISA reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The absorbance obtained in controls was normalized to a value of 1, as previously described.¹⁶

RNA extraction, reverse transcription and real-time quantitative PCR

RNA extraction, reverse transcription and real-time quantitative PCR analyses were performed as previously described.¹⁴ Primers and probes sequences used in this study are summarized in Table 1.

Plasma NTS and BDNF quantification

Plasma BDNF and NTS levels were measured using commercial ELISA kits: BDNF E_{max} ELISA ImmunoAssay System (Promega, WI, USA) and Human Neurotensin, NT ELISA Kit (CUSABIO Life Science, College Park, MD, USA). All assays were performed in triplicate, and results are expressed in pg/ml.

Data treatments and statistical analysis

Results were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher's *post hoc* test using the StatView 5.0 software (Abacus Concepts, Piscataway, NJ, USA). *P*-values < 0.05 were considered significant. Mean and s.e.m. values were obtained from at least three independent experiments.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported and funded by grants from the Limousin regional council, La Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité Départemental de La Haute-Vienne) and CORC (Comité d'Orientation de la Recherche en Cancérologie) from Limoges.

REFERENCES

- Kitada S, Pedersen IM, Schimmer AD, Reed JC. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 2002; **21**: 3459–3474.
- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; **352**: 804–815.
- Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C *et al*. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; **121**: 1403–1412.

- Liu Y, An S, Ward R, Yang Y, Guo X-X, Li W *et al*. G protein-coupled receptors as promising cancer targets. *Cancer Lett* 2016; **376**: 226–239.
- Kehrl JH. Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins. *Immunity* 1998; **8**: 1–10.
- Kehrl JH. The impact of RGS and other G-protein regulatory proteins on Gai-mediated signaling in immunity. *Biochem Pharmacol* 2016; **114**: 40–52.
- Barragán M, Bellosillo B, Campàs C, Colomer D, Pons G, Gil J. Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2002; **99**: 2969–2976.
- Cuní S, Pérez-Aciego P, Pérez-Chacón G, Vargas JA, Sánchez A, Martín-Saavedra FM *et al*. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2004; **18**: 1391–1400.
- Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 79–94.
- Mazella J, Zsürger N, Navarro V, Chabry J, Kaghad M, Caput D *et al*. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 1998; **273**: 26273–26276.
- Somai S, Gompel A, Rostène W, Forgez P. Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **295**: 482–488.
- Younes M, Wu Z, Dupouy S, Lupo AM, Mourra N, Takahashi T *et al*. Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget* 2014; **5**: 8252–8269.
- Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M, Forgez P. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie* 2011; **93**: 1369–1378.
- Saada S, Marget P, Fauchais A-L, Lise M-C, Chemin G, Sindou P *et al*. Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes. *J Immunol* 2012; **189**: 5293–5303.
- Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A *et al*. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* 2004; **91**: 355–358.
- Frade JM, Rodríguez-Tébar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 1996; **383**: 166–168.
- Dupouy S, Doan VK, Wu Z, Mourra N, Liu J, De Wever O *et al*. Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice. *Oncotarget* 2014; **5**: 8235–8251.
- Wilson CM, Naves T, Vincent F, Melloni B, Bonnaud F, Lalloué F *et al*. Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J Cell Sci* 2014; **127**: 3983–3997.
- Wilson CM, Naves T, Saada S, Pinet S, Vincent F, Lalloué F *et al*. The implications of sortilin/vps10p domain receptors in neurological and human diseases. *CNS Neuro Disord Drug Targets* 2014; **13**: 1354–1365.
- Dielschneider RF, Xiao W, Yoon J-Y, Noh E, Banerji V, Li H *et al*. Gefitinib targets ZAP-70-expressing chronic lymphocytic leukemia cells and inhibits B-cell receptor signaling. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1439.
- Fauchais A-L, Lalloué F, Lise M-C, Boumediene A, Preud'homme J-L, Vidal E *et al*. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol* 2008; **181**: 3027–3038.



- 22 Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk—the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2009; **15**: 5962–5967.
- 23 Pearse RN, Swendeman SL, Li Y, Rafii D, Hempstead BL. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* 2005; **105**: 4429–4436.
- 24 Ai L-S, Sun C-Y, Wang Y-D, Zhang L, Chu Z-B, Qin Y et al. Gene silencing of the BDNF/TrkB axis in multiple myeloma blocks bone destruction and tumor burden in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2013; **133**: 1074–1084.
- 25 Martin S, Vincent J-P, Mazella J. Recycling ability of the mouse and the human neurotensin type 2 receptors depends on a single tyrosine residue. *J Cell Sci* 2002; **115**: 165–173.
- 26 Rajmakers R, Kraiczek K, de Jong AP, Mohammed S, Heck AJR. Exploring the human leukocyte phosphoproteome using a microfluidic reversed-phase-TiO₂-reversed-phase high-performance liquid chromatography phosphochip coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Anal Chem* 2010; **82**: 824–832.
- 27 Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 1998; **91**: 3379–3389.
- 28 Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P et al. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 2007; **21**: 110–120.
- 29 Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2008; **111**: 846–855.
- 30 Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* 2012; **120**: 1175–1184.
- 31 Ghosh AK, Kay NE. Critical signal transduction pathways in CLL. *Adv Exp Med Biol* 2013; **792**: 215–239.
- 32 Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 2009; **113**: 856–865.
- 33 Saiya-Cork K, Collins R, Parkin B, Ouilllette P, Kuizon E, Kujawski L et al. A pathological role of the insulin receptor in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2011; **17**: 2679–2692.
- 34 Yaktapour N, Übelhart R, Schüler J, Aumann K, Dierks C, Burger M et al. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) as a novel target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; **122**: 1621–1633.
- 35 Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 1999; **94**: 3658–3667.
- 36 Möhle R, Failenschmid C, Bautz F, Kanz L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* 1999; **13**: 1954–1959.
- 37 Ticchioni M, Essafi M, Jeandel PY, Davi F, Cassuto JP, Deckert M et al. Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene* 2007; **26**: 7081–7091.
- 38 Schröttner P, Leick M, Burger M. The role of chemokines in B cell chronic lymphocytic leukaemia: pathophysiological aspects and clinical impact. *Ann Hematol* 2010; **89**: 437–446.
- 39 Drost AC, Seitz G, Boehmler A, Funk M, Norz KP, Zipfel A et al. The G protein-coupled receptor CysLT1 mediates chemokine-like effects and prolongs survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012; **53**: 665–673.
- 40 Breitschopf K, Haendeler J, Malchow P, Zeiher AM, Dimmeler S. Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1886–1896.
- 41 Rooswinkel RW, van de Kooij B, de Vries E, Paauwe M, Braster R, Verheij M et al. Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood* 2014; **123**: 2806–2815.
- 42 Tomasi ML, Ryoo M, Ramani K, Tomasi I, Giordano P, Mato JM et al. Methionine adenosyltransferase a2 sumoylation positively regulate Bcl-2 expression in human colon and liver cancer cells. *Oncotarget* 2015; **6**: 37706–37723.
- 43 Wu Z, Galmiche A, Liu J, Stadler N, Wendum D, Segal-Bendirdjian E et al. Neurotensin regulation induces overexpression and activation of EGFR in HCC and restores response to erlotinib and sorafenib. *Cancer Lett* 2017; **388**: 73–84.
- 44 Magazin M, Poszepczynska-Guigné E, Bagot M, Boumsell L, Pruvost C, Chalton P et al. Sezary syndrome cells unlike normal circulating T lymphocytes fail to migrate following engagement of NT1 receptor. *J Invest Dermatol* 2004; **122**: 111–118.
- 45 Choi SY, Chae HD, Park TJ, Ha H, Kim KT. Characterization of high affinity neurotensin receptor NTR1 in HL-60 cells and its down regulation during granulocytic differentiation. *Br J Pharmacol* 1999; **126**: 1050–1056.
- 46 Swift SL, Burns JE, Maitland NJ. Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. *Cancer Res* 2010; **70**: 347–356.
- 47 Ohman L, Franzén L, Rudolph U, Birnbaumer L, Hörnquist EH. Regression of Peyer's patches in G alpha i2 deficient mice prior to colitis is associated with reduced expression of Bcl-2 and increased apoptosis. *Gut* 2002; **51**: 392–397.
- 48 Dalwadi H, Wei B, Schrage M, Spicher K, Su TT, Birnbaumer L et al. B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene. *J Immunol* 2003; **170**: 1707–1715.
- 49 Cattaneo F, Guerra G, Parisi M, De Marinis M, Tafuri D, Cinelli M et al. Cell-surface receptors transactivation mediated by g protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci* 2014; **15**: 19700–19728.
- 50 El-Shevy HM, Johnson KR, Lee M-H, Jaffa AA, Obeid LM, Luttrell LM. Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 2006; **281**: 31399–31407.
- 51 Delcourt N, Bockaert J, Marin P. GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci* 2007; **28**: 602–607.
- 52 Mira E, Lacalle RA, González MA, Gómez-Moutón C, Abad JL, Bernad A et al. A role for chemokine receptor transactivation in growth factor signaling. *EMBO Rep* 2001; **2**: 151–156.
- 53 Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG et al. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 2001; **291**: 1800–1803.
- 54 Moughal NA, Waters C, Sambi B, Pyne S, Pyne NJ. Nerve growth factor signaling involves interaction between the Trk A receptor and lysophosphatidate receptor 1 systems: nuclear translocation of the lysophosphatidate receptor 1 and Trk A receptors in pheochromocytoma 12 cells. *Cell Signal* 2004; **16**: 127–136.
- 55 Moughal NA, Waters CM, Valentine WJ, Connell M, Richardson JC, Tigyi G et al. Protean agonism of the lysophosphatidic acid receptor-1 with Ki16425 reduces nerve growth factor-induced neurite outgrowth in pheochromocytoma 12 cells. *J Neurochem* 2006; **98**: 1920–1929.
- 56 Vita N, Oury-Donat F, Chalou P, Guillemot M, Kaghad M, Bachy A et al. Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Pharmacol* 1998; **360**: 265–272.
- 57 Bürkle A, Niedermeier M, Schmitt-Gräff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; **110**: 3316–3325.
- 58 De la Cruz-Morcillo MA, Berger J, Sánchez-Prieto R, Saada S, Naves T, Guillaudeau A et al. p75 neurotrophin receptor and pro-BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 2016; **7**: 34480–34497.
- 59 Sun C-Y, Chu Z-B, She X-M, Zhang L, Chen L, Ai L-S et al. Brain-derived neurotrophic factor is a potential osteoclast stimulating factor in multiple myeloma. *Int J Cancer* 2012; **130**: 827–836.
- 60 Cazorla M, Prémont J, Mann A, Girard N, Kellendonk C, Rognan D. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J Clin Invest* 2011; **121**: 1846–1857.
- 61 Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 2015; **111**: A3.B.1–3.
- 62 Bellanger C, Dubanet L, Lise M-C, Fauchais A-L, Bordsouille D, Jauberteau M-O et al. Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS One* 2011; **6**: e27213.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

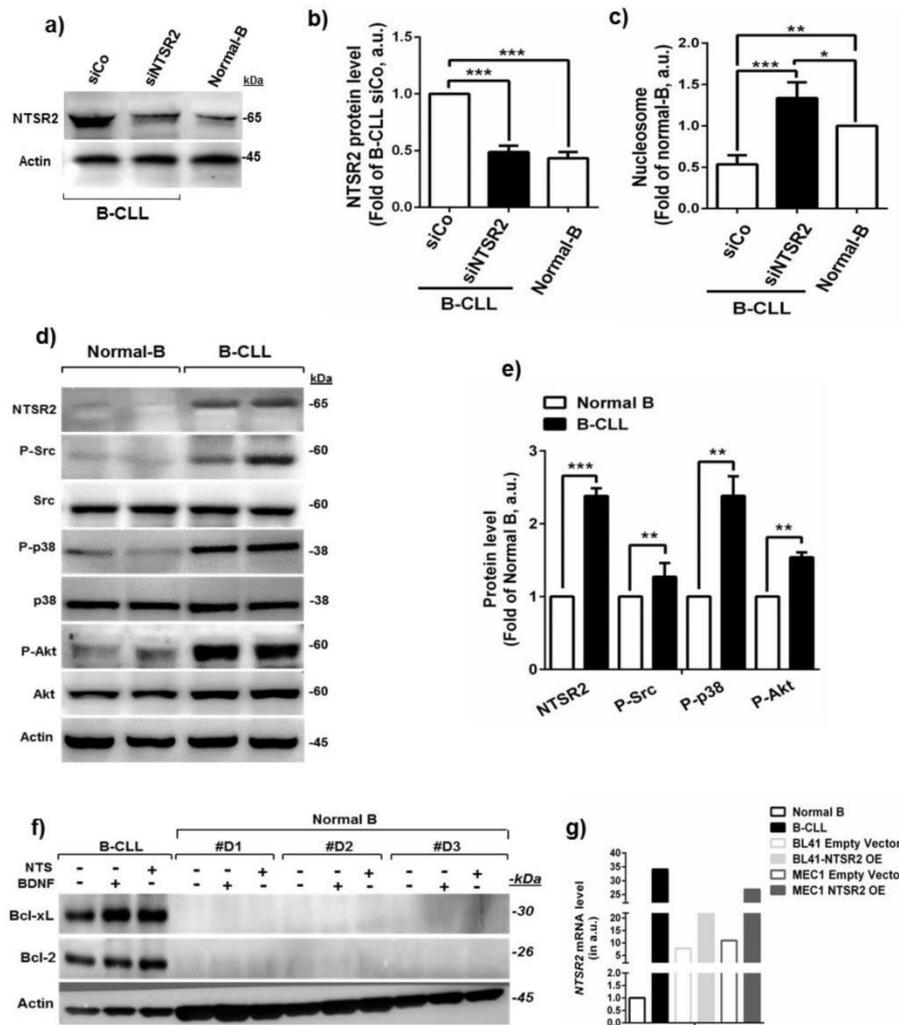
Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Oncogene (2017) 1–12



SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Figure 1

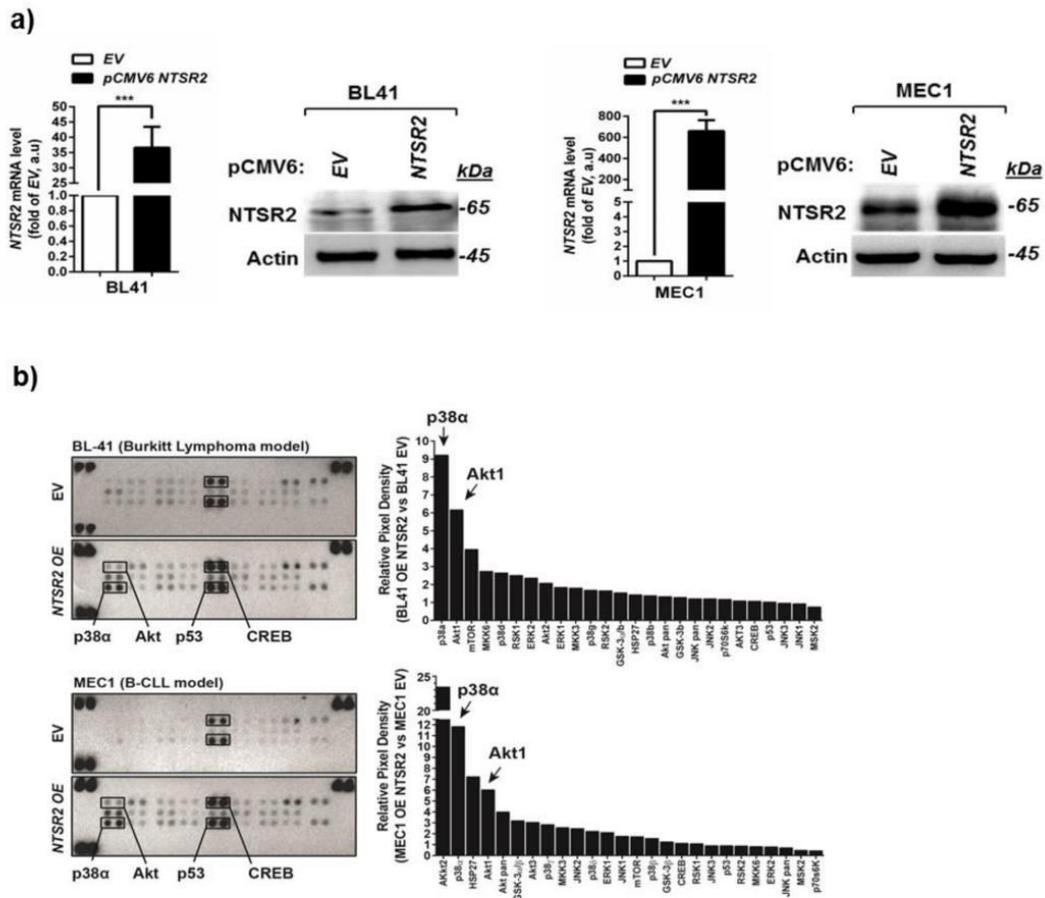


Supplementary Figure 1. Survival signaling pathways in B-CLL and normal B cells

(a) Western blot of NTSR2 expression from B-CLL cell lysates, depleted of *NTSR2* or not for 72 h vs. Normal B cells. (b) histograms: fold change in NTSR2 expression in siNTSR2 cells, siControl (siCo) and in Normal B, normalized against actin (c) Apoptotic ratio (nucleosome) in B-CLL cells (n=3) depleted of *NTSR2* or not for 72 h vs. Normal B (n=3), expressed as fold change vs. control (siCo). (d, e) Western blot analysis of NTSR2, Src, p38MAPK, and Akt expression from B-CLL lymphocytes vs. normal B lymphocytes, expressed as mean fold change in expression (\pm s.e.m.) in comparison with normal B cells. Values: means \pm s.e.m. of three independent experiments, in arbitrary units (a.u.). (f) western blot of Bcl-xL and Bcl-2, comparing B lymphocytes from three normal donors (#D1, #D2, #D3) and one B-CLL patient (#P1). (g) *NTSR2* mRNA level in B-CLL lymphocytes (n=30) vs. normal B lymphocytes (n=15), and in BL-41 or MEC-1 cells transfected with *NTSR2* expression vector (*pCMV6 NTSR2*) (n=15) vs. empty vector (EV) (n=15). Data are expressed as mean fold change in expression (\pm s.e.m.), with the value from normal B cells defined as 1.



Supplementary Figure 2

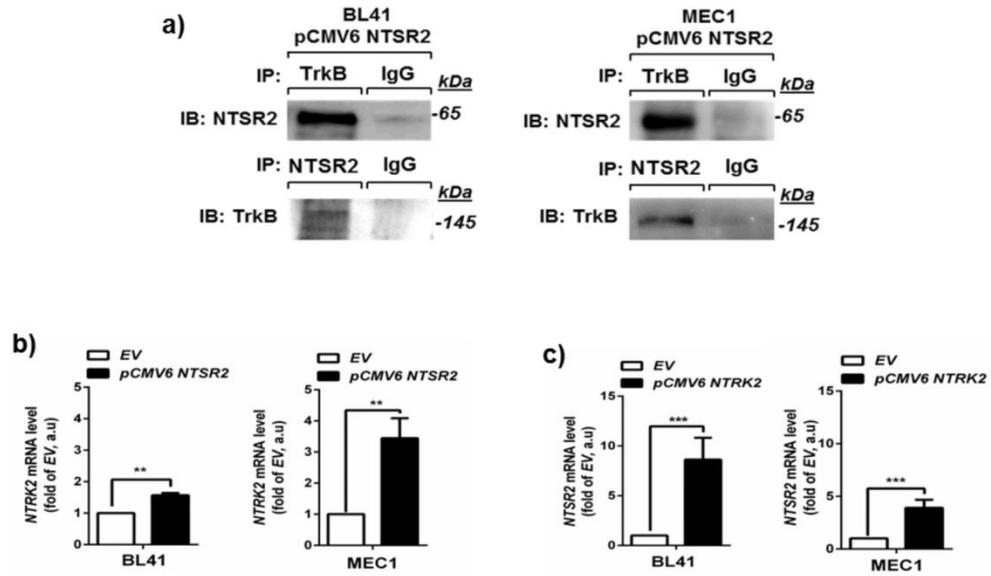


Supplementary Figure 2. NTSR2 overexpression in BL-41 and MEC-1 cells

(a) *NTSR2* mRNA and *NTSR2* protein expression levels in BL-41 or MEC-1 cells transfected with *NTSR2* expression vector (pCMV6 *NTSR2*) or empty vector (EV). Data are expressed as mean fold change (\pm s.e.m.) vs. empty vector. All experiments were repeated at least three times. (b) The signaling pathways activated by *NTSR2* overexpression were investigated using the Proteome Profiler Human Phospho-MAPK Array Kit (R&D Systems). In brief, transfected cells were grown in 24-well plates for 24 h and lysed, and approximately 300 μ g total protein was analyzed in each assay. Values are expressed as mean fold changes in *NTSR2* expression with respect to cells transfected with the empty vector.



Supplementary Figure 3

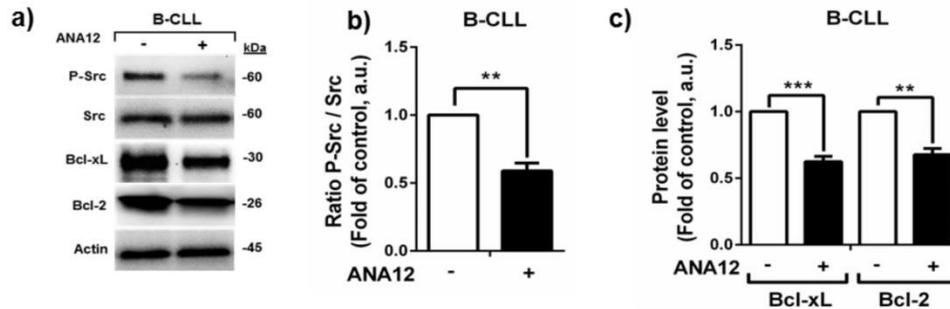


Supplementary Figure 3. NTSR2 and TrkB Interactions in BL-41 and MEC-1 cells

(a) Immunoprecipitation (IP) of TrkB or NTSR2 from BL-41 and MEC-1 cells overexpressing NTSR2 followed by immunoblot (IB) with indicated antibodies. All experiments were repeated at least three times; representative results are shown. **(b)** Quantitative analyses of *NTRK2* mRNA level in BL-41 or MEC-1 cells transfected with NTSR2 expression vector (pCMV6 NTSR2) or empty vector (EV). **(c)** Quantitative analyses of *NTSR2* mRNA level in BL-41 or MEC-1 cells transfected with NTRK2 expression vector (pCMV6 NTRK2) or empty vector (EV). Values are mean change in *NTSR2* or *NTRK2* expression (\pm s.e.m.) vs. empty vector. All experiments were repeated at least three times.



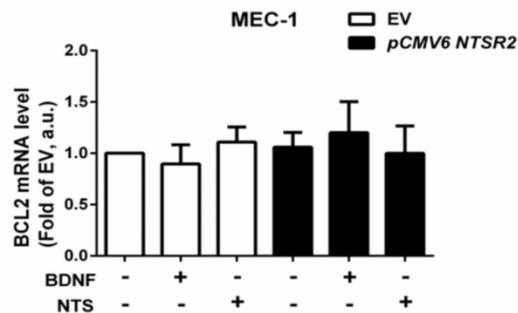
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4. TrkB inhibition and prosurvival pathways

(a) Western blot analysis of P-Src, Bcl-xL, and Bcl-2 in B-CLL cell lysates following TrkB inhibition with ANA12 at 100 μ M for 24 h. (b, c) Expression levels of p-Src (b), Bcl-xL, and Bcl-2 (c) represented as, respectively, the ratio of phosphorylated Src vs. pan-Src protein and the ratios of Bcl-xL and Bcl-2 to actin (B-CLL, n=3). Values are means \pm s.e.m. of three independent experiments, in arbitrary units (a.u.).

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5. BDNF or NTS stimulation did not modified *BCL2* mRNA levels in NTSR2-overexpressing MEC-1 cells

Quantitative analyses of *BCL2* mRNA levels in MEC-1 cells transfected with NTSR2 expression vector (pCMV6 NTSR2) or empty vector (EV) after addition of BDNF (100 ng/mL) and neurotensin (40 μ M) for 24 h. Data are expressed as mean fold change in expression (\pm s.e.m.) in comparison with EV transfected cells without treatments. Values are means \pm s.e.m. of three independent experiments, in arbitrary units (a.u.).



Discussion





Chapitre VI. Discussion

La LLC est une hémopathie maligne caractérisée par une accumulation anormale de lymphocytes B matures résistants à l'apoptose. Cette accumulation est accompagnée par une expression élevée de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Gottardi et al., 1996; Hanada et al., 1993; McConkey et al., 1996), ainsi que d'autres protéines de la même famille (Kitada et al., 1998). Les mécanismes responsables de la surexpression de Bcl-2 observée dans plus de 80% des lymphocytes leucémiques restent inexpliqués, mais initialement, des études ont rapporté que cette surexpression peut impliquer l'hypométhylation de la région promotrice du gène *BCL2* (Hanada et al., 1993; Raghoebier et al., 1991). Par la suite, d'autres travaux ont démontré que les micro RNAs, miR-15a et miR-16-1 qui régulent négativement *BCL2* au niveau post-transcriptionnel sont sous exprimés ou délétés et leur expression est inversement corrélée à l'expression de Bcl-2 (Calin et al., 2005; Cimmino et al., 2005). Les lymphocytes B leucémiques sont caractérisés également par une signalisation de pro-survie prolongée et un faible potentiel de prolifération. En effet, des études ont montré que les cellules B leucémiques de patients atteints d'une maladie progressive ont une plus grande capacité de progression dans le cycle cellulaire, liée à une forte activation de la voie de signalisation Akt (Longo et al., 2007). La même équipe a montré que les protéines Akt et Mcl-1 sont des éléments majeurs de cette voie de survie qui peut être activée par une stimulation antigénique des cellules B leucémiques (Longo et al., 2008).

Plusieurs études ont rapporté divers mécanismes associés à la survie cellulaire dans la LLC, dont beaucoup sont liés à l'activation du BCR (Petlickovski et al., 2005; Stevenson et al., 2011). Dans les cellules leucémiques, cette voie de signalisation regroupe plusieurs kinases, telles que BTK, Syk, ZAP-70, Lyn et PI3K (Wiestner, 2012). Malgré les résultats encourageants utilisant des inhibiteurs ciblant ces différentes kinases, la fréquence de résistance à ces traitements et la rechute chez les patients leucémiques soulignent l'insuffisance des traitements actuels et suggèrent que d'autres mécanismes sont impliqués dans la pathogenèse de la LLC. Indépendamment de l'activation du BCR, plusieurs facteurs de croissance de pro-survie et des récepteurs non-BCR ont été impliqués dans la pathogenèse de la LLC (Ghosh and Kay, 2013), comme Notch (Rosati et al., 2009), des récepteurs à tyrosine kinase tels que l'IGF-1R (*Insulin-like Growth Factor-1 Receptor*) (Saiya-Cork et al., 2011; Yaktapour et al., 2013); et des RCPGs comme les récepteurs de chimiokines (Burger et al., 1999; Drost et al., 2012; Möhle et al., 1999; Schröttner et al., 2010; Ticchioni et al., 2007). Cependant, à notre connaissance, il n'y a pas d'autres RCPGs démontrés comme étant impliqués dans la pathogenèse de la LLC. Les résultats précédents



de notre équipe ont montré que NTSR1 et NTSR2 et leur ligand commun la NTS, sont impliqués dans une régulation fine de la survie normale des lymphocytes B (Saada et al., 2012). De plus, cette étude a montré que les lymphocytes B leucémiques expriment fortement le récepteur NTSR2, alors que la NTS est indétectable et l'expression du récepteur NTSR1 est fortement diminuée. Ce niveau élevé d'expression n'a pas été détecté dans les ganglions tumoraux des patients atteints de DLBCL ou de cancer colorectal (Saada et al., 2012).

Très peu d'études ont décrit l'implication et les fonctions du récepteur NTSR2 en oncologie. La plupart des travaux concerne l'implication de l'axe NTS/NTSR1 notamment dans les signalisations induites dans les cancers solides (Alifano et al., 2010; Baxendale et al., 2013; Bugni et al., 2012; Dupouy et al., 2014; Ouyang et al., 2015; Wang et al., 2011; Yu et al., 2013). Concernant NTSR2, la surexpression de ce récepteur a été rapportée dans le cancer de la prostate, notamment dans les stades les plus différenciés (Swift et al., 2010). En effet, cette surexpression a été détectée dans les lignées issues de cancers prostatiques différenciés, comparées aux lignées non différenciées dépourvues de récepteurs androgéniques ou à des cellules non malignes, provenant d'adénome (Swift et al., 2010). L'expression de NTSR2 a également été caractérisée dans les lignées de cellules cancéreuses HT-29 et FaDu, provenant, respectivement, d'adénocarcinome du colon et de carcinome épidermoïde du pharynx, sans aucune démonstration de l'implication du récepteur dans l'activation de la prolifération cellulaire (Haase et al., 2006). Dans le CCR, l'expression de NTSR2 est inconstamment détectée. Ces variations d'expressions selon les lignées étudiées peuvent être expliquées par des modifications épigénétiques. En effet, la méthylation des promoteurs de *NTSR1* et de *NTSR2* a été rapportée dans les lignées cellulaires de tumeurs neuroendocrines et de CCR (Kim et al., 2015b, 2017). Elle régule ainsi l'expression différentielle des deux récepteurs et serait responsable de l'inhibition de l'expression de NTSR2 dans ces cellules (Kim et al., 2015b, 2017). La méthylation du gène *NTSR2* a également été détectée dans les cancers inflammatoires du sein (Van der Auwera et al., 2010). Enfin, des modifications au niveau de méthylation du promoteur de la *NTS*, ont également été détectées (Dong et al., 1998). En effet, une hypométhylation de ce promoteur est présente dans 25% des CCR. Cette méthylation bloque la fixation du facteur de transcription AP-1, contrôlant ainsi l'expression du gène de la NTS dont l'activation est associée au CCR (Dong et al., 2000).

Dans cette étude, nous montrons pour la première fois le rôle de NTSR2 dans la résistance des cellules B leucémiques à l'apoptose. Ainsi, nous avons montré que la surexpression de NTSR2, en l'absence de son ligand, est associée à la survie des



lymphocytes B leucémiques. Nos résultats ont révélé que l'inactivation du NTSR2 par siRNA ou par l'inhibiteur pharmacologique SR142948A rétablit l'apoptose de ces cellules, à un niveau équivalent à celui de cellules B humaines normales. L'inactivation de NTSR2 est associée à une diminution significative des niveaux d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ceci parallèlement à la diminution de l'activité constitutive de Src que nous avons détectée dans les cellules B de patients atteints de la LLC dont les niveaux d'expression protéique de Bcl-2 sont élevés. Une telle interrelation de la survie cellulaire impliquant Bcl-2 et les NTSRs a été décrite pour NTSR1, dont l'activation par la NTS dans les cellules de cancer du sein, induit une augmentation de l'ARNm et de la protéine Bcl-2. Dans ce type cellulaire, cette augmentation dépend de la voie des MAPKs et résulte de l'activation transcriptionnelle de Bcl-2 (Somaï et al., 2002b). Par contre, dans notre étude, la surexpression du récepteur NTSR2 agit sur le niveau d'expression de la protéine Bcl-2, sans modifier les niveaux d'ARNm qui restent inchangés (à 4h comme à 24h post activation par la NTS, dans les cellules de la lignée MEC-1 surexprimant NTSR2). Ceci suggère que les modifications d'expression de Bcl-2, consécutives à la surexpression de NTSR2, n'interviennent pas au stade transcriptionnel. L'augmentation de la protéine Bcl-2 pourrait résulter de modifications post-transcriptionnelles qui inhibent sa dégradation dépendante du protéasome, et augmente ainsi sa demi-vie. En effet, de nombreuses modifications post-transcriptionnelles comme l'ubiquitination et la phosphorylation sont des hypothèses qui restent à étudier (Breitschopf et al., 2000; Rooswinkel et al., 2014; Tomasi et al., 2015). D'autres mécanismes sont également évoqués dans la régulation post-transcriptionnelle de Bcl-2, ils pourraient dépendre *i)* de la modulation de l'expression de deux miRNAs, miR-15-a et miR-16-1 inhibiteurs de Bcl-2, décrits dans la LLC (Calin et al., 2005; Cimmino et al., 2005); *ii)* de l'expression de la nucléoline, protéine de liaison à l'ARN, augmentant ainsi la stabilité de l'ARNm de Bcl-2 (Willimott and Wagner, 2010), dont l'expression anormale a été décrite dans la LLC.

Concernant l'activation constitutive de NTSR2 (phosphorylation, recrutement de Src) son mécanisme est à discuter. En effet, cette activation est détectée dans les lymphocytes B de patients atteints de la LLC et dans les modèles cellulaires comportant une surexpression de NTSR2 en l'absence de toute stimulation. Étant donné que la NTS était indétectable dans les lymphocytes B des patients atteints de la LLC, nous avons émis l'hypothèse que ce récepteur pouvait être activé à la suite d'une transactivation induite par un autre récepteur, notamment à tyrosine kinase comme le TrkB, également surexprimé chez les patients. Cette interaction entre NTSR2 et TrkB a été objectivée par microscopie confocale et immunoprécipitation, dans les modèles cellulaires résultants d'une surexpression de NTSR2



et chez les patients. Nous avons montré que cette interaction était indispensable à l'activation de la survie des cellules B leucémiques.

Le ligand de TrkB est un facteur de croissance endogène, le BDNF, sécrété par plusieurs types de cellules cancéreuses. Il appartient à la famille des NTs, et agit de façon autocrine dans plusieurs types cellulaires dont il induit la survie et l'activation comme cela a été démontré par notre équipe dans des lignées de cancer colorectal (Akil et al., 2011) ainsi que dans différentes lignées lymphocytaires B humaines (Fauchais et al., 2008). Ce récepteur TrkB activé par le BDNF induit la résistance à l'apoptose dans ces types cellulaires soumis à des stress cellulaires induits par privation sérique ou activation du récepteur apoptotique Fas (Akil et al., 2011; Fauchais et al., 2008). De même, dans le myélome multiple, le BDNF a également été décrit comme facteur de croissance autocrine de plasmocytes tumoraux et contribue à la progression tumorale et à la survie cellulaire en activant la signalisation des MAPKs et la voie PI3K/Akt (Pearse et al., 2005). De plus, le BDNF protège les plasmocytes tumoraux de l'apoptose induite par la dexaméthasone ou le bortezomib, molécules utilisées pour le traitement du myélome (Pearse et al., 2005).

L'axe BDNF/TrkB a également été associé à une augmentation significative de la survie et de la prolifération de cellules de lymphome non Hodgkinien (Sniderhan et al., 2009). Dans un de ces lymphomes, le DLBCL, des études *in vitro* de notre équipe ont montré que l'inhibition pharmacologiques des récepteurs de NTs par le K252a augmente l'apoptose des cellules de lymphome (Bellanger et al., 2011). Ces différents travaux révèlent ainsi l'importance de l'axe BDNF/TrkB dans plusieurs types cellulaires tumoraux, incluant les lymphocytes B. Néanmoins, dans le cadre de la LLC, nous avons montré que cet axe BDNF/TrkB interagissait avec le récepteur NTSR2.

Les effets concomitants de TrkB et NTSR2 sur la survie des lymphocytes leucémiques dépendent d'une interaction physique entre ces deux récepteurs, renforcée par une stimulation induite par le BDNF. Cette interaction est soutenue par la régulation mutuelle de ces deux récepteurs au niveau transcriptionnel. En effet, l'expression de TrkB est régulée positivement dans les cellules leucémiques, ainsi que dans les cellules BL-41 ou MEC-1 surexprimant NTSR2. De même, la surexpression de TrkB dans les cellules BL-41 et MEC-1 induit une régulation positive de l'ARNm de NTSR2. Les analyses d'immunoprécipitation et de microscopie confocale ont montré la co-localisation de ces deux récepteurs dans les cellules leucémiques, ainsi que dans les lignées cellulaires surexprimant NTSR2. Une telle interaction entre ces deux récepteurs n'a jamais été décrite auparavant. En revanche, plusieurs études ont décrit les interactions entre d'autres récepteurs de type RTKs avec



d'autres RCPGs (Cattaneo et al., 2014; Delcourt et al., 2007a; El-Shewy et al., 2006; Mira et al., 2001; Pyne and Pyne, 2011). En effet, les interactions de ces récepteurs ont été décrites en cancérologie, impliquant particulièrement l'EGFR dans une plateforme de signalisation RTK-RCPGs, notamment dans les cancers de la prostate (Amorino et al., 2007), du poumon (Moody et al., 2016), du pancréas (Gilmour et al., 2013), et du colon (Itoh et al., 2005). L'interaction entre les voies des RCPGs et celles des RTKs a également été rapportée pour l'autre récepteur à la NTS, NTSR1. Ce dernier interagit avec l'EGFR/HER dans les cancers du poumon et du sein (Dupouy et al., 2014; Younes et al., 2014).

Comme observé précédemment pour le récepteur NTSR1 (Dupouy et al., 2014; Younes et al., 2014) et le récepteur NTSR3/sortiline (Wilson et al., 2014a, 2014b), nous avons émis l'hypothèse que l'activation du récepteur NTSR2 dépendait du recrutement d'un récepteur Trk. Comme plusieurs études précédentes ont montré que l'axe BDNF/TrkB est impliqué dans la survie des cellules B (Fauchais et al., 2008), du myélome (Pearse et al., 2005) ainsi que dans d'autres cancers (Thiele et al., 2009), et que TrkB était également surexprimé dans les cellules B de la LLC, l'hypothèse que TrkB pouvait être le co-récepteur de NTSR2 a été avancée. Ainsi, l'activation de NTSR2 est associée au complexe NTSR2-TrkB, un complexe RCPG-TRK qui active des voies de signalisation de survie incluant p38MAPK, Erk1/2, JNK et Src. L'activation des voies de signalisation, recrutées à la suite d'une stimulation induite par le BDNF, suggère que l'activation de NTSR2 est dépendante de l'activation de TrkB.

L'implication d'un ligand de récepteur RTK dans une signalisation RCPG-RTK a été précédemment démontrée dans d'autres types cellulaires. En effet, dans des cultures primaires neuronales, le facteur de croissance IGF-1 *via* son récepteur RTK est capable de transactiver le récepteur RCPG, PAC1R (*PACAP type 1 Receptor*) et stimuler la signalisation et l'activité anti-apoptotique dans ces cellules (Delcourt et al., 2007b). De même, il a été démontré que le PDGF induit la migration cellulaire par un mécanisme de transactivation impliquant l'activation du récepteur RCPG, EDG-1 (*Endothelial Differentiation Gene-1*) et la GTPase Rac (Hobson et al., 2001). L'autre exemple de l'implication de la signalisation RCPG-RTK dans la migration cellulaire, est celui de la transactivation du récepteur CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) par l'IGF-1R dans la lignée cellulaire de cancer du sein MDA-MB231 (Akekawatchai et al., 2005). En effet, cette interaction permet à IGF-1 d'activer les voies de signalisation impliquées dans la migration à travers le récepteur CXCR4 et les sous-unités $G_{i\alpha 2}$ et G_{β} , indépendamment du ligand naturel de CXCR4, la chimiokine CXCL12 (*C-X-C chemokine ligand 12*) (Akekawatchai et al., 2005). Enfin, l'interaction RCPG-RTK a également été observée au niveau de l'induction de l'inflammation et de la tumorigenèse



dans la lignée cellulaire de cancer du sein, MCF-7 (Mira et al., 2001). Ces différents mécanismes impliquent les voies de signalisation des MAPKs et des ERK (Delcourt et al., 2007a; El-Shewy et al., 2006).

Concernant les récepteurs aux NTs, un tel complexe RCPG-TRK a également été décrit précédemment dans la lignée de phéochromocytome PC12. En effet, TrkA interagit avec LPA1 (*Lysophosphatidate receptor 1*) un récepteur RCPG, activé par le ligand de TrkA, le NGF. Dans ce modèle, l'inhibition des RCPGs provoque une diminution de la signalisation des MAPKs (Moughal et al., 2004, 2006). De plus, des travaux ont mis en évidence l'implication du récepteur RCPG, S1P₁ (*Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1*) dans l'extension des neurites induite par le NGF. En effet, dans les cellules PC12 ainsi que dans des cellules neuronales, le NGF *via* son récepteur TrkA transactive le récepteur S1P₁ en stimulant la sphingosine kinase 1 (SphK1). L'extension des neurites induite par le NGF est inhibée par la régulation négative de S1P₁. À l'inverse, lors de la surexpression de ce récepteur dans les cellules PC12, la transactivation de S1P₁ par le NGF stimule la petite GTPase Rac et augmente fortement l'extension des neurites dans ces cellules (Toman et al., 2004).

Dans notre étude, l'activation de la signalisation par le complexe NTSR2-TrkB passe par la formation d'un hétérodimère fonctionnel. Une étude précédente a montré que l'hétérodimérisation de NTSR1 avec un autre RCPG, le récepteur de l'apeline (APJ), augmente l'activation et la signalisation induite par leurs ligands respectifs dont la NTS (Bai et al., 2014). L'action de l'inhibiteur pharmacologique SR1492948A dans notre étude est discutée. En effet, le récepteur NTSR2 a été initialement décrit comme étant sensible pour cet inhibiteur pharmacologique (Betancur et al., 1998; Gully et al., 1997). La lévocabastine, connue pour être l'inhibiteur classique de NTSR2, n'a pas été utilisée dans cette étude en raison des effets paradoxaux et non reproductibles que notre équipe a constatés dans différents types de lymphocytes B. Par contre, l'inhibition de NTSR2 par le SR1492948A a été constatée devant la diminution du recrutement des protéines G_{ix} et de la phosphorylation du récepteur tant dans les cellules de patients que dans les modèles de surexpression de NTSR2. L'hétérodimérisation du récepteur NTSR2 à TrkB pourrait augmenter l'affinité de liaison des ligands, notamment de la NTS à NTSR2 augmentant ainsi le recrutement des protéines G_i, même si l'expression de NTS est faible dans les lymphocytes B leucémiques. Le BDNF, activant TrkB augmenterait cette hétérodimérisation et l'activation de la voie de signalisation des Src. Cet effet, est diminué en présence de l'inhibiteur de TrkB, ANA12.



La NTS induit des effets différents en fonction du système d'expression cellulaire utilisé et peut agir comme agoniste, agoniste inverse ou antagoniste (Mazella et al., 1996a; Richard et al., 2001b; Vita et al., 1998; Yamada et al., 1998). En effet, une activité constitutive du récepteur NTSR2 humain a été décrite dans des cellules COS transfectées par le NTSR2 humain (Richard et al., 2001b). Dans ce modèle, cette activité est inhibée par la lévocabastine mais la NTS n'a montré aucun effet. Dans un autre modèle de transfection du récepteur NTSR2 humain (cellules CHO), l'activité constitutive du récepteur NTSR2 est inhibée par la NTS et la lévocabastine (Vita et al., 1998). De plus, dans ces cellules les antagonistes SR48692 et SR142948A peuvent agir comme agonistes et induire la mobilisation de Ca^{2+} (Vita et al., 1998). Ces études montrent que le SR142948A induit des effets paradoxaux selon les types cellulaires et les espèces et agit par des mécanismes d'action mal défini pour inhiber le récepteur NTSR2 humain. Toutefois, de nouveaux inhibiteurs du récepteur NTSR2 ont été décrits dans la littérature, qu'il conviendra de tester dans nos modèles (Einsiedel et al., 2011; Thomas et al., 2014).

Une interaction RCPG-RTK menant à une activation en aval grâce au recrutement de $G_{i\alpha}$ a été démontrée pour un autre récepteur à tyrosine kinase, l'IGF-1R et un autre RCPG, CCR5 (*C-C chemokine Receptor type 5*) activé par la chimiokine RANTES (Mira et al., 2001). En effet, cette étude montre que l'activation de l'IGF-1R conduit à la stabilité et/ou à la stimulation de la transcription de l'ARNm de RANTES (le ligand naturel du récepteur CCR5), augmentant ainsi sa synthèse et sa sécrétion dans le milieu extracellulaire. A son tour, RANTES lie et active le récepteur CCR5 et favorise la migration. (Mira et al., 2001).

Dans notre étude, nous avons montré que la survie des cellules leucémiques est liée à l'activation de NTSR2, démontrée par le recrutement des protéines G et par sa phosphorylation. En effet, l'activation de NTSR2 dépend de la protéine $G_{i\alpha}$, qui a été déjà décrite dans l'activité de plusieurs RCPGs tels que ceux observés dans l'activation de cellules immunitaires (Kehrl, 1998). Cela a été montré *i)* par la diminution de l'activation de NTSR2 en présence de la PTX qui interagit avec les sous-unités de protéines G_{α} de la famille G_i (isoformes $G_{i\alpha1}$, $G_{i\alpha2}$, et $G_{i\alpha3}$) (Kehrl, 1998) et *ii)* par immunoprécipitation de NTSR2 avec les protéines $G_{i\alpha}$ dans les lymphocytes B leucémiques comme dans les cellules surexprimant NTSR2. Le recrutement de protéines $G_{i\alpha}$ dans les cellules immunitaires joue un rôle central dans la survie des lymphocytes B, en particulier dans le contrôle de l'expression de Bcl-2, comme cela a été démontré avec les modèles de souris déficientes en $G_{i\alpha}$ montrant une régulation négative des protéines de la famille Bcl-2 (Ohman et al., 2002). Dans ces modèles murins, il convient également de noter la diminution de la sous-population lymphocytaire B, B-1a (Dalwadi et al., 2003) qui est l'équivalent chez l'homme des



lymphocytes B CD5⁺ impliqués dans le développement de la LLC, ceci attestant de la fonction des protéines G_{1α} dans le maintien de cette sous population de lymphocytes B. L'implication du récepteur NTSR2 dans la survie des cellules B leucémiques a été également démontrée par le recrutement et l'activation de Src, qui est activé de façon constitutive dans les lymphocytes B leucémiques. L'inhibition du récepteur NTSR2 par un inhibiteur pharmacologique ou par siNTSR2 restaure l'apoptose des cellules leucémiques.

La relation entre l'expression des protéines anti-apoptotiques, la résistance à l'apoptose dans les cellules leucémiques et la surexpression du récepteur NTSR2, révèle un nouveau mécanisme de survie anormale des lymphocytes B de patients atteints de LLC.



Conclusion et perspectives





Conclusion et perspectives

L'ensemble de nos résultats met en évidence pour la première fois le rôle essentiel du récepteur NTSR2 dans la résistance à l'apoptose des lymphocytes B de patients atteints de la LLC. Dans ces cellules B, NTSR2 est fortement exprimé et constitutivement activé indépendamment de son ligand naturel, la NTS qui est considérablement diminuée dans ces cellules. Cette régulation de signalisation de survie et de résistance à l'apoptose induite par NTSR2, est la conséquence de son interaction avec le récepteur à domaine tyrosine kinase TrkB. Ce complexe hétérodimérique RCPG-TRK est stimulé par le ligand de TrkB, le BDNF, et induit le recrutement de protéines $G_{i\alpha}$ par NTSR2. Ainsi, ce complexe agit comme un oncogène conditionnel dépendant du BDNF, qui est fortement exprimé dans les cellules leucémiques comparé à la NTS. Le complexe NTSR2-TrkB active les voies de signalisation de survie, comme Src et Akt, ainsi que l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. L'inhibition de TrkB dans ce complexe diminue ces voies de signalisation. De plus, l'effet protecteur de l'axe BDNF/TrkB est supprimé lorsque NTSR2 est inhibé, induisant ainsi une diminution drastique de la viabilité par apoptose. Cela suggère que les deux récepteurs contribuent ensemble à la survie des cellules leucémiques.

Nos résultats montrent que l'interaction NTSR2-TrkB et l'activation des voies de signalisation, sous le contrôle de ces deux acteurs, joue un rôle déterminant dans la survie des cellules leucémiques, ce qui suggère que l'inhibition du récepteur NTSR2 ouvre un nouveau champ de recherche thérapeutique dans cette pathologie caractérisée par l'accumulation de lymphocytes B résistants à l'apoptose et impliquant Bcl-2.

Dans notre étude nous avons montré que l'expression de la protéine Bcl-2 est régulée par la stimulation ou l'inhibition de NTSR2 mais son niveau d'ARNm reste inchangé. Il convient donc de déterminer si la régulation de Bcl-2 dans les cellules surexprimant NTSR2 ou dans les cellules B leucémiques est dépendante des mécanismes post-transcriptionnels comme l'ubiquitination, la phosphorylation, ou d'autres mécanismes de régulation comme la modulation de l'expression des miRNAs miR-15-a et miR-16-1 et de la protéine de liaison à l'ARN, la nucléoline. Ces mécanismes ont été décrits comme fréquemment dérégulés dans la LLC. Nous rechercherons ainsi l'expression de ces facteurs qui sont associés au maintien de la protéine Bcl-2 dans les lymphocytes leucémiques et dans les modèles surexprimant NTSR2 et leurs variations éventuelles d'expression lors de l'inactivation de NTSR2 par siRNA ou par son inhibiteur pharmacologique.



Etant donné que les voies de signalisation en aval de NTSR2 sont des caractéristiques communes à plusieurs récepteurs à tyrosine kinase ou de RCPGs, NTSR2 pourrait agir sur d'autres récepteurs RTKs souvent impliqués dans la survie des cellules leucémiques. Il convient également d'analyser et de comparer les niveaux d'expression d'autres Trks et/ou RCPGs dans ces cellules par rapport aux lymphocytes B normaux.

Parallèlement, nous avons constaté dans une étude préliminaire, que l'expression en ARNm de NTSR3/sortiline est diminuée dans les cellules leucémiques ainsi que dans la lignée cellulaire BL-41 surexprimant NTSR-2. Cela suggère l'existence d'un mécanisme de régulation potentielle entre NTSR2 et NTSR3/sortiline. Ainsi, il reste à *i)* identifier les fonctions régulatrices de NTSR3/sortiline dans les boucles autocrines de survie impliquant le BDNF et la NTS au cours de la LLC *ii)* déterminer son rôle dans la régulation du trafic-intracellulaire notamment dans la sécrétion et le transport du BDNF et la localisation des récepteurs Trks et NTSRs.

Enfin, le profil de surexpression de NTSR2, ne semble pas dépendre des facteurs pronostiques déjà connus dans la pathologie, telles que la délétion du gène *P53*, la mutation *IGHV*, la délétion 13q14 et l'expression de CD38. Il restera à déterminer si cette surexpression est la conséquence d'une modification épigénétique du promoteur du gène de *NTSR2*, telle que la méthylation, qui serait impliquée dans le recrutement de facteurs de transcription. Ainsi, il conviendra de rechercher une hypométhylation du promoteur de *NTSR2* et les facteurs de transcription impliqués dans son activation.

Ces perspectives pourraient permettre d'identifier de nouveaux mécanismes associés à la résistance à l'apoptose des lymphocytes B au cours de la LLC et d'orienter ainsi vers de nouvelles voies de recherche thérapeutique.



Références bibliographiques





Références bibliographiques

- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 745–756.
- Akekawatchai, C., Holland, J.D., Kochetkova, M., Wallace, J.C., and McColl, S.R. (2005). Transactivation of CXCR4 by the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in human MDA-MB-231 breast cancer epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 39701–39708.
- Akil, H., Perraud, A., Mélin, C., Jauberteau, M.-O., and Mathonnet, M. (2011). Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PLoS One* *6*, e25097.
- Akter, H., Park, M., Kwon, O.-S., Song, E.J., Park, W.-S., and Kang, M.-J. (2015). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by neurotensin promotes cell invasion and migration through ERK pathway in gastric cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *36*, 6053–6062.
- Alexander, M.J., Miller, M.A., Dorsa, D.M., Bullock, B.P., Melloni, R.H., Dobner, P.R., and Leeman, S.E. (1989). Distribution of neurotensin/neuromedin N mRNA in rat forebrain: unexpected abundance in hippocampus and subiculum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 5202–5206.
- Alifano, M., Souazé, F., Dupouy, S., Camilleri-Broët, S., Younes, M., Ahmed-Zaïd, S.-M., Takahashi, T., Cancellieri, A., Damiani, S., Boaron, M., et al. (2010). Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 4401–4410.
- Allen, J., Khwaja, F., Byers, S., and Djakiew, D. (2005). The p75^{NTR} mediates a bifurcated signal transduction cascade through the NF kappa B and JNK pathways to inhibit cell survival. *Exp. Cell Res.* *304*, 69–80.
- Almeida, R.D., and Duarte, C.B. (2014). p75^{NTR} Processing and Signaling: Functional Role. In *Handbook of Neurotoxicity*, R.M. Kostrzewa, ed. (Springer New York), pp. 1899–1923.
- Almenoff, J., Wilk, S., and Orlowski, M. (1981). Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *102*, 206–214.
- Amar, S., Mazella, J., Checler, F., Kitabgi, P., and Vincent, J.P. (1985). Regulation of cyclic GMP levels by neurotensin in neuroblastoma clone N1E115. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *129*, 117–125.
- Amar, S., Kitabgi, P., and Vincent, J.P. (1987). Stimulation of inositol phosphate production by neurotensin in neuroblastoma N1E115 cells: implication of GTP-binding proteins and relationship with the cyclic GMP response. *J. Neurochem.* *49*, 999–1006.
- Amaya-Chanaga, C.I., and Rassenti, L.Z. (2016). Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* *29*, 79–89.
- Al-Ameri, A.M., Badoux, X., Ferrajoli, A., Wierda, W.G., Fayad, L., Estrov, Z., Bickel, S., Keating, M.J., and O'Brien, S. (2010). Phase II Study of Dasatinib In Patients with Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* *116*, 4488–4488.



- Amorino, G.P., Deeble, P.D., and Parsons, S.J. (2007). Neurotensin stimulates mitogenesis of prostate cancer cells through a novel c-Src/Stat5b pathway. *Oncogene* 26, 745–756.
- Anaissie, E.J., Kontoyiannis, D.P., O'Brien, S., Kantarjian, H., Robertson, L., Lerner, S., and Keating, M.J. (1998). Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Ann. Intern. Med.* 129, 559–566.
- Arévalo, J.C., and Wu, S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 1523–1537.
- Arevalo, J.C., Conde, B., Hempstead, B.L., Chao, M.V., Martín-Zanca, D., and Perez, P. (2000). TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5908–5916.
- Arevalo, J.C., Conde, B., Hempstead, B.L., Chao, M.V., Martín-Zanca, D., and Pérez, P. (2001). A novel mutation within the extracellular domain of TrkA causes constitutive receptor activation. *Oncogene* 20, 1229–1234.
- Arévalo, J.C., Yano, H., Teng, K.K., and Chao, M.V. (2004). A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *EMBO J.* 23, 2358–2368.
- Armugam, A., Koh, D.C.I., Ching, C.S., Chandrasekaran, K., Kaur, P., and Jeyaseelan, K. (2012). Pro-domain in precursor nerve growth factor mediates cell death. *Neurochem. Int.* 60, 852–863.
- Arruga, F., and Deaglio, S. (2017). Mechanisms of Resistance to Targeted Therapies in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Handb. Exp. Pharmacol.*
- Atoji, Y., Yamamoto, Y., and Suzuki, Y. (1996). Neurotensin-containing endocrine cells and neurotensin receptor mRNA-expressing epithelial cells in the chicken thymus. *Arch. Histol. Cytol.* 59, 197–203.
- Atwal, J.K., Massie, B., Miller, F.D., and Kaplan, D.R. (2000). The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* 27, 265–277.
- Audrito, V., Vaisitti, T., Serra, S., Bologna, C., Brusa, D., Malavasi, F., and Deaglio, S. (2013). Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia offers novel therapeutic options. *Cancer Lett.* 328, 27–35.
- Aurran-Schleinitz, T., Arnoulet, C., Ivanov, V., Coso, D., Rey, J., Schiano, J.-M., Stoppa, A.-M., Bouabdallah, R., and Gastaut, J.-A. (2008). [Chronic lymphocytic leukaemia: current management]. *Rev. Med. Interne* 29, 424–435.
- Austen, B., Skowronska, A., Baker, C., Powell, J.E., Gardiner, A., Oscier, D., Majid, A., Dyer, M., Siebert, R., Taylor, A.M., et al. (2007). Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 5448–5457.
- Van der Auwera, I., Yu, W., Suo, L., Van Neste, L., van Dam, P., Van Marck, E.A., Pauwels, P., Vermeulen, P.B., Dirix, L.Y., and Van Laere, S.J. (2010). Array-based DNA methylation profiling for breast cancer subtype discrimination. *PloS One* 5, e12616.
- Avalos, A.M., Meyer-Wentrup, F., and Ploegh, H.L. (2014). B-cell receptor signaling in lymphoid malignancies and autoimmunity. *Adv. Immunol.* 123, 1–49.



Avet-Loiseau, H., Li, J.Y., Facon, T., Brigaudeau, C., Morineau, N., Maloisel, F., Rapp, M.J., Talmant, P., Trimoreau, F., Jaccard, A., et al. (1998). High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res.* *58*, 5640–5645.

Ayala-Sarmiento, A.E., Martinez-Fong, D., and Segovia, J. (2015). The Internalization of Neurotensin by the Low-Affinity Neurotensin Receptors (NTSR2 and vNTSR2) Activates ERK 1/2 in Glioma Cells and Allows Neurotensin-Polyplex Transfection of tGAS1. *Cell. Mol. Neurobiol.* *35*, 785–795.

Bai, B., Cai, X., Jiang, Y., Karteris, E., and Chen, J. (2014). Heterodimerization of apelin receptor and neurotensin receptor 1 induces phosphorylation of ERK(1/2) and cell proliferation via Gαq-mediated mechanism. *J. Cell. Mol. Med.* *18*, 2071–2081.

Bakirtzi, K., Hatzia Apostolou, M., Karagiannides, I., Polytarchou, C., Jaeger, S., Iliopoulos, D., and Pothoulakis, C. (2011). Neurotensin signaling activates microRNAs-21 and -155 and Akt, promotes tumor growth in mice, and is increased in human colon tumors. *Gastroenterology* *141*, 1749–1761.e1.

Balakrishnan, K., Burger, J.A., Wierda, W.G., and Gandhi, V. (2009). AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood* *113*, 149–153.

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

Barelli, H., Mao, Y.K., Vincent, B., Daniel, E.E., Vincent, J.P., and Checler, F. (1993). Differential catabolic fate of neuromedin N and neurotensin in the canine intestinal mucosa. *Peptides* *14*, 457–463.

Barelli, H., Fox-Threlkeld, J.E., Dive, V., Daniel, E.E., Vincent, J.P., and Checler, F. (1994). Role of endopeptidase 3.4.24.16 in the catabolism of neurotensin, in vivo, in the vascularly perfused dog ileum. *Br. J. Pharmacol.* *112*, 127–132.

Barker, P.A. (2009). Whither proBDNF? *Nat. Neurosci.* *12*, 105–106.

Barker, P.A., Lomen-Hoerth, C., Gensch, E.M., Meakin, S.O., Glass, D.J., and Shooter, E.M. (1993). Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J. Biol. Chem.* *268*, 15150–15157.

Barker, P.A., Barbee, G., Misko, T.P., and Shooter, E.M. (1994). The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *J. Biol. Chem.* *269*, 30645–30650.

Barragán, M., Bellosillo, B., Campàs, C., Colomer, D., Pons, G., and Gil, J. (2002). Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* *99*, 2969–2976.

Barrientos, J.C. (2016). Sequencing of chronic lymphocytic leukemia therapies. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* *2016*, 128–136.

Baumann, T., Delgado, J., Santacruz, R., Martínez-Trillos, A., Royo, C., Navarro, A., Pinyol, M., Rozman, M., Pereira, A., Villamor, N., et al. (2014). Chronic lymphocytic leukemia in the elderly: clinico-biological features, outcomes, and proposal of a prognostic model. *Haematologica* *99*, 1599–1604.



Baxendale, I.R., Cheung, S., Kitching, M.O., Ley, S.V., and Shearman, J.W. (2013). The synthesis of neurotensin antagonist SR 48692 for prostate cancer research. *Bioorg. Med. Chem.* *21*, 4378–4387.

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

Bean, A.J., Dagerlind, A., Hökfelt, T., and Dobner, P.R. (1992). Cloning of human neurotensin/neuromedin N genomic sequences and expression in the ventral mesencephalon of schizophrenics and age/sex matched controls. *Neuroscience* *50*, 259–268.

Beers, S.A., French, R.R., Chan, H.T.C., Lim, S.H., Jarrett, T.C., Vidal, R.M., Wijayaweera, S.S., Dixon, S.V., Kim, H., Cox, K.L., et al. (2010). Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* *115*, 5191–5201.

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

Béraud-Dufour, S., Coppola, T., Massa, F., and Mazella, J. (2009). Neurotensin receptor-2 and -3 are crucial for the anti-apoptotic effect of neurotensin on pancreatic beta-TC3 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 2398–2402.

Bergman, E., Ulfhake, B., and Fundin, B.T. (2000). Regulation of NGF-family ligands and receptors in adulthood and senescence: correlation to degenerative and regenerative changes in cutaneous innervation. *Eur. J. Neurosci.* *12*, 2694–2706.

Berkemeier, L.R., Winslow, J.W., Kaplan, D.R., Nikolics, K., Goeddel, D.V., and Rosenthal, A. (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* *7*, 857–866.

Bernal, A., Pastore, R.D., Asgary, Z., Keller, S.A., Cesarman, E., Liou, H.C., and Schattner, E.J. (2001). Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* *98*, 3050–3057.

Berndt, S.I., Skibola, C.F., Joseph, V., Camp, N.J., Nieters, A., Wang, Z., Cozen, W., Monnereau, A., Wang, S.S., Kelly, R.S., et al. (2013). Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* *45*, 868–876.

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

Betancur, C., Canton, M., Burgos, A., Labeeuw, B., Gully, D., Rostène, W., and Pélaprat, D. (1998). Characterization of binding sites of a new neurotensin receptor antagonist, [3H]SR 142948A, in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* *343*, 67–77.

Beutel, G., Meyer, J., Ma, L., Yin, S., Eder, M., von Neuhoff, N., Wilkens, L., Wei, J., Hertenstein, B., Heil, G., et al. (2005). Expression of the p75 neurotrophin receptor in acute leukaemia. *Br. J. Haematol.* *131*, 67–70.



- Biffo, S., Offenhäuser, N., Carter, B.D., and Barde, Y.A. (1995). Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Dev. Camb. Engl.* *121*, 2461–2470.
- Bilderback, T.R., Gazula, V.R., Lisanti, M.P., and Dobrowsky, R.T. (1999). Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J. Biol. Chem.* *274*, 257–263.
- Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., et al. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* *48*, 198–206.
- Biscardi, J.S., Maa, M.C., Tice, D.A., Cox, M.E., Leu, T.H., and Parsons, S.J. (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J. Biol. Chem.* *274*, 8335–8343.
- Boggs, D.R., Chen, S.C., Zhang, Z.N., and Zhang, A. (1987). Chronic lymphocytic leukemia in China. *Am. J. Hematol.* *25*, 349–354.
- Botto, J.M., Chabry, J., Nouel, D., Paquet, M., Séguéla, P., Vincent, J.P., Beaudet, A., and Mazella, J. (1997a). Identification in the rat neurotensin receptor of amino-acid residues critical for the binding of neurotensin. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *46*, 311–317.
- Botto, J.M., Guillemare, E., Vincent, J.P., and Mazella, J. (1997b). Effects of SR 48692 on neurotensin-induced calcium-activated chloride currents in the *Xenopus* oocyte expression system: agonist-like activity on the levocabastine-sensitive neurotensin receptor and absence of antagonist effect on the levocabastine insensitive neurotensin receptor. *Neurosci. Lett.* *223*, 193–196.
- Botto, J.M., Chabry, J., Sarret, P., Vincent, J.P., and Mazella, J. (1998). Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *243*, 585–590.
- Boudin, H., Pélaprat, D., Rostène, W., and Beaudet, A. (1996). Cellular distribution of neurotensin receptors in rat brain: immunohistochemical study using an antipeptide antibody against the cloned high affinity receptor. *J. Comp. Neurol.* *373*, 76–89.
- Boudin, H., Lazaroff, B., Bachelet, C.M., Pélaprat, D., Rostène, W., and Beaudet, A. (2000). Immunologic differentiation of two high-affinity neurotensin receptor isoforms in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* *425*, 45–57.
- Boules, M., Li, Z., Smith, K., Fredrickson, P., and Richelson, E. (2013). Diverse roles of neurotensin agonists in the central nervous system. *Front. Endocrinol.* *4*, 36.
- Bouley, J., Deriano, L., Delic, J., and Merle-Béral, H. (2006). New molecular markers in resistant B-CLL. *Leuk. Lymphoma* *47*, 791–801.
- Bozou, J.C., Amar, S., Vincent, J.P., and Kitabgi, P. (1986). Neurotensin-mediated inhibition of cyclic AMP formation in neuroblastoma N1E115 cells: involvement of the inhibitory GTP-binding component of adenylate cyclase. *Mol. Pharmacol.* *29*, 489–496.
- Bozzola, M., Thome, A.N., Giraldi, E., Lhiaubet, A.M., and Schimpff, R.M. (1998). Plasma neurotensin levels in prepubertal children and adults: possible involvement in the regulation of growth hormone secretion. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* *11*, 615–621.



- Bradshaw, R.A., Pundavela, J., Biarc, J., Chalkley, R.J., Burlingame, A.L., and Hondermarck, H. (2015). NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling. *Adv. Biol. Regul.* *58*, 16–27.
- Breitschopf, K., Haendeler, J., Malchow, P., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2000). Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1886–1896.
- Breuzza, L., Garcia, M., Delgrossi, M.-H., and Le Bivic, A. (2002). Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp. Cell Res.* *273*, 178–186.
- Brodeur, G.M., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Iyer, R., Varela, C.R., Light, J.E., Kolla, V., and Evans, A.E. (2009). Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 3244–3250.
- Bronfman, F.C. (2007). Metalloproteases and gamma-secretase: new membrane partners regulating p75 neurotrophin receptor signaling? *J. Neurochem.* *103 Suppl 1*, 91–100.
- Bronfman, F.C., and Fainzilber, M. (2004). Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep.* *5*, 867–871.
- Brown, J.R., Byrd, J.C., Coutre, S.E., Benson, D.M., Flinn, I.W., Wagner-Johnston, N.D., Spurgeon, S.E., Kahl, B.S., Bello, C., Webb, H.K., et al. (2014). Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *123*, 3390–3397.
- Brown, J.R., Tesar, B., Yu, L., Werner, L., Takebe, N., Mikler, E., Reynolds, H.M., Thompson, C., Fisher, D.C., Neuberg, D., et al. (2015). Obatocicax in combination with fludarabine and rituximab is well-tolerated and shows promising clinical activity in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* *56*, 3336–3342.
- Brun, P., Mastrotto, C., Beggiao, E., Stefani, A., Barzon, L., Sturniolo, G.C., Palù, G., and Castagliuolo, I. (2005). Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *288*, G621–G629.
- Brusa, D., Serra, S., Coscia, M., Rossi, D., D’Arena, G., Laurenti, L., Jaksic, O., Fedele, G., Inghirami, G., Gaidano, G., et al. (2013). The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* *98*, 953–963.
- Budni, J., Bellettini-Santos, T., Mina, F., Garcez, M.L., and Zugno, A.I. (2015). The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer’s disease. *Aging Dis.* *6*, 331–341.
- Bugni, J.M., and Pothoulakis, C. (2013). Neurotensin. *Handb. Biol. Act. Pept.* 1265–1270.
- Bugni, J.M., Al-Rabadi, L., Jubbal, K., Karagiannides, I., Lawson, G., and Pothoulakis, C. (2012). The neurotensin receptor-1 promotes tumor development in a sporadic but not an inflammation-associated mouse model of colon cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *130*, 1798–1805.
- Bunone, G., Mariotti, A., Compagni, A., Morandi, E., and Della Valle, G. (1997). Induction of apoptosis by p75 neurotrophin receptor in human neuroblastoma cells. *Oncogene* *14*, 1463–1470.



- Burger, J.A., Burger, M., and Kipps, T.J. (1999). Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* *94*, 3658–3667.
- Bürgi, B., Otten, U.H., Ochensberger, B., Rihs, S., Heese, K., Ehrhard, P.B., Ibanez, C.F., and Dahinden, C.A. (1996). Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor. *J. Immunol. Baltim. Md* *157*, 5582–5588.
- Byrd, J.C., Blum, K.A., Burger, J.A., Coutre, S.E., Sharman, J.P., Furman, R.R., Flinn, I.W., Grant, B.W., Richards, D.A., Zhao, W., et al. (2011). Activity and tolerability of the Bruton's tyrosine kinase (Btk) inhibitor PCI-32765 in patients with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL): Interim results of a phase Ib/II study. *J. Clin. Oncol.* *29*, 6508–6508.
- Byrd, J.C., Harrington, B., O'Brien, S., Jones, J.A., Schuh, A., Devereux, S., Chaves, J., Wierda, W.G., Awan, F.T., Brown, J.R., et al. (2016). Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* *374*, 323–332.
- Caligaris-Cappio, F. (2003). Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* *123*, 380–388.
- Caligaris-Cappio, F., and Hamblin, T.J. (1999). B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Bird of a Different Feather. *J. Clin. Oncol.* *17*, 399–399.
- Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., et al. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *353*, 1793–1801.
- Calissano, C., Damle, R.N., Hayes, G., Murphy, E.J., Hellerstein, M.K., Moreno, C., Sison, C., Kaufman, M.S., Kolitz, J.E., Allen, S.L., et al. (2009). In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *114*, 4832–4842.
- Capalbo, S., Trerotoli, P., Ciancio, A., Battista, C., Serio, G., and Liso, V. (2000). Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage. *Eur. J. Haematol.* *65*, 114–117.
- Caroleo, M.C., Costa, N., Bracci-Laudiero, L., and Aloe, L. (2001). Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. *J. Neuroimmunol.* *113*, 193–201.
- Carraway, R., and Bhatnagar, Y.M. (1980). Immunochemical characterization of neurotensin-like peptides in chicken. *Peptides* *1*, 159–165.
- Carraway, R.E., and Mitra, S.P. (1987). The use of radioimmunoassay to compare the tissue and subcellular distributions of neurotensin and neuromedin N in the cat. *Endocrinology* *120*, 2092–2100.
- Carraway, R., and Leeman, S.E. (1973). The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J. Biol. Chem.* *248*, 6854–6861.
- Carraway, R., and Leeman, S.E. (1975). The amino acid sequence of a hypothalamic peptide, neurotensin. *J. Biol. Chem.* *250*, 1907–1911.



- Carraway, R., and Leeman, S.E. (1976). Characterization of radioimmunoassayable neurotensin in the rat. Its differential distribution in the central nervous system, small intestine, and stomach. *J. Biol. Chem.* *251*, 7045–7052.
- Carraway, R.E., Mitra, S.P., and Paradise, C. (1991). Characterization of large neuromedin-N using antisera towards regions of the neurotensin/neuromedin-N precursor. *Peptides* *12*, 601–607.
- Carraway, R.E., Mitra, S.P., and Joyce, T.J. (1993). Tissue-specific processing of neurotensin/neuromedin-N precursor in cat. *Regul. Pept.* *43*, 97–106.
- Carter, B.D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhäuser, N., Böhm-Matthaei, R., Baeuerle, P.A., and Barde, Y.A. (1996). Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* *272*, 542–545.
- Casaccia-Bonofil, P., Gu, C., and Chao, M.V. (1999a). Neurotrophins in cell survival/death decisions. *Adv. Exp. Med. Biol.* *468*, 275–282.
- Casaccia-Bonofil, P., Gu, C., Khursigara, G., and Chao, M.V. (1999b). p75 neurotrophin receptor as a modulator of survival and death decisions. *Microsc. Res. Tech.* *45*, 217–224.
- Casademunt, E., Carter, B.D., Benzel, I., Frade, J.M., Dechant, G., and Barde, Y.A. (1999). The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J.* *18*, 6050–6061.
- Cassaday, R.D., Storer, B.E., Sorrow, M.L., Sandmaier, B.M., Guthrie, K.A., Maloney, D.G., Rajendran, J.G., Pagel, J.M., Flowers, M.E., Green, D.J., et al. (2015). Long-term outcomes of patients with persistent indolent B cell malignancies undergoing nonmyeloablative allogeneic transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *21*, 281–287.
- Cassiman, D., Deneff, C., Desmet, V.J., and Roskams, T. (2001). Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatol. Baltim. Md* *33*, 148–158.
- Castagliuolo, I., Wang, C.C., Valenick, L., Pasha, A., Nikulasson, S., Carraway, R.E., and Pothoulakis, C. (1999). Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. *J. Clin. Invest.* *103*, 843–849.
- Cattaneo, F., Guerra, G., Parisi, M., De Marinis, M., Tafuri, D., Cinelli, M., and Ammendola, R. (2014). Cell-surface receptors transactivation mediated by g protein-coupled receptors. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 19700–19728.
- Chabry, J., Labbé-Jullié, C., Gully, D., Kitabgi, P., Vincent, J.P., and Mazella, J. (1994). Stable expression of the cloned rat brain neurotensin receptor into fibroblasts: binding properties, photoaffinity labeling, transduction mechanisms, and internalization. *J. Neurochem.* *63*, 19–27.
- Chabry, J., Botto, J.M., Nouel, D., Beaudet, A., Vincent, J.P., and Mazella, J. (1995). Thr-422 and Tyr-424 residues in the carboxyl terminus are critical for the internalization of the rat neurotensin receptor. *J. Biol. Chem.* *270*, 2439–2442.
- Chalon, P., Vita, N., Kaghad, M., Guillemot, M., Bonnin, J., Delpech, B., Le Fur, G., Ferrara, P., and Caput, D. (1996). Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett.* *386*, 91–94.



- Chanan-Khan, A., Miller, K.C., Musial, L., Lawrence, D., Padmanabhan, S., Takeshita, K., Porter, C.W., Goodrich, D.W., Bernstein, Z.P., Wallace, P., et al. (2006). Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *24*, 5343–5349.
- Chang, M.-S., Arevalo, J.C., and Chao, M.V. (2004). Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J. Neurosci. Res.* *78*, 186–192.
- Chao, M.V. (2003a). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 299–309.
- Chao, M.V. (2003b). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 299–309.
- Chao, D.T., and Korsmeyer, S.J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* *16*, 395–419.
- Chao, M.V., Bothwell, M.A., Ross, A.H., Koprowski, H., Lanahan, A.A., Buck, C.R., and Sehgal, A. (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* *232*, 518–521.
- Chapiro, E., Radford-Weiss, I., Bastard, C., Luquet, I., Lefebvre, C., Callet-Bauchu, E., Leroux, D., Talmant, P., Mozziconacci, M.-J., Mugneret, F., et al. (2008). The most frequent t(14;19)(q32;q13)-positive B-cell malignancy corresponds to an aggressive subgroup of atypical chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *22*, 2123–2127.
- Chapiro, E., Leporrier, N., Radford-Weiss, I., Bastard, C., Mossafa, H., Leroux, D., Tigaud, I., De Braekeleer, M., Terré, C., Brizard, F., et al. (2010). Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk. Res.* *34*, 63–68.
- Checler, F., Vincent, J.P., and Kitabgi, P. (1986). Purification and characterization of a novel neurotensin-degrading peptidase from rat brain synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* *261*, 11274–11281.
- Checler, F., Barelli, H., Kitabgi, P., and Vincent, J.P. (1988). Neurotensin metabolism in various tissues of central and peripheral origins: ubiquitous involvement of a novel neurotensin degrading metalloendopeptidase. *Biochimie* *70*, 75–82.
- Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K.R., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2002). Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *100*, 4609–4614.
- Chen, Z.-Y., Ieraci, A., Teng, H., Dall, H., Meng, C.-X., Herrera, D.G., Nykjaer, A., Hempstead, B.L., and Lee, F.S. (2005). Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 6156–6166.
- Cheson, B.D. (2010). Monoclonal antibody therapy of chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* *23*, 133–143.
- Chiorazzi, N., and Ferrarini, M. (2011). Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* *117*, 1781–1791.
- Chiorazzi, N., Rai, K.R., and Ferrarini, M. (2005). Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* *352*, 804–815.



- Chittka, A., Arevalo, J.C., Rodriguez-Guzman, M., Pérez, P., Chao, M.V., and Sendtner, M. (2004). The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J. Cell Biol.* *164*, 985–996.
- Choi, M.Y., Kashyap, M.K., and Kumar, D. (2016). The chronic lymphocytic leukemia microenvironment: Beyond the B-cell receptor. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* *29*, 40–53.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13944–13949.
- Ciriaco, E., Dall'Aglio, C., Hannestad, J., Huerta, J.J., Laurà, R., Germanà, G., and Vega, J.A. (1996). Localization of Trk neurotrophin receptor-like proteins in avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *J. Neuroimmunol.* *69*, 73–83.
- Ciriello, J., Caverson, M.M., Calaresu, F.R., and Krukoff, T.L. (1988). Neuropeptide and serotonin immunoreactive neurons in the cat ventrolateral medulla. *Brain Res.* *440*, 53–66.
- Clary, D.O., and Reichardt, L.F. (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 11133–11137.
- Clewes, O., Fahey, M.S., Tyler, S.J., Watson, J.J., Seok, H., Catania, C., Cho, K., Dawbarn, D., and Allen, S.J. (2008). Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin. *J. Neurochem.* *107*, 1124–1135.
- Clineschmidt, B.V., McGuffin, J.C., and Bunting, P.B. (1979). Neurotensin: antinociceptive action in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* *54*, 129–139.
- Cochrane, D.E., Carraway, R.E., Harrington, K., Laudano, M., Rawlings, S., and Feldberg, R.S. (2011). HMC-1 human mast cells synthesize neurotensin (NT) precursor, secrete bioactive NT-like peptide(s) and express NT receptor NTS1. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* *60*, 1139–1151.
- Cohen, S. (1960). PURIFICATION OF A NERVE-GROWTH PROMOTING PROTEIN FROM THE MOUSE SALIVARY GLAND AND ITS NEURO-CYTOTOXIC ANTISERUM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *46*, 302–311.
- Cooper, P.E., Fernstrom, M.H., Rorstad, O.P., Leeman, S.E., and Martin, J.B. (1981). The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res.* *218*, 219–232.
- Corbit, K.C., Foster, D.A., and Rosner, M.R. (1999). Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 4209–4218.
- Cosson, A., Chapiro, E., Bougacha, N., Lambert, J., Herbi, L., Cung, H.-A., Algrin, C., Keren, B., Damm, F., Gabillaud, C., et al. (2017). Gain in the short arm of chromosome 2 (2p+) induces gene overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: analysis of the central role of XPO1. *Leukemia* *31*, 1625–1629.
- Coulson, E.J., Reid, K., Baca, M., Shipham, K.A., Hulett, S.M., Kilpatrick, T.J., and Bartlett, P.F. (2000). Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J. Biol. Chem.* *275*, 30537–30545.



- Cowen, T., and Gavazzi, I. (1998). Plasticity in adult and ageing sympathetic neurons. *Prog. Neurobiol.* *54*, 249–288.
- Cragg, M.S., Walshe, C.A., Ivanov, A.O., and Glennie, M.J. (2005). The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr. Dir. Autoimmun.* *8*, 140–174.
- Craig, R.W. (2002). MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* *16*, 444–454.
- Cramer, P., and Hallek, M. (2011). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *8*, 38–47.
- Cramer, P., Langerbeins, P., Eichhorst, B., and Hallek, M. (2016). Advances in first-line treatment of chronic lymphocytic leukemia: current recommendations on management and first-line treatment by the German CLL Study Group (GCLLSG). *Eur. J. Haematol.* *96*, 9–18.
- Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marcé, S., López-Guillermo, A., Campo, E., and Montserrat, E. (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *348*, 1764–1775.
- Cui, B., Ghia, E.M., Chen, L., Rassenti, L.Z., DeBoever, C., Widhopf, G.F., Yu, J., Neuberg, D.S., Wierda, W.G., Rai, K.R., et al. (2016). High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *128*, 2931–2940.
- Cuneo, A., Rigolin, G.M., Bigoni, R., De Angeli, C., Veronese, A., Cavazzini, F., Bardi, A., Roberti, M.G., Tammiso, E., Agostini, P., et al. (2004). Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* *18*, 476–483.
- Cuní, S., Pérez-Aciego, P., Pérez-Chacón, G., Vargas, J.A., Sánchez, A., Martín-Saavedra, F.M., Ballester, S., García-Marco, J., Jordá, J., and Durántez, A. (2004). A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* *18*, 1391–1400.
- Dalwadi, H., Wei, B., Schrage, M., Spicher, K., Su, T.T., Birnbaumer, L., Rawlings, D.J., and Braun, J. (2003). B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 1707–1715.
- Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., et al. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *94*, 1840–1847.
- Damle, R.N., Temburni, S., Calissano, C., Yancopoulos, S., Banapour, T., Sison, C., Allen, S.L., Rai, K.R., and Chiorazzi, N. (2007). CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood* *110*, 3352–3359.
- D’Arena, G., and Musto, P. (2014). Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Transl. Med. UniSa* *8*, 75–79.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* *91*, 231–241.
- Dauch, P., Vincent, J.P., and Checler, F. (1995). Molecular cloning and expression of rat brain endopeptidase 3.4.24.16. *J. Biol. Chem.* *270*, 27266–27271.



- Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M., and Alessi, D.R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* *17*, 4426–4441.
- Debaigt, C., Hirling, H., Steiner, P., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2004). Crucial role of neuron-enriched endosomal protein of 21 kDa in sorting between degradation and recycling of internalized G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* *279*, 35687–35691.
- Dechant, G. (2001). Molecular interactions between neurotrophin receptors. *Cell Tissue Res.* *305*, 229–238.
- Dechant, G., and Barde, Y.A. (1997). Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.* *7*, 413–418.
- Deinhardt, K., and Chao, M.V. (2014). Trk receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* *220*, 103–119.
- Delcourt, N., Bockaert, J., and Marin, P. (2007a). GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol. Sci.* *28*, 602–607.
- Delcourt, N., Thouvenot, E., Chanrion, B., Galéotti, N., Jouin, P., Bockaert, J., and Marin, P. (2007b). PACAP type I receptor transactivation is essential for IGF-1 receptor signalling and antiapoptotic activity in neurons. *EMBO J.* *26*, 1542–1551.
- Delgado, J., Pratt, G., Phillips, N., Briones, J., Fegan, C., Nomdedeu, J., Pepper, C., Aventin, A., Ayats, R., Brunet, S., et al. (2009). Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *Br. J. Haematol.* *145*, 801–805.
- Demont, Y., Corbet, C., Page, A., Ataman-Önal, Y., Choquet-Kastylevsky, G., Fliniaux, I., Le Bourhis, X., Toillon, R.-A., Bradshaw, R.A., and Hondermarck, H. (2012). Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein. *J. Biol. Chem.* *287*, 1923–1931.
- Dicou, E., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2004). Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *J. Neurosci. Res.* *78*, 92–99.
- Dighiero, G., and Hamblin, T.J. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet* *371*, 1017–1029.
- Dighiero, G., Maloum, K., Desablens, B., Cazin, B., Navarro, M., Leblay, R., Leparrier, M., Jaubert, J., Lepeu, G., Dreyfus, B., et al. (1998). Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* *338*, 1506–1514.
- DiStefano, P.S., Chelsea, D.M., Schick, C.M., and McKelvy, J.F. (1993). Involvement of a metalloprotease in low-affinity nerve growth factor receptor truncation: inhibition of truncation in vitro and in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *13*, 2405–2414.
- Dobner, P.R. (2005). Multitasking with neurotensin in the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *62*, 1946–1963.
- Dobner, P.R. (2006). Neurotensin and pain modulation. *Peptides* *27*, 2405–2414.



- Dobner, P.R., Barber, D.L., Villa-Komaroff, L., and McKiernan, C. (1987). Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 3516–3520.
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., James, M.R., Benner, A., Weilguni, T., Bentz, M., Fischer, K., Hunstein, W., and Lichter, P. (1997). 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* *89*, 2516–2522.
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., and Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *343*, 1910–1916.
- Domeniconi, M., and Chao, M.V. (2010). Transactivation of Trk receptors in spinal motor neurons. *Histol. Histopathol.* *25*, 1207–1213.
- Dong, Z., Wang, X., Zhao, Q., Townsend, C.M., and Evers, B.M. (1998). DNA methylation contributes to expression of the human neurotensin/neuromedin N gene. *Am. J. Physiol.* *274*, G535–G543.
- Dong, Z., Wang, X., and Evers, B.M. (2000). Site-specific DNA methylation contributes to neurotensin/neuromedin N expression in colon cancers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *279*, G1139–G1147.
- Dong, Z., Lei, Q., Yang, R., Zhu, S., Ke, X.-X., Yang, L., Cui, H., and Yi, L. (2017). Inhibition of neurotensin receptor 1 induces intrinsic apoptosis via let-7a-3p/Bcl-w axis in glioblastoma. *Br. J. Cancer* *116*, 1572–1584.
- D’Onofrio, M., de Grazia, U., Morrone, S., Cuomo, L., Spinsanti, P., Frati, L., Gulino, A., and Ragona, G. (2000). Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes. *Eur. Cytokine Netw.* *11*, 283–291.
- Dorsam, R.T., and Gutkind, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 79–94.
- Dreger, P., Corradini, P., Kimby, E., Michallet, M., Milligan, D., Schetelig, J., Wiktor-Jedrzejczak, W., Niederwieser, D., Hallek, M., Montserrat, E., et al. (2007). Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* *21*, 12–17.
- Dreger, P., Schnaiter, A., Zenz, T., Böttcher, S., Rossi, M., Paschka, P., Bühler, A., Dietrich, S., Busch, R., Ritgen, M., et al. (2013). TP53, SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome of allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood* *121*, 3284–3288.
- Drost, A.C., Seitz, G., Boehmler, A., Funk, M., Norz, K.P., Zipfel, A., Xue, X., Kanz, L., and Möhle, R. (2012). The G protein-coupled receptor CysLT1 mediates chemokine-like effects and prolongs survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* *53*, 665–673.
- Dubonet, L., Bentayeb, H., Petit, B., Olivrie, A., Saada, S., de la Cruz-Morcillo, M.A., Lalloué, F., Gourin, M.-P., Bordessoule, D., Faumont, N., et al. (2015). Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *Br. J. Cancer* *113*, 934–944.



Dubuc, I., Costentin, J., Terranova, J.P., Barnouin, M.C., Soubrié, P., Le Fur, G., Rostène, W., and Kitabgi, P. (1994). The nonpeptide neurotensin antagonist, SR 48692, used as a tool to reveal putative neurotensin receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.* *112*, 352–354.

Dubuc, I., Sarret, P., Labbé-Jullié, C., Botto, J.M., Honoré, E., Bourdel, E., Martinez, J., Costentin, J., Vincent, J.P., Kitabgi, P., et al. (1999). Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 503–510.

Dupouy, S., Mourra, N., Doan, V.K., Gompel, A., Alifano, M., and Forgez, P. (2011). The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie* *93*, 1369–1378.

Dupouy, S., Doan, V.K., Wu, Z., Mourra, N., Liu, J., De Wever, O., Llorca, F.P., Cayre, A., Kouchkar, A., Gompel, A., et al. (2014). Activation of EGFR, HER2 and HER3 by neurotensin/neurotensin receptor 1 renders breast tumors aggressive yet highly responsive to lapatinib and metformin in mice. *Oncotarget* *5*, 8235–8251.

Dürig, J., Dührsen, U., Klein-Hitpass, L., Worm, J., Hansen, J.B.R., Ørum, H., and Wissenbach, M. (2011). The novel antisense Bcl-2 inhibitor SPC2996 causes rapid leukemic cell clearance and immune activation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *25*, 638–647.

Dyer, M.J., Zani, V.J., Lu, W.Z., O'Byrne, A., Mould, S., Chapman, R., Heward, J.M., Kayano, H., Jadayel, D., and Matutes, E. (1994). BCL2 translocations in leukemias of mature B cells. *Blood* *83*, 3682–3688.

Edelmann, J., Holzmann, K., Miller, F., Winkler, D., Bühler, A., Zenz, T., Bullinger, L., Kühn, M.W.M., Gerhardinger, A., Bloehdorn, J., et al. (2012). High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood* *120*, 4783–4794.

Eggert, A., Sieverts, H., Ikegaki, N., and Brodeur, G.M. (2000). p75 mediated apoptosis in neuroblastoma cells is inhibited by expression of TrkA. *Med. Pediatr. Oncol.* *35*, 573–576.

Ehlers, R.A., Bonnor, R.M., Wang, X., Hellmich, M.R., and Evers, B.M. (1998). Signal transduction mechanisms in neurotensin-mediated cellular regulation. *Surgery* *124*, 239–246; discussion 246–247.

Ehrhard, P.B., Erb, P., Graumann, U., and Otten, U. (1993). Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 10984–10988.

Eichhorst, B., Fink, A.-M., Bahlo, J., Busch, R., Kovacs, G., Maurer, C., Lange, E., Köppler, H., Kiehl, M., Sökler, M., et al. (2016). First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* *17*, 928–942.

Einsiedel, J., Held, C., Hervet, M., Plomer, M., Tschammer, N., Hübner, H., and Gmeiner, P. (2011). Discovery of highly potent and neurotensin receptor 2 selective neurotensin mimetics. *J. Med. Chem.* *54*, 2915–2923.



- Elde, R., Schalling, M., Ceccatelli, S., Nakanishi, S., and Hökfelt, T. (1990). Localization of neuropeptide receptor mRNA in rat brain: initial observations using probes for neurotensin and substance P receptors. *Neurosci. Lett.* *120*, 134–138.
- El-Shewy, H.M., Johnson, K.R., Lee, M.-H., Jaffa, A.A., Obeid, L.M., and Luttrell, L.M. (2006). Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* *281*, 31399–31407.
- Emsen, P.C., Horsfield, P.M., Goedert, M., Rossor, M.N., and Hawkes, C.H. (1985). Neurotensin in human brain: regional distribution and effects of neurological illness. *Brain Res.* *347*, 239–244.
- Encinas, M., Iglesias, M., Llecha, N., and Comella, J.X. (1999). Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J. Neurochem.* *73*, 1409–1421.
- Evers, B.M., Bold, R.J., Ehrenfried, J.A., Li, J., Townsend, C.M., and Klimpel, G.R. (1994). Characterization of functional neurotensin receptors on human lymphocytes. *Surgery* *116*, 134–139; discussion 139–140.
- Evrard, S., Gaussem, P., Helley, D., and Darnige, L. (2005). [Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: contribution of recent biological markers]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* *63*, 589–597.
- Fauchais, A.-L., Lalloué, F., Lise, M.-C., Boumediene, A., Preud'homme, J.-L., Vidal, E., and Jauberteau, M.-O. (2008). Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 3027–3038.
- Fenaux, P., Preudhomme, C., Laï, J.L., Quiquandon, I., Jonveaux, P., Vanrumbeke, M., Sartiaux, C., Morel, P., Loucheux-Lefebvre, M.H., and Bauters, F. (1992). Mutations of the p53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a report on 39 cases with cytogenetic analysis. *Leukemia* *6*, 246–250.
- Ferrajoli, A., Lee, B.-N., Schlette, E.J., O'Brien, S.M., Gao, H., Wen, S., Wierda, W.G., Estrov, Z., Faderl, S., Cohen, E.N., et al. (2008). Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *111*, 5291–5297.
- Filip, A.A., Ciseł, B., Koczkodaj, D., Wąsik-Szczepanek, E., Piersiak, T., and Dmoszyńska, A. (2013). Circulating microenvironment of CLL: are nurse-like cells related to tumor-associated macrophages? *Blood Cells. Mol. Dis.* *50*, 263–270.
- Fiorcari, S., Brown, W.S., McIntyre, B.W., Estrov, Z., Maffei, R., O'Brien, S., Sivina, M., Hoellenriegel, J., Wierda, W.G., Keating, M.J., et al. (2013). The PI3-kinase delta inhibitor idelalisib (GS-1101) targets integrin-mediated adhesion of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell to endothelial and marrow stromal cells. *PLoS One* *8*, e83830.
- Foehr, E.D., Lin, X., O'Mahony, A., Geleziunas, R., Bradshaw, R.A., and Greene, W.C. (2000). NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 7556–7563.



- Foon, K.A., and Gale, R.P. (1988). Clinical transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* *30*, 385–388.
- Foon, K.A., Mehta, D., Lentzsch, S., Kropf, P., Marks, S., Lenzner, D., Pietragallo, L., Sulecki, M., Tarhini, A., and Boyiadzis, M. (2012). Long-term results of chemoimmunotherapy with low-dose fludarabine, cyclophosphamide and high-dose rituximab as initial treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *119*, 3184–3185.
- Friedberg, J.W., Sharman, J., Sweetenham, J., Johnston, P.B., Vose, J.M., Lacasce, A., Schaefer-Cutillo, J., De Vos, S., Sinha, R., Leonard, J.P., et al. (2010). Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *115*, 2578–2585.
- Fryer, R.H., Kaplan, D.R., and Kromer, L.F. (1997). Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* *148*, 616–627.
- De la Fuente, M., Garrido, J.J., Arahuetes, R.M., and Hernanz, A. (1993). Stimulation of phagocytic function in mouse macrophages by neurotensin and neuromedin N. *J. Neuroimmunol.* *42*, 97–104.
- Fukuda, T., Chen, L., Endo, T., Tang, L., Lu, D., Castro, J.E., Widhopf, G.F., Rassenti, L.Z., Cantwell, M.J., Prussak, C.E., et al. (2008). Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3047–3052.
- Gahrton, G., Robert, K.H., Friberg, K., Juliusson, G., Biberfeld, P., and Zech, L. (1982). Cytogenetic mapping of the duplicated segment of chromosome 12 in lymphoproliferative disorders. *Nature* *297*, 513–514.
- Gaidano, G., Foà, R., and Dalla-Favera, R. (2012). Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* *122*, 3432–3438.
- Gailly, P., Najimi, M., and Hermans, E. (2000). Evidence for the dual coupling of the rat neurotensin receptor with pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins. *FEBS Lett.* *483*, 109–113.
- García-Suárez, O., Germanà, A., Hannestad, J., Ciriaco, E., Laurà, R., Naves, J., Esteban, I., Silos-Santiago, I., and Vega, J.A. (2000). TrkA is necessary for the normal development of the murine thymus. *J. Neuroimmunol.* *108*, 11–21.
- García-Suárez, O., Blanco-Gelaz, M.A., Lopez, M.L., Germana, A., Cabo, R., Díaz-Esnal, B., Silos-Santiago, I., Ciriaco, E., and Vega, J.A. (2002). Massive lymphocyte apoptosis in the thymus of functionally deficient TrkB mice. *J. Neuroimmunol.* *129*, 25–34.
- Garrido, J.J., Arahuetes, R.M., Hernanz, A., and De la Fuente, M. (1992). Modulation by neurotensin and neuromedin N of adherence and chemotaxis capacity of murine lymphocytes. *Regul. Pept.* *41*, 27–37.
- Geetha, T., Kenchappa, R.S., Wooten, M.W., and Carter, B.D. (2005). TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *EMBO J.* *24*, 3859–3868.



- Gendron, L., Perron, A., Payet, M.D., Gallo-Payet, N., Sarret, P., and Beaudet, A. (2004). Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol. Pharmacol.* *66*, 1421–1430.
- Gentile, M., Cutrona, G., Neri, A., Molica, S., Ferrarini, M., and Morabito, F. (2009). Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica* *94*, 887–888.
- Ghamlouch, H., Nguyen-Khac, F., and Bernard, O.A. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia genomics and the precision medicine era. *Br. J. Haematol.*
- Ghia, E.M., Jain, S., Widhopf, G.F., Rassenti, L.Z., Keating, M.J., Wierda, W.G., Gribben, J.G., Brown, J.R., Rai, K.R., Byrd, J.C., et al. (2008). Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood* *111*, 5101–5108.
- Ghia, P., Guida, G., Stella, S., Gottardi, D., Geuna, M., Strola, G., Scielzo, C., and Caligaris-Cappio, F. (2003). The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* *101*, 1262–1269.
- Ghia, P., Ferreri, A.M., and Caligaris-Cappio, F. (2007). Chronic lymphocytic leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *64*, 234–246.
- Ghosh, A.K., and Kay, N.E. (2013). Critical signal transduction pathways in CLL. *Adv. Exp. Med. Biol.* *792*, 215–239.
- Gibon, J., and Barker, P.A. (2017). Neurotrophins and Proneurotrophins. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 1073858417697037.
- Gilmour, A.M., Abdulkhalek, S., Cheng, T.S.W., Alghamdi, F., Jayanth, P., O’Shea, L.K., Geen, O., Arvizu, L.A., and Szewczuk, M.R. (2013). A novel epidermal growth factor receptor-signaling platform and its targeted translation in pancreatic cancer. *Cell. Signal.* *25*, 2587–2603.
- Gobessi, S., Laurenti, L., Longo, P.G., Carsetti, L., Berno, V., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2009). Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* *23*, 686–697.
- Goede, V., Fischer, K., Busch, R., Engelke, A., Eichhorst, B., Wendtner, C.M., Chagorova, T., de la Serna, J., Dilhuydy, M.-S., Illmer, T., et al. (2014). Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N. Engl. J. Med.* *370*, 1101–1110.
- Goede, V., Fischer, K., Engelke, A., Schlag, R., Lepretre, S., Montero, L.F.C., Montillo, M., Fegan, C., Asikanius, E., Humphrey, K., et al. (2015). Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. *Leukemia* *29*, 1602–1604.
- Goldman, R., Bar-Shavit, Z., and Romeo, D. (1983). Neurotensin modulates human neutrophil locomotion and phagocytic capability. *FEBS Lett.* *159*, 63–67.
- Gong, Y., Cao, P., Yu, H., and Jiang, T. (2008). Crystal structure of the neurotrophin-3 and p75NTR symmetrical complex. *Nature* *454*, 789–793.
- Gottardi, D., Alfaraño, A., De Leo, A.M., Stacchini, A., Aragno, M., Rigo, A., Veneri, D., Zanotti, R., Pizzolo, G., and Caligaris-Cappio, F. (1996). In leukaemic CD5+ B cells the



expression of BCL-2 gene family is shifted toward protection from apoptosis. *Br. J. Haematol.* *94*, 612–618.

Götz, R., Köster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Schartl, M., and Thoenen, H. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* *372*, 266–269.

Gribben, J.G., and O'Brien, S. (2011). Update on therapy of chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 544–550.

Gricks, C.S., Zahrieh, D., Zauls, A.J., Gorgun, G., Drandi, D., Maurer, K., Neuberg, D., and Gribben, J.G. (2004). Differential regulation of gene expression following CD40 activation of leukemic compared to healthy B cells. *Blood* *104*, 4002–4009.

Grob, P.M., Ross, A.H., Koprowski, H., and Bothwell, M. (1985). Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* *260*, 8044–8049.

Guarini, A., Marinelli, M., Tavolaro, S., Bellacchio, E., Magliozzi, M., Chiaretti, S., De Propriis, M.S., Peragine, N., Santangelo, S., Paoloni, F., et al. (2012). ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica* *97*, 47–55.

Guha, S., Rey, O., and Rozengurt, E. (2002). Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res.* *62*, 1632–1640.

Guha, S., Lunn, J.A., Santiskulvong, C., and Rozengurt, E. (2003). Neurotensin stimulates protein kinase C-dependent mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res.* *63*, 2379–2387.

Gui, X., Guzman, G., Dobner, P.R., and Kadkol, S.S. (2008). Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenocarcinoma. *Peptides* *29*, 1609–1615.

Gully, D., Canton, M., Boigegrain, R., Jeanjean, F., Molimard, J.C., Poncelet, M., Gueudet, C., Heaulme, M., Leyris, R., and Brouard, A. (1993). Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 65–69.

Gully, D., Labeeuw, B., Boigegrain, R., Oury-Donat, F., Bachy, A., Poncelet, M., Steinberg, R., Suaud-Chagny, M.F., Santucci, V., Vita, N., et al. (1997). Biochemical and Pharmacological Activities of SR 142948A, a New Potent Neurotensin Receptor Antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *280*, 802–812.

Haapasalo, A., Sipola, I., Larsson, K., Akerman, K.E.O., Stoilov, P., Stamm, S., Wong, G., and Castren, E. (2002). Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. *J. Biol. Chem.* *277*, 43160–43167.

Haase, C., Bergmann, R., Oswald, J., Zips, D., and Pietzsch, J. (2006). Neurotensin Receptors in Adeno- and Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* *26*, 3527–3533.

Hagemeister, F. (2010). Rituximab for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* *70*, 261–272.

Hallek, M. (2013). Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am. J. Hematol.* *88*, 803–816.



- Hallek, M. (2015). Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am. J. Hematol.* *90*, 446–460.
- Hallek, M., and Pflug, N. (2011). State of the art treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood Rev.* *25*, 1–9.
- Hallek, M., Wanders, L., Strohmeyer, S., and Emmerich, B. (1992). Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann. Hematol.* *65*, 1–5.
- Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., Knauf, W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., Ostwald, M., Busch, R., Kuhn-Hallek, I., Thiel, E., et al. (1999). Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *93*, 1732–1737.
- Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M.J., Montserrat, E., Rai, K.R., et al. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood* *111*, 5446–5456.
- Hallek, M., Fischer, K., Fingerle-Rowson, G., Fink, A.M., Busch, R., Mayer, J., Hensel, M., Hopfinger, G., Hess, G., von Grünhagen, U., et al. (2010). Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* *376*, 1164–1174.
- Hamanoue, M., Middleton, G., Wyatt, S., Jaffray, E., Hay, R.T., and Davies, A.M. (1999). p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol. Cell. Neurosci.* *14*, 28–40.
- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., and Stevenson, F.K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *94*, 1848–1854.
- Hammer, R.A., Leeman, S.E., Carraway, R., and Williams, R.H. (1980). Isolation of human intestinal neurotensin. *J. Biol. Chem.* *255*, 2476–2480.
- Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., and Reed, J.C. (1993). bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *82*, 1820–1828.
- Hannestad, J., Marino, F., Germanà, A., Catania, S., Abbate, F., Ciriaco, E., and Vega, J.A. (2000). Trk neurotrophin receptor-like proteins in the teleost *Dicentrarchus labrax*. *Cell Tissue Res.* *300*, 1–9.
- Hantzopoulos, P.A., Suri, C., Glass, D.J., Goldfarb, M.P., and Yancopoulos, G.D. (1994). The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron* *13*, 187–201.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., and Bloomfield, C.D. (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *17*, 3835–3849.



- Hassan, S., Dobner, P.R., and Carraway, R.E. (2004). Involvement of MAP-kinase, PI3-kinase and EGF-receptor in the stimulatory effect of Neurotensin on DNA synthesis in PC3 cells. *Regul. Pept.* *120*, 155–166.
- Hayat, A., O'Brien, D., O'Rourke, P., McGuckin, S., Fitzgerald, T., Conneally, E., Browne, P.V., McCann, S.R., Lawler, M.P., and Vandenberghe, E. (2006). CD38 expression level and pattern of expression remains a reliable and robust marker of progressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* *47*, 2371–2379.
- Heakal, Y., Woll, M.P., Fox, T., Seaton, K., Levenson, R., and Kester, M. (2011). Neurotensin receptor-1 inducible palmitoylation is required for efficient receptor-mediated mitogenic-signaling within structured membrane microdomains. *Cancer Biol. Ther.* *12*, 427–435.
- Heintel, D., Schwarzinger, I., Chizzali-Bonfadin, C., Thalhammer, R., Schwarzmeier, J., Fritzer-Szekeres, M., Weltermann, A., Simonitsch, I., Lechner, K., and Jaeger, U. (2001). Association of CD38 antigen expression with other prognostic parameters in early stages of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* *42*, 1315–1321.
- Helmstaedter, V., Taugner, C., Feurle, G.E., and Forssmann, W.G. (1977). Localization of neurotensin-immunoreactive cells in the small intestine of man and various mammals. *Histochemistry* *53*, 35–41.
- Hempstead, B.L. (2014). Deciphering proneurotrophin actions. *Handb. Exp. Pharmacol.* *220*, 17–32.
- Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., and Chao, M.V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* *350*, 678–683.
- Herishanu, Y., and Polliack, A. (2005). Chronic lymphocytic leukemia: a review of some new aspects of the biology, factors influencing prognosis and therapeutic options. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* *32*, 85–97.
- Herishanu, Y., Pérez-Galán, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., Gibellini, F., Njuguna, N., Lee, E., Stennett, L., et al. (2011). The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *117*, 563–574.
- Hermans, E., Jeanjean, A.P., Laduron, P.M., Octave, J.N., and Maloteaux, J.M. (1993). Postnatal ontogeny of the rat brain neurotensin receptor mRNA. *Neurosci. Lett.* *157*, 45–48.
- Hermans-Borgmeyer, I., Hermey, G., Nykjaer, A., and Schaller, C. (1999). Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *65*, 216–219.
- Hermey, G., Riedel, I.B., Hampe, W., Schaller, H.C., and Hermans-Borgmeyer, I. (1999). Identification and characterization of SorCS, a third member of a novel receptor family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *266*, 347–351.
- Herrup, K., and Shooter, E.M. (1973). Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *70*, 3884–3888.
- Higuchi, H., Yamashita, T., Yoshikawa, H., and Tohyama, M. (2003). PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts. *EMBO J.* *22*, 1790–1800.



- Hillis, J., O'Dwyer, M., and Gorman, A.M. (2016). Neurotrophins and B-cell malignancies. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 41–56.
- Hobson, J.P., Rosenfeldt, H.M., Barak, L.S., Olivera, A., Poulton, S., Caron, M.G., Milstien, S., and Spiegel, S. (2001). Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 291, 1800–1803.
- Hoellenriegel, J., Meadows, S.A., Sivina, M., Wierda, W.G., Kantarjian, H., Keating, M.J., Giese, N., O'Brien, S., Yu, A., Miller, L.L., et al. (2011). The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118, 3603–3612.
- Hoellenriegel, J., Coffey, G.P., Sinha, U., Pandey, A., Sivina, M., Ferrajoli, A., Ravandi, F., Wierda, W.G., O'Brien, S., Keating, M.J., et al. (2012). Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration. *Leukemia* 26, 1576–1583.
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., Emllet, D.R., Dieterich, R., and Wong, A.J. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12419–12424.
- Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609–642.
- Huhn, D., von Schilling, C., Wilhelm, M., Ho, A.D., Hallek, M., Kuse, R., Knauf, W., Riedel, U., Hinke, A., Srock, S., et al. (2001). Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98, 1326–1331.
- Ibrahim, S., Keating, M., Do, K.A., O'Brien, S., Huh, Y.O., Jilani, I., Lerner, S., Kantarjian, H.M., and Albitar, M. (2001). CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98, 181–186.
- Iguchi, A., Matsunaga, H., Nomura, T., Gotoh, M., and Sakamoto, N. (1984). Glucoregulatory effects of intrahypothalamic injections of bombesin and other peptides. *Endocrinology* 114, 2242–2246.
- Ip, N.Y., Ibáñez, C.F., Nye, S.H., McClain, J., Jones, P.F., Gies, D.R., Belluscio, L., Le Beau, M.M., Espinosa, R., and Squinto, S.P. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 3060–3064.
- Itoh, Y., Joh, T., Tanida, S., Sasaki, M., Kataoka, H., Itoh, K., Oshima, T., Ogasawara, N., Togawa, S., Wada, T., et al. (2005). IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine* 29, 275–282.
- Iversen, L.L., Iversen, S.D., Bloom, F., Douglas, C., Brown, M., and Vale, W. (1978). Calcium-dependent release of somatostatin and neurotensin from rat brain in vitro. *Nature* 273, 161–163.
- Iwakura, Y., Nawa, H., Sora, I., and Chao, M.V. (2008). Dopamine D1 receptor-induced signaling through TrkB receptors in striatal neurons. *J. Biol. Chem.* 283, 15799–15806.



- Jacobsen, L., Madsen, P., Moestrup, S.K., Lund, A.H., Tommerup, N., Nykjaer, A., Sottrup-Jensen, L., Gliemann, J., and Petersen, C.M. (1996). Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the alpha2-macroglobulin receptor-associated protein. *J. Biol. Chem.* *271*, 31379–31383.
- Jansen, P., Giehl, K., Nyengaard, J.R., Teng, K., Lioubinski, O., Sjoegaard, S.S., Breiderhoff, T., Gotthardt, M., Lin, F., Eilers, A., et al. (2007). Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat. Neurosci.* *10*, 1449–1457.
- Jelinek, D.F., Tschumper, R.C., Geyer, S.M., Bone, N.D., Dewald, G.W., Hanson, C.A., Stenson, M.J., Witzig, T.E., Tefferi, A., and Kay, N.E. (2001). Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* *115*, 854–861.
- Jitschin, R., Braun, M., Qorraj, M., Saul, D., Le Blanc, K., Zenz, T., and Mougiakakos, D. (2015). Stromal cell-mediated glycolytic switch in CLL cells involves Notch-c-Myc signaling. *Blood* *125*, 3432–3436.
- Johansson, O., and Folan, J. (1984). Ultrastructural immunocytochemical studies on CCK- and neurotensin-like immunoreactivity in the nucleus accumbens of the rat. *Med. Biol.* *62*, 318–322.
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., and Chao, M. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* *47*, 545–554.
- Juliusson, G., Oscier, D.G., Fitchett, M., Ross, F.M., Stockdill, G., Mackie, M.J., Parker, A.C., Castoldi, G.L., Guneo, A., Knuutila, S., et al. (1990). Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N. Engl. J. Med.* *323*, 720–724.
- Kaaks, R., Sookthai, D., Łuczyńska, A., Oakes, C.C., Becker, S., Johnson, T., Johansson, A., Melin, B., Sjöberg, K., Trichopoulos, D., et al. (2015). Lag times between lymphoproliferative disorder and clinical diagnosis of chronic lymphocytic leukemia: a prospective analysis using plasma soluble CD23. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *24*, 538–545.
- Kadia, T., Delioukina, M.L., Kantarjian, H.M., Keating, M.J., Wierda, W.G., Burger, J.A., Wieland, S., and Levitt, D. (2011). A Pilot Phase II Study of the Lyn Kinase Inhibitor Bafetinib in Patients with Relapsed or Refractory B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* *118*, 2858–2858.
- Kamimae, S., Yamamoto, E., Kai, M., Niinuma, T., Yamano, H., Nojima, M., Yoshikawa, K., Kimura, T., Takagi, R., Harada, E., et al. (2015). Epigenetic silencing of NTSR1 is associated with lateral and noninvasive growth of colorectal tumors. *Oncotarget* *6*, 29975–29990.
- Kanning, K.C., Hudson, M., Amieux, P.S., Wiley, J.C., Bothwell, M., and Schecterson, L.C. (2003). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 5425–5436.
- Kao, S., Jaiswal, R.K., Kolch, W., and Landreth, G.E. (2001). Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 18169–18177.



- Kay, N.E., O'Brien, S.M., Pettitt, A.R., and Stilgenbauer, S. (2007). The role of prognostic factors in assessing "high-risk" subgroups of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 21, 1885–1891.
- Keating, M.J., Flinn, I., Jain, V., Binet, J.-L., Hillmen, P., Byrd, J., Albitar, M., Brettman, L., Santabarbara, P., Wacker, B., et al. (2002). Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood* 99, 3554–3561.
- Keely, S.J., Calandrella, S.O., and Barrett, K.E. (2000). Carbachol-stimulated transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T(84) cells is mediated by intracellular Ca²⁺, PYK-2, and p60(src). *J. Biol. Chem.* 275, 12619–12625.
- Kehrl, J.H. (1998). Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins. *Immunity* 8, 1–10.
- Kehrl, J.H. (2016). The impact of RGS and other G-protein regulatory proteins on Gαi-mediated signaling in immunity. *Biochem. Pharmacol.* 114, 40–52.
- Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, V.V., Misgeld, T., Klinkert, W.E., Kolbeck, R., Hoppe, E., Oropeza-Wekerle, R.L., Bartke, I., et al. (1999). Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J. Exp. Med.* 189, 865–870.
- Khursigara, G., Orlinick, J.R., and Chao, M.V. (1999). Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J. Biol. Chem.* 274, 2597–2600.
- Kikushige, Y., Ishikawa, F., Miyamoto, T., Shima, T., Urata, S., Yoshimoto, G., Mori, Y., Iino, T., Yamauchi, T., Eto, T., et al. (2011). Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 20, 246–259.
- Kim, H.S., Yumkham, S., Choi, J.H., Lee, S.H., Kim, T.-H., Ryu, S.H., and Suh, P.-G. (2006). Neurotensin enhances nitric oxide generation via the JAK2-STAT1 pathway in murine macrophage Raw264.7 cells during costimulation with LPS and IFNγ. *Neuropeptides* 40, 221–229.
- Kim, J.T., Liu, C., Zaytseva, Y.Y., Weiss, H.L., Townsend, C.M., and Evers, B.M. (2015a). Neurotensin, a novel target of Wnt/β-catenin pathway, promotes growth of neuroendocrine tumor cells. *Int. J. Cancer* 136, 1475–1481.
- Kim, J.T., Li, J., Song, J., Lee, E.Y., Weiss, H.L., Townsend, C.M., and Evers, B.M. (2015b). Differential expression and tumorigenic function of neurotensin receptor 1 in neuroendocrine tumor cells. *Oncotarget* 6, 26960–26970.
- Kim, J.T., Weiss, H.L., and Evers, B.M. (2017). Diverse expression patterns and tumorigenic role of neurotensin signaling components in colorectal cancer cells. *Int. J. Oncol.* 50, 2200–2206.
- Kim, M.J., Kim, E., Ryu, S.H., and Suh, P.G. (2000). The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation. *Exp. Mol. Med.* 32, 101–109.
- Kimura, M.T., Irie, S., Shoji-Hoshino, S., Mukai, J., Nadano, D., Oshimura, M., and Sato, T.A. (2001). 14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* 276, 17291–17300.



- Kipps, T.J., Wierda, W.G., Jones, J.A., Swinnen, L.J., Yang, J., Cui, Y., Busman, T., Krivoschik, A., Enschede, S., and Humerickhouse, R. (2010). Navitoclax (ABT-263) Plus Fludarabine/Cyclophosphamide/Rituximab (FCR) or Bendamustine/Rituximab (BR): A Phase 1 Study In Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood* 116, 2455–2455.
- Kipps, T.J., Eradat, H., Grosicki, S., Catalano, J., Cosolo, W., Dyagil, I.S., Yalamanchili, S., Chai, A., Sahasranaman, S., Punnoose, E., et al. (2015). A phase 2 study of the BCL2 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 56, 2826–2833.
- Kipps, T.J., Stevenson, F.K., Wu, C.J., Croce, C.M., Packham, G., Wierda, W.G., O'Brien, S., Gribben, J., and Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 16096.
- Kisfalvi, K., Hurd, C., Guha, S., and Rozengurt, E. (2010). Induced overexpression of protein kinase D1 stimulates mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma PANC-1 cells. *J. Cell. Physiol.* 223, 309–316.
- Kislauskis, E., Bullock, B., McNeil, S., and Dobner, P.R. (1988). The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *J. Biol. Chem.* 263, 4963–4968.
- Kitabgi, P. (2002). Targeting neurotensin receptors with agonists and antagonists for therapeutic purposes. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5, 764–776.
- Kitabgi, P. (2006a). Differential processing of pro-neurotensin/neuromedin N and relationship to pro-hormone convertases. *Peptides* 27, 2508–2514.
- Kitabgi, P. (2006b). Inactivation of neurotensin and neuromedin N by Zn metallopeptidases. *Peptides* 27, 2515–2522.
- Kitabgi, P. (2010). Neurotensin and neuromedin N are differentially processed from a common precursor by prohormone convertases in tissues and cell lines. *Results Probl. Cell Differ.* 50, 85–96.
- Kitabgi, P., Carraway, R., and Leeman, S.E. (1976). Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin. *J. Biol. Chem.* 251, 7053–7058.
- Kitabgi, P., Carraway, R., Van Rietschoten, J., Granier, C., Morgat, J.L., Menez, A., Leeman, S., and Freychet, P. (1977). Neurotensin: specific binding to synaptic membranes from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 1846–1850.
- Kitabgi, P., Kwan, C.Y., Fox, J.E., and Vincent, J.P. (1984). Characterization of neurotensin binding to rat gastric smooth muscle receptor sites. *Peptides* 5, 917–923.
- Kitabgi, P., Rostène, W., Dussaillant, M., Schotte, A., Laduron, P.M., and Vincent, J.P. (1987). Two populations of neurotensin binding sites in murine brain: discrimination by the antihistamine levocabastine reveals markedly different radioautographic distribution. *Eur. J. Pharmacol.* 140, 285–293.
- Kitabgi, P., De Nadai, F., Rovère, C., and Bidard, J.N. (1992). Biosynthesis, maturation, release, and degradation of neurotensin and neuromedin N. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 668, 30–42.



- Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J.M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H.G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C.M., et al. (1998). Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* *91*, 3379–3389.
- Kitada, S., Pedersen, I.M., Schimmer, A.D., and Reed, J.C. (2002). Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* *21*, 3459–3474.
- Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., and Barbacid, M. (1991a). The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* *65*, 189–197.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S.A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and Barbacid, M. (1991b). The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* *66*, 395–403.
- Knauf, W.U., Lissichkov, T., Aldaoud, A., Liberati, A., Loscertales, J., Herbrecht, R., Juliusson, G., Postner, G., Gercheva, L., Goranov, S., et al. (2009). Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 4378–4384.
- Kobayashi, H., Gleich, G.J., Butterfield, J.H., and Kita, H. (2002). Human eosinophils produce neurotrophins and secrete nerve growth factor on immunologic stimuli. *Blood* *99*, 2214–2220.
- Kong, H., Boulter, J., Weber, J.L., Lai, C., and Chao, M.V. (2001). An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 176–185.
- Koon, H.-W., Kim, Y.S., Xu, H., Kumar, A., Zhao, D., Karagiannides, I., Dobner, P.R., and Pothoulakis, C. (2009). Neurotensin induces IL-6 secretion in mouse preadipocytes and adipose tissues during 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 8766–8771.
- Kotecha, S.A., Oak, J.N., Jackson, M.F., Perez, Y., Orser, B.A., Van Tol, H.H.M., and MacDonald, J.F. (2002). A D2 class dopamine receptor transactivates a receptor tyrosine kinase to inhibit NMDA receptor transmission. *Neuron* *35*, 1111–1122.
- Krajewska, M., Krajewski, S., Zapata, J.M., Van Arsdale, T., Gascoyne, R.D., Berern, K., McFadden, D., Shabaik, A., Hugh, J., Reynolds, A., et al. (1998). TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am. J. Pathol.* *152*, 1549–1561.
- Kreitel, K.D., Swisher, C.B., and Behbehani, M.M. (2002). The effects of diphenhydramine and SR142948A on periaqueductal gray neurons and on the interactions between the medial preoptic nucleus and the periaqueductal gray. *Neuroscience* *114*, 935–943.
- Kröber, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Brückle, E., Lichter, P., Döhner, H., and Stilgenbauer, S. (2002). V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *100*, 1410–1416.
- Kröber, A., Bloehdorn, J., Hafner, S., Bühler, A., Seiler, T., Kienle, D., Winkler, D., Bangerter, M., Schlenk, R.F., Benner, A., et al. (2006). Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *24*, 969–975.



- Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Gelfand, E.W., and Brodie, C. (2002). NGF rescues human B lymphocytes from anti-IgM induced apoptosis by activation of PKCzeta. *Eur. J. Immunol.* *32*, 136–143.
- Kryl, D., and Barker, P.A. (2000). TTIP is a novel protein that interacts with the truncated T1 TrkB neurotrophin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *279*, 925–930.
- Kurosaki, T. (2002). Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 354–363.
- Kuruville, R., Ye, H., and Ginty, D.D. (2000). Spatially and functionally distinct roles of the PI3-K effector pathway during NGF signaling in sympathetic neurons. *Neuron* *27*, 499–512.
- Labbé-Jullié, C., Botto, J.M., Mas, M.V., Chabry, J., Mazella, J., Vincent, J.P., Gully, D., Maffrand, J.P., and Kitabgi, P. (1995). [3H]SR 48692, the first nonpeptide neurotensin antagonist radioligand: characterization of binding properties and evidence for distinct agonist and antagonist binding domains on the rat neurotensin receptor. *Mol. Pharmacol.* *47*, 1050–1056.
- Labbé-Jullié, C., Barroso, S., Nicolas-Ètève, D., Reversat, J.L., Botto, J.M., Mazella, J., Bernassau, J.M., and Kitabgi, P. (1998). Mutagenesis and modeling of the neurotensin receptor NTR1. Identification of residues that are critical for binding SR 48692, a nonpeptide neurotensin antagonist. *J. Biol. Chem.* *273*, 16351–16357.
- Labouyrie, E., Dubus, P., Groppi, A., Mahon, F.X., Ferrer, J., Parrens, M., Reiffers, J., de Mascarel, A., and Merlio, J.P. (1999). Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am. J. Pathol.* *154*, 405–415.
- Lagneaux, L., Delforge, A., Dorval, C., Bron, D., and Stryckmans, P. (1993). Excessive production of transforming growth factor-beta by bone marrow stromal cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia inhibits growth of hematopoietic precursors and interleukin-6 production. *Blood* *82*, 2379–2385.
- Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C., and Stryckmans, P. (1998). Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* *91*, 2387–2396.
- Lamballe, F., Klein, R., and Barbacid, M. (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* *66*, 967–979.
- Lanasa, M.C. (2010). Novel insights into the biology of CLL. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* *2010*, 70–76.
- Lapalombella, R., Andritsos, L., Liu, Q., May, S.E., Browning, R., Pham, L.V., Blum, K.A., Blum, W., Ramanunni, A., Raymond, C.A., et al. (2010). Lenalidomide treatment promotes CD154 expression on CLL cells and enhances production of antibodies by normal B cells through a PI3-kinase-dependent pathway. *Blood* *115*, 2619–2629.
- Large, T.H., Weskamp, G., Helder, J.C., Radeke, M.J., Misko, T.P., Shooter, E.M., and Reichardt, L.F. (1989). Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system. *Neuron* *2*, 1123–1134.
- Laurent, P., Clerc, P., Mattei, M.G., Forgez, P., Dumont, X., Ferrara, P., Caput, D., and Rostene, W. (1994). Chromosomal localization of mouse and human neurotensin receptor genes. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* *5*, 303–306.



- Le, F., Groshan, K., Zeng, X.P., and Richelson, E. (1997). Characterization of the genomic structure, promoter region, and a tetranucleotide repeat polymorphism of the human neurotensin receptor gene. *J. Biol. Chem.* *272*, 1315–1322.
- Lee, F.S., and Chao, M.V. (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 3555–3560.
- Lee, F.S., Rajagopal, R., and Chao, M.V. (2002a). Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* *13*, 11–17.
- Lee, F.S., Rajagopal, R., Kim, A.H., Chang, P.C., and Chao, M.V. (2002b). Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *J. Biol. Chem.* *277*, 9096–9102.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* *294*, 1945–1948.
- Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A.J., Canuel, M., and Morales, C.R. (2003). The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J.* *22*, 6430–6437.
- Lemaire, I. (1988). Neurotensin enhances IL-1 production by activated alveolar macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *140*, 2983–2988.
- Leon, A., Buriani, A., Dal Toso, R., Fabris, M., Romanello, S., Aloe, L., and Levi-Montalcini, R. (1994). Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 3739–3743.
- Leporrier, M., Chevret, S., Cazin, B., Boudjerra, N., Feugier, P., Desablens, B., Rapp, M.J., Jaubert, J., Autrand, C., Divine, M., et al. (2001). Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* *98*, 2319–2325.
- Lepretre, S., and Neste, É.V.D. (2006). Place de la chimiothérapie dans la leucémie lymphoïde chronique. *Hématologie* *12*, 28–34.
- Lessmann, V., and Brigadski, T. (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci. Res.* *65*, 11–22.
- Lessmann, V., Gottmann, K., and Malcangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* *69*, 341–374.
- Levi-Montalcini, R., and Cohen, S. (1956). IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF A NERVE GROWTH-STIMULATING AGENT ISOLATED FROM SNAKE VENOM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *42*, 695–699.
- Levi-Montalcini, R., and Hamburger, V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* *116*, 321–361.
- Li, Z., Chang, Z., Chiao, L.J., Kang, Y., Xia, Q., Zhu, C., Fleming, J.B., Evans, D.B., and Chiao, P.J. (2009a). TrkBT1 induces liver metastasis of pancreatic cancer cells by sequestering Rho GDP dissociation inhibitor and promoting RhoA activation. *Cancer Res.* *69*, 7851–7859.



- Li, Z., Beutel, G., Rhein, M., Meyer, J., Koenecke, C., Neumann, T., Yang, M., Krauter, J., von Neuhoff, N., Heuser, M., et al. (2009b). High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood* *113*, 2028–2037.
- Linnet, M.S., Van Natta, M.L., Brookmeyer, R., Khoury, M.J., McCaffrey, L.D., Humphrey, R.L., and Szklo, M. (1989). Familial cancer history and chronic lymphocytic leukemia. A case-control study. *Am. J. Epidemiol.* *130*, 655–664.
- Liu, Y., An, S., Ward, R., Yang, Y., Guo, X.-X., Li, W., and Xu, T.-R. (2016). G protein-coupled receptors as promising cancer targets. *Cancer Lett.* *376*, 226–239.
- Loewy, A.D., and McKellar, S. (1980). The neuroanatomical basis of central cardiovascular control. *Fed. Proc.* *39*, 2495–2503.
- Longo, P.G., Laurenti, L., Gobessi, S., Petlickovski, A., Pelosi, M., Chiusolo, P., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2007). The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* *21*, 110–120.
- Longo, P.G., Laurenti, L., Gobessi, S., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2008). The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* *111*, 846–855.
- Lozanski, G., Heerema, N.A., Flinn, I.W., Smith, L., Harbison, J., Webb, J., Moran, M., Lucas, M., Lin, T., Hackbarth, M.L., et al. (2004). Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood* *103*, 3278–3281.
- Luberg, K., Wong, J., Weickert, C.S., and Timmusk, T. (2010). Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J. Neurochem.* *113*, 952–964.
- Luttrell, L.M., Hawes, B.E., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lansing, T.J., and Lefkowitz, R.J. (1996). Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* *271*, 19443–19450.
- MacDonald, J.I., and Meakin, S.O. (1996). Deletions in the extracellular domain of rat trkA lead to an altered differentiative phenotype in neurotrophin responsive cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *7*, 371–390.
- MacDonald, J.I., Gryz, E.A., Kubu, C.J., Verdi, J.M., and Meakin, S.O. (2000). Direct binding of the signaling adapter protein Grb2 to the activation loop tyrosines on the nerve growth factor receptor tyrosine kinase, TrkA. *J. Biol. Chem.* *275*, 18225–18233.
- Maeno, H., Yamada, K., Santo-Yamada, Y., Aoki, K., Sun, Y.-J., Sato, E., Fukushima, T., Ogura, H., Araki, T., Kamichi, S., et al. (2004). Comparison of mice deficient in the high- or low-affinity neurotensin receptors, Ntsr1 or Ntsr2, reveals a novel function for Ntsr2 in thermal nociception. *Brain Res.* *998*, 122–129.
- Magazin, M., Poszepczynska-Guigné, E., Bagot, M., Boumsell, L., Pruvost, C., Chalon, P., Culouscou, J.-M., Ferrara, P., and Bensussan, A. (2004). Sezary syndrome cells unlike normal circulating T lymphocytes fail to migrate following engagement of NT1 receptor. *J. Invest. Dermatol.* *122*, 111–118.



Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R.F., Wiegand, S.J., Furth, M.E., Lindsay, R.M., and Yancopoulos, G.D. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* *5*, 501–509.

Malcikova, J., Smardova, J., Rocnova, L., Tichy, B., Kuglik, P., Vranova, V., Cejkova, S., Svitakova, M., Skuhrova Francova, H., Brychtova, Y., et al. (2009). Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* *114*, 5307–5314.

Mansouri, L., Cahill, N., Gunnarsson, R., Smedby, K.E., Tjønnefjord, E., Hjalgrim, H., Juliusson, G., Geisler, C., and Rosenquist, R. (2013). NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *27*, 512–514.

Maoret, J.J., Anini, Y., Rouyer-Fessard, C., Gully, D., and Laburthe, M. (1999). Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *Int. J. Cancer* *80*, 448–454.

Marondel, I., Renault, B., Lieman, J., Ward, D., and Kucherlapati, R. (1996). Physical mapping of the human neurotensin gene (NTS) between markers D12S1444 and D12S81 on chromosome 12q21. *Genomics* *38*, 243–245.

Marsault, R., and Frelin, C. (1992). Activation by nitric oxide of guanylate cyclase in endothelial cells from brain capillaries. *J. Neurochem.* *59*, 942–945.

Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* *80*, 179–185.

Martin, S., Botto, J.M., Vincent, J.P., and Mazella, J. (1999). Pivotal role of an aspartate residue in sodium sensitivity and coupling to G proteins of neurotensin receptors. *Mol. Pharmacol.* *55*, 210–215.

Martin, S., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2002). Recycling ability of the mouse and the human neurotensin type 2 receptors depends on a single tyrosine residue. *J. Cell Sci.* *115*, 165–173.

Martin, S., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2003). Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 1198–1205.

Martin, S., Dicou, E., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2005). Neurotensin and the neurotensin receptor-3 in microglial cells. *J. Neurosci. Res.* *81*, 322–326.

Martínez-Trillos, A., Pinyol, M., Navarro, A., Aymerich, M., Jares, P., Juan, M., Rozman, M., Colomer, D., Delgado, J., Giné, E., et al. (2014). Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood* *123*, 3790–3796.

Massa, F., Tormo, A., Béraud-Dufour, S., Coppola, T., and Mazella, J. (2011). Neurotensin-induced Erk1/2 phosphorylation and growth of human colonic cancer cells are independent from growth factors receptors activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *414*, 118–122.

Massa, F., Devader, C., Béraud-Dufour, S., Brau, F., Coppola, T., and Mazella, J. (2013). Focal adhesion kinase dependent activation of the PI3 kinase pathway by the functional soluble form of neurotensin receptor-3 in HT29 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 952–959.



Massa, F., Devader, C., Lacas-Gervais, S., Béraud-Dufour, S., Coppola, T., and Mazella, J. (2014). Impairment of HT29 Cancer Cells Cohesion by the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3. *Genes Cancer* 5, 240–249.

Matthews, C., Catherwood, M.A., Morris, T.C.M., Kettle, P.J., Drake, M.B., Gilmore, W.S., and Alexander, H.D. (2006). Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *Eur. J. Haematol.* 77, 309–317.

Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., Garcia Marco, J., Houlihan, A., Que, T.H., and Catovsky, D. (1994). The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 8, 1640–1645.

Matutes, E., Oscier, D., Garcia-Marco, J., Ellis, J., Copplestone, A., Gillingham, R., Hamblin, T., Lens, D., Swansbury, G.J., and Catovsky, D. (1996). Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br. J. Haematol.* 92, 382–388.

Mazella, J., and Vincent, J.-P. (2006). Internalization and recycling properties of neurotensin receptors. *Peptides* 27, 2488–2492.

Mazella, J., Poustis, C., Labbe, C., Checler, F., Kitabgi, P., Granier, C., van Rietschoten, J., and Vincent, J.P. (1983). Monoiodo-[Trp11]neurotensin, a highly radioactive ligand of neurotensin receptors. Preparation, biological activity, and binding properties to rat brain synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* 258, 3476–3481.

Mazella, J., Amar, S., Bozou, J.C., Kitabgi, P., and Vincent, J.P. (1987). Functional properties and molecular structure of central and peripheral neurotensin receptors. *J. Recept. Res.* 7, 157–165.

Mazella, J., Chabry, J., Kitabgi, P., and Vincent, J.P. (1988). Solubilization and characterization of active neurotensin receptors from mouse brain. *J. Biol. Chem.* 263, 144–149.

Mazella, J., Chabry, J., Zsurger, N., and Vincent, J.P. (1989). Purification of the neurotensin receptor from mouse brain by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 264, 5559–5563.

Mazella, J., Leonard, K., Chabry, J., Kitabgi, P., Vincent, J.P., and Beaudet, A. (1991). Binding and internalization of iodinated neurotensin in neuronal cultures from embryonic mouse brain. *Brain Res.* 564, 249–255.

Mazella, J., Botto, J.M., Guillemare, E., Coppola, T., Sarret, P., and Vincent, J.P. (1996a). Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 5613–5620.

Mazella, J., Botto, J.M., Guillemare, E., Coppola, T., Sarret, P., and Vincent, J.P. (1996b). Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 5613–5620.

Mazella, J., Zsürger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J.P., et al. (1998). The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 26273–26276.



- McConkey, D.J., Chandra, J., Wright, S., Plunkett, W., McDonnell, T.J., Reed, J.C., and Keating, M. (1996). Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of BCL-2 and BAX. *J. Immunol.* *156*, 2624–2630.
- McKeithan, T.W., Takimoto, G.S., Ohno, H., Bjorling, V.S., Morgan, R., Hecht, B.K., Dubé, I., Sandberg, A.A., and Rowley, J.D. (1997). BCL3 rearrangements and t(14;19) in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies: a molecular and cytogenetic study. *Genes. Chromosomes Cancer* *20*, 64–72.
- Méndez, M., Souazé, F., Nagano, M., Kelly, P.A., Rostène, W., and Forgez, P. (1997). High affinity neurotensin receptor mRNA distribution in rat brain and peripheral tissues. Analysis by quantitative RT-PCR. *J. Mol. Neurosci.* *MN 9*, 93–102.
- Messmer, B.T., Messmer, D., Allen, S.L., Koltz, J.E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E.J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., et al. (2005). In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Clin. Invest.* *115*, 755–764.
- Meuleman, N., Stamatopoulos, B., Dejeneffe, M., El Housni, H., Lagneaux, L., and Bron, D. (2008). Doubling time of soluble CD23: a powerful prognostic factor for newly diagnosed and untreated stage A chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia* *22*, 1882–1890.
- Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., et al. (2004). LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat. Neurosci.* *7*, 221–228.
- Michaux, L., Mecucci, C., Stul, M., Wlodarska, I., Hernandez, J.M., Meeus, P., Michaux, J.L., Scheiff, J.M., Noël, H., Louwagie, A., et al. (1996). BCL3 rearrangement and t(14;19)(q32;q13) in lymphoproliferative disorders. *Genes. Chromosomes Cancer* *15*, 38–47.
- Michels, J., O'Neill, J.W., Dallman, C.L., Mouzakiti, A., Habens, F., Brimmell, M., Zhang, K.Y.J., Craig, R.W., Marcusson, E.G., Johnson, P.W.M., et al. (2004). Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene* *23*, 4818–4827.
- Mignini, F., Sabbatini, M., D'Andrea, V., and Cavallotti, C. (2011). Neuropeptides of human thymus in normal and pathological conditions. *Peptides* *32*, 920–928.
- Mijatovic, T., Gailly, P., Mathieu, V., De Nève, N., Yeaton, P., Kiss, R., and Decaestecker, C. (2007). Neurotensin is a versatile modulator of in vitro human pancreatic ductal adenocarcinoma cell (PDAC) migration. *Cell. Oncol. Off. J. Int. Soc. Cell. Oncol.* *29*, 315–326.
- Minamino, N., Kangawa, K., and Matsuo, H. (1984). Neuromedin N: a novel neurotensin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *122*, 542–549.
- Minichiello, L., Korte, M., Wolfer, D., Kühn, R., Unsicker, K., Cestari, V., Rossi-Arnaud, C., Lipp, H.P., Bonhoeffer, T., and Klein, R. (1999). Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* *24*, 401–414.
- Mira, E., Lacalle, R.A., González, M.A., Gómez-Moutón, C., Abad, J.L., Bernad, A., Martínez-A, C., and Mañes, S. (2001). A role for chemokine receptor transactivation in growth factor signaling. *EMBO Rep.* *2*, 151–156.



- Mitre, M., Mariga, A., and Chao, M.V. (2017). Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 *131*, 13–23.
- Möhle, R., Failenschmid, C., Bautz, F., and Kanz, L. (1999). Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* *13*, 1954–1959.
- Molica, S. (1994). Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival, and treatment. *Leuk. Lymphoma* *13*, 203–214.
- Molica, S. (2005). Second neoplasms in chronic lymphocytic leukemia: incidence and pathogenesis with emphasis on the role of different therapies. *Leuk. Lymphoma* *46*, 49–54.
- Molica, S., Levato, D., Dell’Olio, M., Matera, R., Minervini, M., Dattilo, A., Carotenuto, M., and Musto, P. (1996). Cellular expression and serum circulating levels of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Implications for prognosis. *Haematologica* *81*, 428–433.
- Montillo, M., Hamblin, T., Hallek, M., Montserrat, E., and Morra, E. (2005). Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* *90*, 391–399.
- Montserrat, E. (2004). Role of auto- and allotransplantation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *18*, 915–926, x.
- Montserrat, E. (2006). New prognostic markers in CLL. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 279–284.
- Moody, T.W., Chiles, J., Casibang, M., Moody, E., Chan, D., and Davis, T.P. (2001). SR48692 is a neurotensin receptor antagonist which inhibits the growth of small cell lung cancer cells. *Peptides* *22*, 109–115.
- Moody, T.W., Chan, D.C., Mantey, S.A., Moreno, P., and Jensen, R.T. (2014). SR48692 inhibits non-small cell lung cancer proliferation in an EGF receptor-dependent manner. *Life Sci.* *100*, 25–34.
- Moody, T.W., Nuche-Berenguer, B., Nakamura, T., and Jensen, R.T. (2016). EGFR Transactivation by Peptide G Protein-Coupled Receptors in Cancer. *Curr. Drug Targets* *17*, 520–528.
- Moore, R.N., Osmand, A.P., Dunn, J.A., Joshi, J.G., Koontz, J.W., and Rouse, B.T. (1989). Neurotensin regulation of macrophage colony-stimulating factor-stimulated in vitro myelopoiesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *142*, 2689–2694.
- Morabito, F., Mosca, L., Cutrona, G., Agnelli, L., Tuana, G., Ferracin, M., Zagatti, B., Lionetti, M., Fabris, S., Maura, F., et al. (2013). Clinical monoclonal B lymphocytosis versus Rai 0 chronic lymphocytic leukemia: A comparison of cellular, cytogenetic, molecular, and clinical features. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 5890–5900.
- Moreau, E.J., Matutes, E., A’Hern, R.P., Morilla, A.M., Morilla, R.M., Owusu-Ankomah, K.A., Seon, B.K., and Catovsky, D. (1997). Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am. J. Clin. Pathol.* *108*, 378–382.



- Morimoto, A., and Murakami, N. (1985). [14C]deoxyglucose incorporation into rat brain regions during hypothalamic or peripheral thermal stimulation. *Am. J. Physiol.* *248*, R84–R92.
- Morris, N.J., Ross, S.A., Lane, W.S., Moestrup, S.K., Petersen, C.M., Keller, S.R., and Lienhard, G.E. (1998). Sortilin is the major 110-kDa protein in GLUT4 vesicles from adipocytes. *J. Biol. Chem.* *273*, 3582–3587.
- Morrison, V.A. (2010). Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* *23*, 145–153.
- Morton, L.M., Curtis, R.E., Linet, M.S., Bluhm, E.C., Tucker, M.A., Caporaso, N., Ries, L.A.G., and Fraumeni, J.F. (2010). Second malignancy risks after non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: differences by lymphoma subtype. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 4935–4944.
- Mössner, E., Brünker, P., Moser, S., Püntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., et al. (2010). Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* *115*, 4393–4402.
- Moughal, N.A., Waters, C., Sambhi, B., Pyne, S., and Pyne, N.J. (2004). Nerve growth factor signaling involves interaction between the Trk A receptor and lysophosphatidate receptor 1 systems: nuclear translocation of the lysophosphatidate receptor 1 and Trk A receptors in pheochromocytoma 12 cells. *Cell. Signal.* *16*, 127–136.
- Moughal, N.A., Waters, C.M., Valentine, W.J., Connell, M., Richardson, J.C., Tigyi, G., Pyne, S., and Pyne, N.J. (2006). Protean agonism of the lysophosphatidic acid receptor-1 with Ki16425 reduces nerve growth factor-induced neurite outgrowth in pheochromocytoma 12 cells. *J. Neurochem.* *98*, 1920–1929.
- Moyse, E., Rostène, W., Vial, M., Leonard, K., Mazella, J., Kitabgi, P., Vincent, J.P., and Beaudet, A. (1987). Distribution of neurotensin binding sites in rat brain: a light microscopic radioautographic study using monoiodo [125I]Tyr³-neurotensin. *Neuroscience* *22*, 525–536.
- Munir, T. (2015). Chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Amst. Neth.* *20*, 245–246.
- Mustain, W.C., Rychahou, P.G., and Evers, B.M. (2011). The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* *18*, 75–82.
- Muzio, M., Apollonio, B., Scielzo, C., Frenquelli, M., Vandoni, I., Boussiotis, V., Caligaris-Cappio, F., and Ghia, P. (2008). Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* *112*, 188–195.
- Myers, R.M., Shearman, J.W., Kitching, M.O., Ramos-Montoya, A., Neal, D.E., and Ley, S.V. (2009). Cancer, chemistry, and the cell: molecules that interact with the neurotensin receptors. *ACS Chem. Biol.* *4*, 503–525.
- Nagel, I., Bug, S., Tönnies, H., Ammerpohl, O., Richter, J., Vater, I., Callet-Bauchu, E., Calasanz, M.J., Martinez-Climent, J.A., Bastard, C., et al. (2009). Biallelic inactivation of TRAF3 in a subset of B-cell lymphomas with interstitial del(14)(q24.1q32.33). *Leukemia* *23*, 2153–2155.



- Najimi, M., Maloteaux, J.M., and Hermans, E. (2002). Cytoskeleton-related trafficking of the EAAC1 glutamate transporter after activation of the G(q/11)-coupled neurotensin receptor NTS1. *FEBS Lett.* *523*, 224–228.
- Nemeroff, C.B., Bissette, G., Prange, A.J., Loosen, P.T., Barlow, T.S., and Lipton, M.A. (1977). Neurotensin: central nervous system effects of a hypothalamic peptide. *Brain Res.* *128*, 485–496.
- Neri, P., Bahlis, N.J., Paba-Prada, C., and Richardson, P. (2016). Treatment of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Cancer Treat. Res.* *169*, 169–194.
- Nguyen-Khac, F. (2010). [Cytogenetic markers in chronic lymphocytic leukemia]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* *68*, 273–276.
- Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Olivecrona, G., Gliemann, J., and Petersen, C.M. (1999). Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* *274*, 8832–8836.
- Nielsen, M.S., Madsen, P., Christensen, E.I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R., and Petersen, C.M. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* *20*, 2180–2190.
- Nilsson, A.S., Fainzilber, M., Falck, P., and Ibáñez, C.F. (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett.* *424*, 285–290.
- Nishida, Y., Adati, N., Ozawa, R., Maeda, A., Sakaki, Y., and Takeda, T. (2008). Identification and classification of genes regulated by phosphatidylinositol 3-kinase- and TRKB-mediated signalling pathways during neuronal differentiation in two subtypes of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *BMC Res. Notes* *1*, 95.
- Nouel, D., Faure, M.P., St Pierre, J.A., Alonso, R., Quirion, R., and Beaudet, A. (1997). Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 1795–1803.
- Nykjaer, A., and Willnow, T.E. (2012). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci.* *35*, 261–270.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* *427*, 843–848.
- Nykjaer, A., Willnow, T.E., and Petersen, C.M. (2005). p75^{NTR}--live or let die. *Curr. Opin. Neurobiol.* *15*, 49–57.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J. Biol. Chem.* *276*, 19452–19460.
- Obermeier, A., Halfter, H., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1993). Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *EMBO J.* *12*, 933–941.
- O'Brien, S.M., Claxton, D.F., Crump, M., Faderl, S., Kipps, T., Keating, M.J., Viallet, J., and Cheson, B.D. (2009). Phase I study of obatoclox mesylate (GX15-070), a small molecule



pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *113*, 299–305.

Ocejo-Garcia, M., Ahmed, S.I., Coulson, J.M., and Woll, P.J. (2001). Use of RT-PCR to detect co-expression of neuropeptides and their receptors in lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* *33*, 1–9.

Ohira, K., Kumanogoh, H., Sahara, Y., Homma, K.J., Hirai, H., Nakamura, S., and Hayashi, M. (2005). A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 1343–1353.

Ohira, K., Homma, K.J., Hirai, H., Nakamura, S., and Hayashi, M. (2006). TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *342*, 867–874.

Ohman, L., Franzén, L., Rudolph, U., Birnbaumer, L., and Hörnquist, E.H. (2002). Regression of Peyer's patches in G alpha i2 deficient mice prior to colitis is associated with reduced expression of Bcl-2 and increased apoptosis. *Gut* *51*, 392–397.

Olszewski, U., and Hamilton, G. (2009). Neurotensin signaling induces intracellular alkalinization and interleukin-8 expression in human pancreatic cancer cells. *Mol. Oncol.* *3*, 204–213.

Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., Davis, Z., Wiestner, A., Rosenwald, A., Thomas, P.W., Hamblin, T.J., Staudt, L.M., and Oscier, D.G. (2004). ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet Lond. Engl.* *363*, 105–111.

Orci, L., Baetens, O., Rufener, C., Brown, M., Vale, W., and Guillemin, R. (1976). Evidence for immunoreactive neurotensin in dog intestinal mucosa. *Life Sci.* *19*, 559–561.

Oscier, D.G., Gardiner, A.C., Mould, S.J., Glide, S., Davis, Z.A., Ibbotson, R.E., Corcoran, M.M., Chapman, R.M., Thomas, P.W., Copplestone, J.A., et al. (2002). Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* *100*, 1177–1184.

Oscier, D.G., Rose-Zerilli, M.J.J., Winkelmann, N., Gonzalez de Castro, D., Gomez, B., Forster, J., Parker, H., Parker, A., Gardiner, A., Collins, A., et al. (2013). The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* *121*, 468–475.

Oury-Donat, F., Thurneyssen, O., Gonalons, N., Forgez, P., Gully, D., Le Fur, G., and Soubrie, P. (1995). Characterization of the effect of SR48692 on inositol monophosphate, cyclic GMP and cyclic AMP responses linked to neurotensin receptor activation in neuronal and non-neuronal cells. *Br. J. Pharmacol.* *116*, 1899–1905.

Ouyang, Q., Gong, X., Xiao, H., Zhou, J., Xu, M., Dai, Y., Xu, L., Feng, H., Cui, H., and Yi, L. (2015). Neurotensin promotes the progression of malignant glioma through NTSR1 and impacts the prognosis of glioma patients. *Mol. Cancer* *14*, 21.

Ouyang, Q., Chen, G., Zhou, J., Li, L., Dong, Z., Yang, R., Xu, L., Cui, H., Xu, M., and Yi, L. (2016). Neurotensin signaling stimulates glioblastoma cell proliferation by upregulating c-Myc and inhibiting miR-29b-1 and miR-129-3p. *Neuro-Oncol.* *18*, 216–226.



Ouyang, Q., Zhou, J., Yang, W., Cui, H., Xu, M., and Yi, L. (2017). Oncogenic role of neurotensin and neurotensin receptors in various cancers. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *44*, 841–846.

Paneesha, S., and Milligan, D.W. (2005). Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* *128*, 145–152.

Pang, Y.P., Cusack, B., Groshan, K., and Richelson, E. (1996). Proposed ligand binding site of the transmembrane receptor for neurotensin(8-13). *J. Biol. Chem.* *271*, 15060–15068.

Parker, H., and Strefford, J.C. (2016). The mutational signature of chronic lymphocytic leukemia. *Biochem. J.* *473*, 3725–3740.

Patel, A.B., Tsilioni, I., Leeman, S.E., and Theoharides, T.C. (2016). Neurotensin stimulates sortilin and mTOR in human microglia inhibitable by methoxyluteolin, a potential therapeutic target for autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E7049–E7058.

Patterson, S.L., Abel, T., Deuel, T.A., Martin, K.C., Rose, J.C., and Kandel, E.R. (1996). Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* *16*, 1137–1145.

Patz, M., Isaeva, P., Forcob, N., Müller, B., Frenzel, L.P., Wendtner, C.-M., Klein, C., Umana, P., Hallek, M., and Krause, G. (2011). Comparison of the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* *152*, 295–306.

Pearse, R.N., Swendeman, S.L., Li, Y., Rafii, D., and Hempstead, B.L. (2005). A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* *105*, 4429–4436.

Pelaprat, D. (2006). Interactions between neurotensin receptors and G proteins. *Peptides* *27*, 2476–2487.

Pepper, C., Hoy, T., and Bentley, D.P. (1997). Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br. J. Cancer* *76*, 935–938.

Pepper, C., Hooper, K., Thomas, A., Hoy, T., and Bentley, P. (2001). Bcl-2 antisense oligonucleotides enhance the cytotoxicity of chlorambucil in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *Leuk. Lymphoma* *42*, 491–498.

Pepper, C., Thomas, A., Hoy, T., and Bentley, P. (2002). Antisense oligonucleotides complementary to Bax transcripts reduce the susceptibility of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells to apoptosis in a bcl-2 independent manner. *Leuk. Lymphoma* *43*, 2003–2009.

Pérez, P., Coll, P.M., Hempstead, B.L., Martín-Zanca, D., and Chao, M.V. (1995). NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol. Cell. Neurosci.* *6*, 97–105.

Perron, A., Sarret, P., Gendron, L., Stroh, T., and Beaudet, A. (2005). Identification and functional characterization of a 5-transmembrane domain variant isoform of the NTS2 neurotensin receptor in rat central nervous system. *J. Biol. Chem.* *280*, 10219–10227.

Petersen, C.M., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H.H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P., and Moestrup, S.K. (1997). Molecular identification



of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* *272*, 3599–3605.

Petlickovski, A., Laurenti, L., Li, X., Marietti, S., Chiusolo, P., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2005). Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* *105*, 4820–4827.

Pettibone, D.J., Hess, J.F., Hey, P.J., Jacobson, M.A., Leviten, M., Lis, E.V., Mallorga, P.J., Pascarella, D.M., Snyder, M.A., Williams, J.B., et al. (2002). The effects of deleting the mouse neurotensin receptor NTR1 on central and peripheral responses to neurotensin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *300*, 305–313.

Pfeifer, D., Pantic, M., Skatulla, I., Rawluk, J., Kreutz, C., Martens, U.M., Fisch, P., Timmer, J., and Veelken, H. (2007). Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood* *109*, 1202–1210.

Del Poeta, G., Dal Bo, M., Del Principe, M.I., Pozzo, F., Rossi, F.M., Zucchetto, A., Bomben, R., Degan, M., Rasi, S., Rossi, D., et al. (2013). Clinical significance of c.7544-7545 delCT NOTCH1 mutation in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* *160*, 415–418.

Poinot-Chazel, C., Portier, M., Bouaboula, M., Vita, N., Pecceu, F., Gully, D., Monroe, J.G., Maffrand, J.P., Le Fur, G., and Casellas, P. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase couples neurotensin receptor stimulation to induction of the primary response gene Krox-24. *Biochem. J.* *320 (Pt 1)*, 145–151.

Popp, E., Schneider, A., Vogel, P., Teschendorf, P., and Böttiger, B.W. (2007). Time course of the hypothermic response to continuously administered neurotensin. *Neuropeptides* *41*, 349–354.

Dal Porto, J.M., Gauld, S.B., Merrell, K.T., Mills, D., Pugh-Bernard, A.E., and Cambier, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Mol. Immunol.* *41*, 599–613.

Pospisilova, H., Baens, M., Michaux, L., Stul, M., Van Hummelen, P., Van Loo, P., Vermeesch, J., Jarosova, M., Zemanova, Z., Michalova, K., et al. (2007). Interstitial del(14)(q) involving IGH: a novel recurrent aberration in B-NHL. *Leukemia* *21*, 2079–2083.

Postigo, A., Calella, A.M., Fritsch, B., Knipper, M., Katz, D., Eilers, A., Schimmang, T., Lewin, G.R., Klein, R., and Minichiello, L. (2002). Distinct requirements for TrkB and TrkC signaling in target innervation by sensory neurons. *Genes Dev.* *16*, 633–645.

Powell, J.C., Twomey, C., Jain, R., and McCarthy, J.V. (2009). Association between Presenilin-1 and TRAF6 modulates regulated intramembrane proteolysis of the p75NTR neurotrophin receptor. *J. Neurochem.* *108*, 216–230.

Prakash, Y., Thompson, M.A., Meuchel, L., Pabelick, C.M., Mantilla, C.B., Zaidi, S., and Martin, R.J. (2010). Neurotrophins in lung health and disease. *Expert Rev. Respir. Med.* *4*, 395–411.

Purroy, N., Abrisqueta, P., Carabia, J., Carpio, C., Palacio, C., Bosch, F., and Crespo, M. (2015). Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo. *Oncotarget* *6*, 7632–7643.



- Put, N., Meeus, P., Chatelain, B., Rack, K., Boeckx, N., Nollet, F., Graux, C., Van Den Neste, E., Janssens, A., Madoe, V., et al. (2009). Translocation t(14;18) is not associated with inferior outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 23, 1201–1204.
- Pyne, N.J., and Pyne, S. (2011). Receptor tyrosine kinase-G-protein-coupled receptor signalling platforms: out of the shadow? *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 443–450.
- Qian, X., Riccio, A., Zhang, Y., and Ginty, D.D. (1998). Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. *Neuron* 21, 1017–1029.
- Qiu, M.S., and Green, S.H. (1991). NGF and EGF rapidly activate p21ras in PC12 cells by distinct, convergent pathways involving tyrosine phosphorylation. *Neuron* 7, 937–946.
- Quiroga, M.P., Balakrishnan, K., Kurtova, A.V., Sivina, M., Keating, M.J., Wierda, W.G., Gandhi, V., and Burger, J.A. (2009). B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood* 114, 1029–1037.
- Raghoebier, S., Krieken, J. van, Kluin-Nelemans, J.C., Gillis, A., Ommen, G. van, Ginsberg, A.M., Raffeld, M., and Kluin, P.M. (1991). Oncogene rearrangements in chronic B-cell leukemia. *Blood* 77, 1560–1564.
- Rai, K.R., and Montserrat, E. (1987). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Hematol.* 24, 252–256.
- Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., and Pasternack, B.S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46, 219–234.
- Rai, K.R., Peterson, B.L., Appelbaum, F.R., Kolitz, J., Elias, L., Shepherd, L., Hines, J., Threatte, G.A., Larson, R.A., Cheson, B.D., et al. (2000). Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 343, 1750–1757.
- Rai, K.R., Freter, C.E., Mercier, R.J., Cooper, M.R., Mitchell, B.S., Stadtmauer, E.A., Santabarbara, P., Wacker, B., and Brettman, L. (2002). Alemtuzumab in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients who also had received fludarabine. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 3891–3897.
- Raijmakers, R., Kraiczek, K., de Jong, A.P., Mohammed, S., and Heck, A.J.R. (2010). Exploring the human leukocyte phosphoproteome using a microfluidic reversed-phase-TiO₂-reversed-phase high-performance liquid chromatography phosphochip coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* 82, 824–832.
- Di Raimondo, F., Giustolisi, R., Lerner, S., Cacciola, E., O'Brien, S., Kantarjian, H., and Keating, M.J. (2001). Retrospective study of the prognostic role of serum thymidine kinase level in CLL patients with active disease treated with fludarabine. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 12, 621–625.
- Rajagopal, R., and Chao, M.V. (2006). A role for Fyn in Trk receptor transactivation by G-protein-coupled receptor signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* 33, 36–46.
- Rajagopal, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., and Chao, M.V. (2004). Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 6650–6658.



Ramez, M., Bagot, M., Nikolova, M., Boumsell, L., Vita, N., Chalon, P., Caput, D., Ferrara, P., and Bensussan, A. (2001). Functional characterization of neurotensin receptors in human cutaneous T cell lymphoma malignant lymphocytes. *J. Invest. Dermatol.* *117*, 687–693.

Rampazzo, E., Bonaldi, L., Trentin, L., Visco, C., Keppel, S., Giunco, S., Frezzato, F., Facco, M., Novella, E., Giaretta, I., et al. (2012). Telomere length and telomerase levels delineate subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia with different biological characteristics and clinical outcomes. *Haematologica* *97*, 56–63.

Rassenti, L.Z., Huynh, L., Toy, T.L., Chen, L., Keating, M.J., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., Flinn, I.W., Rai, K.R., Byrd, J.C., et al. (2004). ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *351*, 893–901.

Rassenti, L.Z., Jain, S., Keating, M.J., Wierda, W.G., Grever, M.R., Byrd, J.C., Kay, N.E., Brown, J.R., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., et al. (2008). Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *112*, 1923–1930.

Reichardt, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *361*, 1545–1564.

Reinecke, M. (1985). Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone. *Prog. Histochem. Cytochem.* *16*, 1–172.

Reinecke, M., Weihe, E., Carraway, R.E., Leeman, S.E., and Forssmann, W.G. (1982). Localization of neurotensin immunoreactive nerve fibers in the guinea-pig heart: evidence derived by immunohistochemistry, radioimmunoassay and chromatography. *Neuroscience* *7*, 1785–1795.

Remaury, A., Vita, N., Gendreau, S., Jung, M., Arnone, M., Poncelet, M., Culouscou, J.-M., Le Fur, G., Soubrié, P., Caput, D., et al. (2002). Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res.* *953*, 63–72.

Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* *338*, 383–384.

Richard, F., Barroso, S., Nicolas-Ethève, D., Kitabgi, P., and Labbé-Jullié, C. (2001a). Impaired G protein coupling of the neurotensin receptor 1 by mutations in extracellular loop 3. *Eur. J. Pharmacol.* *433*, 63–71.

Richard, F., Barroso, S., Martinez, J., Labbé-Jullié, C., and Kitabgi, P. (2001b). Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin receptor 2. *Mol. Pharmacol.* *60*, 1392–1398.

Robak, T., Bloński, J.Z., Kasznicki, M., Blasińska-Morawiec, M., Krykowski, E., Dmoszyńska, A., Mrugala-Spiwak, H., Skotnicki, A.B., Nowak, W., Konopka, L., et al. (2000). Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first-line therapy in chronic lymphocytic leukemia: report of a prospective, randomized, multicenter trial. *Blood* *96*, 2723–2729.

Robak, T., Dmoszynska, A., Solal-Céligny, P., Warzocha, K., Loscertales, J., Catalano, J., Afanasiev, B.V., Larratt, L., Geisler, C.H., Montillo, M., et al. (2010). Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with



fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 1756–1765.

Roberts, A.W., Seymour, J.F., Brown, J.R., Wierda, W.G., Kipps, T.J., Khaw, S.L., Carney, D.A., He, S.Z., Huang, D.C.S., Xiong, H., et al. (2012). Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 488–496.

Rodriguez-Tébar, A., Dechant, G., and Barde, Y.A. (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* *4*, 487–492.

Rodríguez-Tébar, A., Dechant, G., Götz, R., and Barde, Y.A. (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* *11*, 917–922.

De Rooij, M.F.M., Kuil, A., Geest, C.R., Eldering, E., Chang, B.Y., Buggy, J.J., Pals, S.T., and Spaargaren, M. (2012). The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *119*, 2590–2594.

Rooswinkel, R.W., van de Kooij, B., de Vries, E., Paauwe, M., Braster, R., Verheij, M., and Borst, J. (2014). Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood* *123*, 2806–2815.

Rosati, E., Sabatini, R., Rampino, G., Tabilio, A., Di Ianni, M., Fettucciari, K., Bartoli, A., Coaccioli, S., Screpanti, I., and Marconi, P. (2009). Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* *113*, 856–865.

Rose, C.R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K.W., and Konnerth, A. (2003). Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* *426*, 74–78.

Rosell, S., Thor, K., Rökaeus, A., Nyquist, O., Lewenhaupt, A., Kager, L., and Folkers, K. (1980). Plasma concentration of neurotensin-like immunoreactivity (NTLI) and lower esophageal sphincter (LES) pressure in man following infusion of (Gln4)-neurotensin. *Acta Physiol. Scand.* *109*, 369–375.

Roselli, S., Pundavela, J., Demont, Y., Faulkner, S., Keene, S., Attia, J., Jiang, C.C., Zhang, X.D., Walker, M.M., and Hondermarck, H. (2015). Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. *Oncotarget* *6*, 10473–10486.

Rossi, D., and Gaidano, G. (2016). Richter syndrome: pathogenesis and management. *Semin. Oncol.* *43*, 311–319.

Rossi, D., Sozzi, E., Puma, A., De Paoli, L., Rasi, S., Spina, V., Gozzetti, A., Tassi, M., Cencini, E., Raspadori, D., et al. (2009). The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br. J. Haematol.* *146*, 64–75.

Rossi, D., Bruscatto, A., Spina, V., Rasi, S., Khiabani, H., Messina, M., Fangazio, M., Vaisitti, T., Monti, S., Chiaretti, S., et al. (2011). Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* *118*, 6904–6908.



- Rossi, D., Spina, V., Forconi, F., Capello, D., Fangazio, M., Rasi, S., Martini, M., Gattei, V., Ramponi, A., Larocca, L.M., et al. (2012). Molecular history of Richter syndrome: origin from a cell already present at the time of chronic lymphocytic leukemia diagnosis. *Int. J. Cancer* *130*, 3006–3010.
- Rostène, W.H., and Alexander, M.J. (1997). Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front. Neuroendocrinol.* *18*, 115–173.
- Roux, P.P., and Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* *67*, 203–233.
- Roux, P.P., Bhakar, A.L., Kennedy, T.E., and Barker, P.A. (2001). The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* *276*, 23097–23104.
- Rovère, C., Barbero, P., and Kitabgi, P. (1996). Evidence that PC2 is the endogenous pro-neurotensin convertase in rMTC 6-23 cells and that PC1- and PC2-transfected PC12 cells differentially process pro-neurotensin. *J. Biol. Chem.* *271*, 11368–11375.
- Rozman, C., and Montserrat, E. (1995). Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *333*, 1052–1057.
- Ruberti, F., Capsoni, S., Comparini, A., Di Daniel, E., Franzot, J., Gonfloni, S., Rossi, G., Berardi, N., and Cattaneo, A. (2000). Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 2589–2601.
- Russwurm, G., Heinsch, M., Radkowski, R., Erlemann, R., Aul, C., Haase, S., and Giagounidis, A. (2010). Dasatinib induces complete remission in a patient with primary cerebral involvement of B-cell chronic lymphocytic leukemia failing chemotherapy. *Blood* *116*, 2617–2618.
- Saada, S., Marget, P., Fauchais, A.-L., Lise, M.-C., Chemin, G., Sindou, P., Martel, C., Delpy, L., Vidal, E., Jaccard, A., et al. (2012). Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 5293–5303.
- Saiya-Cork, K., Collins, R., Parkin, B., Ouillette, P., Kuizon, E., Kujawski, L., Erba, H., Campagnaro, E., Shedden, K., Kaminski, M., et al. (2011). A pathobiological role of the insulin receptor in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 2679–2692.
- Salehi, A.H., Roux, P.P., Kubu, C.J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L.L., Verdi, J.M., and Barker, P.A. (2000). NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* *27*, 279–288.
- Sarfati, M., Chevret, S., Chastang, C., Biron, G., Stryckmans, P., Delespesse, G., Binet, J.L., Merle-Beral, H., and Bron, D. (1996). Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *88*, 4259–4264.
- Sarret, P., Beaudet, A., Vincent, J.P., and Mazella, J. (1998). Regional and cellular distribution of low affinity neurotensin receptor mRNA in adult and developing mouse brain. *J. Comp. Neurol.* *394*, 344–356.



- Sarret, P., Perron, A., Stroh, T., and Beaudet, A. (2003). Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* *461*, 520–538.
- Sato, M., Kiyama, H., Yoshida, S., Saika, T., and Tohyama, M. (1991a). Postnatal ontogeny of cells expressing prepro-neurotensin/neuromedin N mRNA in the rat forebrain and midbrain: a hybridization histochemical study involving isotope-labeled and enzyme-labeled probes. *J. Comp. Neurol.* *310*, 300–315.
- Sato, M., Shiosaka, S., and Tohyama, M. (1991b). Neurotensin and neuromedin N elevate the cytosolic calcium concentration via transiently appearing neurotensin binding sites in cultured rat cortex cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *58*, 97–103.
- Sato, M., Kiyama, H., and Tohyama, M. (1992). Different postnatal development of cells expressing mRNA encoding neurotensin receptor. *Neuroscience* *48*, 137–149.
- Satterwhite, E., Sonoki, T., Willis, T.G., Harder, L., Nowak, R., Arriola, E.L., Liu, H., Price, H.P., Gesk, S., Steinemann, D., et al. (2001). The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* *98*, 3413–3420.
- Al-Sawaf, O., Fischer, K., Eichhorst, B., and Hallek, M. (2016). Targeted Therapy of CLL. *Oncol. Res. Treat.* *39*, 768–778.
- Saxena, A., Moshynska, O., Sankaran, K., Viswanathan, S., and Sheridan, D.P. (2002). Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett.* *187*, 199–205.
- Saxena, A., Viswanathan, S., Moshynska, O., Tandon, P., Sankaran, K., and Sheridan, D.P. (2004). Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* *75*, 22–33.
- Scarfò, L., Ferreri, A.J.M., and Ghia, P. (2016). Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *104*, 169–182.
- Von Schack, D., Casademunt, E., Schweigreiter, R., Meyer, M., Bibel, M., and Dechant, G. (2001). Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nat. Neurosci.* *4*, 977–978.
- Schaeffer, P., Laplace, M.C., Bernat, A., Prabonnaud, V., Gully, D., Lespy, L., and Herbert, J.M. (1998). SR142948A is a potent antagonist of the cardiovascular effects of neurotensin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *31*, 545–550.
- Schaffner, C., Stilgenbauer, S., Rappold, G.A., Döhner, H., and Lichter, P. (1999). Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *94*, 748–753.
- Scharenberg, A.M., Humphries, L.A., and Rawlings, D.J. (2007). Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 778–789.
- Schenone, A., Gill, J.S., Zacharias, D.A., and Windebank, A.J. (1996). Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* *64*, 141–149.



- Schotte, A., Leysen, J.E., and Laduron, P.M. (1986). Evidence for a displaceable non-specific [³H]neurotensin binding site in rat brain. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* *333*, 400–405.
- Schotte, A., Rostène, W., and Laduron, P.M. (1988). Different subcellular localization of neurotensin-receptor and neurotensin-acceptor sites in the rat brain dopaminergic system. *J. Neurochem.* *50*, 1026–1031.
- Schriever, F., and Huhn, D. (2003). New directions in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* *63*, 953–969.
- Schroers, R., Griesinger, F., Trümper, L., Haase, D., Kulle, B., Klein-Hitpass, L., Sellmann, L., Dührsen, U., and Dürig, J. (2005). Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *19*, 750–758.
- Schröttner, P., Leick, M., and Burger, M. (2010). The role of chemokines in B cell chronic lymphocytic leukaemia: pathophysiological aspects and clinical impact. *Ann. Hematol.* *89*, 437–446.
- Schuhmann, B., Dietrich, A., Sel, S., Hahn, C., Klingenspor, M., Lommatzsch, M., Gudermann, T., Braun, A., Renz, H., and Nockher, W.A. (2005). A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J. Neuroimmunol.* *163*, 15–23.
- Schultzberg, M., Hökfelt, T., Nilsson, G., Terenius, L., Rehfeld, J.F., Brown, M., Elde, R., Goldstein, M., and Said, S. (1980). Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastro-intestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine beta-hydroxylase. *Neuroscience* *5*, 689–744.
- Schwarzmeier, J.D., Shehata, M., Hilgarth, M., Marschitz, I., Louda, N., Hubmann, R., and Greil, R. (2002). The role of soluble CD23 in distinguishing stable and progressive forms of B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* *43*, 549–554.
- Sehgal, I., Powers, S., Huntley, B., Powis, G., Pittelkow, M., and Maihle, N.J. (1994). Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 4673–4677.
- Selbekk, B.H., Flaten, O., and Hanssen, L.E. (1980). The in vitro effect of neurotensin on human jejunal mast cells. *Scand. J. Gastroenterol.* *15*, 457–460.
- Sellmann, L., de Beer, D., Bartels, M., Opalka, B., Nüchel, H., Dührsen, U., Dürig, J., Seifert, M., Siemer, D., Küppers, R., et al. (2011). Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Int. J. Hematol.* *93*, 74–82.
- Servotte, S., Camby, I., Debeir, O., Deroanne, C., Lambert, C.A., Lapière, C.M., Kiss, R., Nussgens, B., and Decaestecker, C. (2006). The in vitro influences of neurotensin on the motility characteristics of human U373 glioblastoma cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *32*, 575–584.
- Seymour, J.F., Ma, S., Brander, D.M., Choi, M.Y., Barrientos, J., Davids, M.S., Anderson, M.A., Beaven, A.W., Rosen, S.T., Tam, C.S., et al. (2017). Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. *Lancet Oncol.* *18*, 230–240.



- Sheng, M., and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* *24*, 1–29.
- Shi, J., and Kandror, K.V. (2005). Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *Dev. Cell* *9*, 99–108.
- Shimizu, S., Tsukada, J., Sugimoto, T., Kikkawa, N., Sasaki, K., Chazono, H., Hanazawa, T., Okamoto, Y., and Seki, N. (2008). Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway. *Int. J. Cancer* *123*, 1816–1823.
- Da Silva, L., Neves, B.M., Moura, L., Cruz, M.T., and Carvalho, E. (2011). Neurotensin downregulates the pro-inflammatory properties of skin dendritic cells and increases epidermal growth factor expression. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 1863–1871.
- Skaper, S.D. (2008). The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* *7*, 46–62.
- Skaper, S.D. (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *846*, 1–12.
- Skeldal, S., Sykes, A.M., Glerup, S., Matusica, D., Palstra, N., Autio, H., Boskovic, Z., Madsen, P., Castrén, E., Nykjaer, A., et al. (2012). Mapping of the interaction site between sortilin and the p75 neurotrophin receptor reveals a regulatory role for the sortilin intracellular domain in p75 neurotrophin receptor shedding and apoptosis. *J. Biol. Chem.* *287*, 43798–43809.
- Slusher, B.S., Zacco, A.E., Maslanski, J.A., Norris, T.E., McLane, M.W., Moore, W.C., Rogers, N.E., and Ignarro, L.J. (1994). The cloned neurotensin receptor mediates cyclic GMP formation when coexpressed with nitric oxide synthase cDNA. *Mol. Pharmacol.* *46*, 115–121.
- Smolej, L. (2015). Targeted treatment for chronic lymphocytic leukemia: clinical potential of obinutuzumab. *Pharmacogenomics Pers. Med.* *8*, 1–7.
- Sniderhan, L.F., Garcia-Bates, T.M., Burgart, M., Bernstein, S.H., Phipps, R.P., and Maggirwar, S.B. (2009). Neurotrophin signaling through tropomyosin receptor kinases contributes to survival and proliferation of non-Hodgkin lymphoma. *Exp. Hematol.* *37*, 1295–1309.
- Söder, O., and Hellström, P.M. (1987). Neuropeptide regulation of human thymocyte, guinea pig T lymphocyte and rat B lymphocyte mitogenesis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* *84*, 205–211.
- Soderquist, R., Bates, D.J.P., Danilov, A.V., and Eastman, A. (2013). Gossypol overcomes stroma-mediated resistance to the BCL2 inhibitor ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia cells ex vivo. *Leukemia* *27*, 2262–2264.
- Sole, C., Dolcet, X., Segura, M.F., Gutierrez, H., Diaz-Meco, M.-T., Gozzelino, R., Sanchis, D., Bayascas, J.R., Gallego, C., Moscat, J., et al. (2004). The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kapp B signaling. *J. Cell Biol.* *167*, 479–492.



- Somaï, S., Gompel, A., Rostène, W., and Forgez, P. (2002a). Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *295*, 482–488.
- Somaï, S., Gompel, A., Rostène, W., and Forgez, P. (2002b). Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *295*, 482–488.
- Souazé, F., Viardot-Foucault, V., Rouillet, N., Toy-Miou-Leong, M., Gompel, A., Bruyneel, E., Comperat, E., Faux, M.C., Mareel, M., Rostène, W., et al. (2006a). Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/beta-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis* *27*, 708–716.
- Souazé, F., Dupouy, S., Viardot-Foucault, V., Bruyneel, E., Attoub, S., Gespach, C., Gompel, A., and Forgez, P. (2006b). Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res.* *66*, 6243–6249.
- Speedy, H.E., Di Bernardo, M.C., Sava, G.P., Dyer, M.J.S., Holroyd, A., Wang, Y., Sunter, N.J., Mansouri, L., Juliusson, G., Smedby, K.E., et al. (2014). A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* *46*, 56–60.
- Stankovic, T., Weber, P., Stewart, G., Bedenham, T., Murray, J., Byrd, P.J., Moss, P.A., and Taylor, A.M. (1999). Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet Lond. Engl.* *353*, 26–29.
- Stephens, R.M., Loeb, D.M., Copeland, T.D., Pawson, T., Greene, L.A., and Kaplan, D.R. (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* *12*, 691–705.
- Sternini, C., Su, D., Arakawa, J., de Giorgio, R., Rickman, D.W., Davis, B.M., Albers, K.M., and Brecha, N.C. (1996). Cellular localization of Pan-trk immunoreactivity and trkC mRNA in the enteric nervous system. *J. Comp. Neurol.* *368*, 597–607.
- Steurer, M., Pall, G., Richards, S., Schwarzer, G., Bohlius, J., and Greil, R. (2006). Purine antagonists for chronic lymphocytic leukaemia. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004270.
- Stevenson, F.K., Krysov, S., Davies, A.J., Steele, A.J., and Packham, G. (2011). B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *118*, 4313–4320.
- St-Gelais, F., Jomphe, C., and Trudeau, L.-E. (2006). The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J. Psychiatry Neurosci. JPN* *31*, 229–245.
- Stilgenbauer, S., and Döhner, H. (2002). Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* *347*, 452–453.
- Stilgenbauer, S., Bullinger, L., Benner, A., Wildenberger, K., Bentz, M., Döhner, K., Ho, A.D., Lichter, P., and Döhner, H. (1999). Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *13*, 1331–1334.
- Stilgenbauer, S., Sander, S., Bullinger, L., Benner, A., Leupolt, E., Winkler, D., Kröber, A., Kienle, D., Lichter, P., and Döhner, H. (2007). Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* *92*, 1242–1245.



- Stilgenbauer, S., Eichhorst, B., Schetelig, J., Coutre, S., Seymour, J.F., Munir, T., Puvvada, S.D., Wendtner, C.-M., Roberts, A.W., Jurczak, W., et al. (2016). Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* *17*, 768–778.
- Stoilov, P., Castren, E., and Stamm, S. (2002). Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *290*, 1054–1065.
- Strati, P., and Caligaris-Cappio, F. (2011). A matter of debate in chronic lymphocytic leukemia: is the occurrence of autoimmune disorders an indicator of chronic lymphocytic leukemia therapy? *Curr. Opin. Oncol.* *23*, 455–460.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K., and Finkel, T. (1995). Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* *270*, 296–299.
- Suwaki, N., Vanhecke, E., Atkins, K.M., Graf, M., Swabey, K., Huang, P., Schraml, P., Moch, H., Cassidy, A.M., Brewer, D., et al. (2011). A HIF-regulated VHL-PTP1B-Src signaling axis identifies a therapeutic target in renal cell carcinoma. *Sci. Transl. Med.* *3*, 85ra47.
- Swift, S.L., Burns, J.E., and Maitland, N.J. (2010). Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. *Cancer Res.* *70*, 347–356.
- Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Desantis, G., Tessitore, A., Vetusch, A., Sferra, R., Rucci, N., Argenti, B., Screpanti, I., et al. (2004). TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* *6*, 347–360.
- Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Cea, G., Panella, S., Chioda, A., Gallo, R., Cinque, B., Sferra, R., Vetusch, A., et al. (2007). TrkAIII expression in the thymus. *J. Neuroimmunol.* *183*, 151–161.
- Takatsu, H., Katoh, Y., Shiba, Y., and Nakayama, K. (2001). Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding (GGA) proteins interact with acidic dileucine sequences within the cytoplasmic domains of sorting receptors through their Vps27p/Hrs/STAM (VHS) domains. *J. Biol. Chem.* *276*, 28541–28545.
- Tam, S.Y., Tsai, M., Yamaguchi, M., Yano, K., Butterfield, J.H., and Galli, S.J. (1997). Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood* *90*, 1807–1820.
- Tanaka, K., Masu, M., and Nakanishi, S. (1990). Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* *4*, 847–854.
- Tang, K.H., Ma, S., Lee, T.K., Chan, Y.P., Kwan, P.S., Tong, C.M., Ng, I.O., Man, K., To, K.-F., Lai, P.B., et al. (2012). CD133(+) liver tumor-initiating cells promote tumor angiogenesis, growth, and self-renewal through neurotensin/interleukin-8/CXCL1 signaling. *Hepatology* *55*, 807–820.
- Taniuchi, M., Johnson, E.M., Roach, P.J., and Lawrence, J.C. (1986). Phosphorylation of nerve growth factor receptor proteins in sympathetic neurons and PC12 cells. In vitro phosphorylation by the cAMP-independent protein kinase FA/GSK-3. *J. Biol. Chem.* *261*, 13342–13349.



- Tavares, D., Tully, K., and Dobner, P.R. (1999). Sequences required for induction of neurotensin receptor gene expression during neuronal differentiation of N1E-115 neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 30066–30079.
- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., et al. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 5455–5463.
- Thiele, C.J., Li, Z., and McKee, A.E. (2009). On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 5962–5967.
- Thomas, J.B., Giddings, A.M., Wieth, R.W., Olepu, S., Warner, K.R., Sarret, P., Gendron, L., Longpre, J.-M., Zhang, Y., Runyon, S.P., et al. (2014). Identification of 1-([1-(4-fluorophenyl)-5-(2-methoxyphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]carbonyl)amino)cyclohexane carboxylic acid as a selective nonpeptide neurotensin receptor type 2 compound. *J. Med. Chem.* *57*, 5318–5332.
- Thomas, S.M., DeMarco, M., D’Arcangelo, G., Halegoua, S., and Brugge, J.S. (1992). Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell* *68*, 1031–1040.
- Thomas, W.G., Brandenburger, Y., Autelitano, D.J., Pham, T., Qian, H., and Hannan, R.D. (2002). Adenoviral-directed expression of the type 1A angiotensin receptor promotes cardiomyocyte hypertrophy via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Circ. Res.* *90*, 135–142.
- Ticchioni, M., Essafi, M., Jeandel, P.Y., Davi, F., Cassuto, J.P., Deckert, M., and Bernard, A. (2007). Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene* *26*, 7081–7091.
- Tobin, G., Thunberg, U., Johnson, A., Eriksson, I., Söderberg, O., Karlsson, K., Merup, M., Juliusson, G., Vilpo, J., Enblad, G., et al. (2003). Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood* *101*, 4952–4957.
- Toman, R.E., Payne, S.G., Watterson, K.R., Maceyka, M., Lee, N.H., Milstien, S., Bigbee, J.W., and Spiegel, S. (2004). Differential transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors modulates NGF-induced neurite extension. *J. Cell Biol.* *166*, 381–392.
- Tomasi, M.L., Ryoo, M., Ramani, K., Tomasi, I., Giordano, P., Mato, J.M., and Lu, S.C. (2015). Methionine adenosyltransferase $\alpha 2$ sumoylation positively regulate Bcl-2 expression in human colon and liver cancer cells. *Oncotarget* *6*, 37706–37723.
- Tooze, S.A. (2001). Cell biology. GGAs tie up the loose ends. *Science* *292*, 1663–1665.
- Torcia, M., Bracci-Laudiero, L., Lucibello, M., Nencioni, L., Labardi, D., Rubartelli, A., Cozzolino, F., Aloe, L., and Garaci, E. (1996). Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* *85*, 345–356.
- Trbusek, M., Malcikova, J., Smardova, J., Kuhrova, V., Mentzlova, D., Francova, H., Bukovska, S., Svitakova, M., Kuglik, P., Linkova, V., et al. (2006). Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia* *20*, 1159–1161.



- Troppmair, J., Bruder, J.T., App, H., Cai, H., Liptak, L., Szeberényi, J., Cooper, G.M., and Rapp, U.R. (1992). Ras controls coupling of growth factor receptors and protein kinase C in the membrane to Raf-1 and B-Raf protein serine kinases in the cytosol. *Oncogene* 7, 1867–1873.
- Truzzi, F., Marconi, A., Lotti, R., Dallaglio, K., French, L.E., Hempstead, B.L., and Pincelli, C. (2008). Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2031–2040.
- Tsimberidou, A.-M., and Keating, M.J. (2005). Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer* 103, 216–228.
- Tsimberidou, A.M., O'Brien, S.M., Cortes, J.E., Faderl, S., Andreeff, M., Kantarjian, H.M., Keating, M.J., and Giles, F.J. (2002). Phase II study of fludarabine, cytarabine (Ara-C), cyclophosphamide, cisplatin and GM-CSF (FACPGM) in patients with Richter's syndrome or refractory lymphoproliferative disorders. *Leuk. Lymphoma* 43, 767–772.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097–1099.
- Turner, J.T., James-Kracke, M.R., and Camden, J.M. (1990). Regulation of the neurotensin receptor and intracellular calcium mobilization in HT29 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 1049–1056.
- Tyler, B.M., Jansen, K., McCormick, D.J., Douglas, C.L., Boules, M., Stewart, J.A., Zhao, L., Lacy, B., Cusack, B., Fauq, A., et al. (1999). Peptide nucleic acids targeted to the neurotensin receptor and administered i.p. cross the blood-brain barrier and specifically reduce gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7053–7058.
- Tyler-McMahon, B.M., Boules, M., and Richelson, E. (2000). Neurotensin: peptide for the next millennium. *Regul. Pept.* 93, 125–136.
- Uhl, G.R., Kuhar, M.J., and Snyder, S.H. (1977). Neurotensin: immunohistochemical localization in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 4059–4063.
- Underwood, C.K., Reid, K., May, L.M., Bartlett, P.F., and Coulson, E.J. (2008). Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 346–358.
- Vaegter, C.B., Jansen, P., Fjorback, A.W., Glerup, S., Skeldal, S., Kjolby, M., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J.R., Tessarollo, L., et al. (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat. Neurosci.* 14, 54–61.
- Vanisberg, M.A., Maloteaux, J.M., Octave, J.N., and Laduron, P.M. (1991). Rapid agonist-induced decrease of neurotensin receptors from the cell surface in rat cultured neurons. *Biochem. Pharmacol.* 42, 2265–2274.
- Vanneste, Y., Thome, A.N., Vandersmissen, E., Charlet, C., Franchimont, D., Martens, H., Lhiaubet, A.M., Schimpff, R.M., Rostène, W., and Geenen, V. (1997). Identification of neurotensin-related peptides in human thymic epithelial cell membranes and relationship with major histocompatibility complex class I molecules. *J. Neuroimmunol.* 76, 161–166.



- Vasiadi, M., Mondolfi, A.P., Alysandratos, K.-D., Therianou, A., Katsarou-Katsari, A., Petrakopoulou, T., Theoharidis, A., Miniati, A., and Theoharides, T.C. (2013). Neurotensin serum levels and skin gene expression are increased in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* *169*, 695–699.
- Vega, J.A., García-Suárez, O., Hannestad, J., Pérez-Pérez, M., and Germanà, A. (2003). Neurotrophins and the immune system. *J. Anat.* *203*, 1–19.
- Véronèse, L., Tournilhac, O., Callanan, M., Prie, N., Kwiatkowski, F., Combes, P., Chauvet, M., Davi, F., Gouas, L., Verrelle, P., et al. (2013). Telomeres and chromosomal instability in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *27*, 490–493.
- Vias, M., Burt, G., Culig, Z., Veerakumarasivam, A., Neal, D.E., and Mills, I.G. (2007). A role for neurotensin in bicalutamide resistant prostate cancer cells. *The Prostate* *67*, 190–202.
- Vilar, M., Charalampopoulos, I., Kenchappa, R.S., Simi, A., Karaca, E., Reversi, A., Choi, S., Bothwell, M., Mingarro, I., Friedman, W.J., et al. (2009). Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* *62*, 72–83.
- Vincent, B., Vincent, J.P., and Checler, F. (1994). Neurotensin and neuromedin N undergo distinct catabolic processes in murine astrocytes and primary cultured neurons. *Eur. J. Biochem.* *221*, 297–306.
- Vincent, J.P., Mazella, J., and Kitabgi, P. (1999). Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* *20*, 302–309.
- Visentin, A., Gurrieri, C., Imbergamo, S., Lessi, F., Di Maggio, S.A., Frezzato, F., Adami, F., Zambello, R., Piazza, F., Semenzato, G., et al. (2016). Epidemiology and risk factors of invasive fungal infections in a large cohort of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol.*
- Vita, N., Laurent, P., Lefort, S., Chalon, P., Dumont, X., Kaghad, M., Gully, D., Le Fur, G., Ferrara, P., and Caput, D. (1993). Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett.* *317*, 139–142.
- Vita, N., Oury-Donat, F., Chalon, P., Guillemot, M., Kaghad, M., Bachy, A., Thurneysen, O., Garcia, S., Poinot-Chazel, C., Casellas, P., et al. (1998). Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur. J. Pharmacol.* *360*, 265–272.
- Vogel, K.S., El-Afandi, M., and Parada, L.F. (2000). Neurofibromin negatively regulates neurotrophin signaling through p21ras in embryonic sensory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *15*, 398–407.
- Vrhovac, R., Delmer, A., Tang, R., Marie, J.P., Zittoun, R., and Ajchenbaum-Cymbalista, F. (1998). Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* *91*, 4694–4700.
- Walker, N., Lepee-Lorgeoux, I., Fournier, J., Betancur, C., Rostene, W., Ferrara, P., and Caput, D. (1998). Tissue distribution and cellular localization of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor mRNA in adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *57*, 193–200.
- Walter, H.S., Rule, S.A., Dyer, M.J.S., Karlin, L., Jones, C., Cazin, B., Quittet, P., Shah, N., Hutchinson, C.V., Honda, H., et al. (2016). A phase 1 clinical trial of the selective BTK



- inhibitor ONO/GS-4059 in relapsed and refractory mature B-cell malignancies. *Blood* 127, 411–419.
- Wang, H.L., and Wu, T. (1996). G alpha q/11 mediates neurotensin excitation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 36, 29–36.
- Wang, J.-G., Li, N.-N., Li, H.-N., Cui, L., and Wang, P. (2011). Pancreatic cancer bears overexpression of neurotensin and neurotensin receptor subtype-1 and SR 48692 counteracts neurotensin induced cell proliferation in human pancreatic ductal carcinoma cell line PANC-1. *Neuropeptides* 45, 151–156.
- Wang, L., Friess, H., Zhu, Z., Graber, H., Zimmermann, A., Korc, M., Reubi, J.C., and Büchler, M.W. (2000). Neurotensin receptor-1 mRNA analysis in normal pancreas and pancreatic disease. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 566–571.
- Wang, W.-Q., Liu, L., Sun, H.-C., Fu, Y.-L., Xu, H.-X., Chai, Z.-T., Zhang, Q.-B., Kong, L.-Q., Zhu, X.-D., Lu, L., et al. (2012). Tanshinone IIA inhibits metastasis after palliative resection of hepatocellular carcinoma and prolongs survival in part via vascular normalization. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 5, 69.
- Watson, F.L., Porcionatto, M.A., Bhattacharyya, A., Stiles, C.D., and Segal, R.A. (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J. Neurobiol.* 39, 323–336.
- Weiss, N.S. (1979). Geographical variation in the incidence of the leukemias and lymphomas. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 139–142.
- Weiss, A., and Schlessinger, J. (1998). Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell* 94, 277–280.
- Wetzker, R., and Böhmer, F.-D. (2003). Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 651–657.
- Wiernik, P.H., Ashwin, M., Hu, X.P., Paietta, E., and Brown, K. (2001). Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 113, 407–414.
- Wiestner, A. (2012). Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2012, 88–96.
- Willimott, S., and Wagner, S.D. (2010). Post-transcriptional and post-translational regulation of Bcl2. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1571–1575.
- Wilson, C.M., Naves, T., Saada, S., Pinet, S., Vincent, F., Lalloué, F., and Jauberteau, M.-O. (2014a). The implications of sortilin/vps10p domain receptors in neurological and human diseases. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 13, 1354–1365.
- Wilson, C.M., Naves, T., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloué, F., and Jauberteau, M.-O. (2014b). Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J. Cell Sci.* 127, 3983–3997.
- Wlodarska, I., Matthews, C., Veyt, E., Pospisilova, H., Catherwood, M.A., Poulsen, T.S., Vanhentenrijk, V., Ibbotson, R., Vandenberghe, P., Morris, T.C.M.C., et al. (2007). Telomeric IGH losses detectable by fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia reflect somatic VH recombination events. *J. Mol. Diagn. JMD* 9, 47–54.



- Wong, S.T., Henley, J.R., Kanning, K.C., Huang, K., Bothwell, M., and Poo, M. (2002). A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat. Neurosci.* 5, 1302–1308.
- Wooten, M.W., Seibenhener, M.L., Mamidipudi, V., Diaz-Meco, M.T., Barker, P.A., and Moscat, J. (2001). The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 276, 7709–7712.
- Wu, C., Lai, C.F., and Mobley, W.C. (2001). Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 5406–5416.
- Wu, Z., Galmiche, A., Liu, J., Stadler, N., Wendum, D., Segal-Bendirdjian, E., Paradis, V., and Forgez, P. (2017). Neurotensin regulation induces overexpression and activation of EGFR in HCC and restores response to erlotinib and sorafenib. *Cancer Lett.* 388, 73–84.
- Xia, D., Li, W., Zhang, L., Qian, H., Yao, S., and Qi, X. (2014). RNA interference-mediated knockdown of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes cell cycle arrest and apoptosis in B-cell lymphoma cells. *Neoplasma* 61, 523–532.
- Xing, J., Ginty, D.D., and Greenberg, M.E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273, 959–963.
- Yaktapour, N., Übelhart, R., Schüller, J., Aumann, K., Dierks, C., Burger, M., Pfeifer, D., Jumaa, H., Veelken, H., Brummer, T., et al. (2013). Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) as a novel target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 122, 1621–1633.
- Yamada, M., Yamada, M., Watson, M.A., and Richelson, E. (1993). Neurotensin stimulates cyclic AMP formation in CHO-rNTR-10 cells expressing the cloned rat neurotensin receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 244, 99–101.
- Yamada, M., Yamada, M., Watson, M.A., and Richelson, E. (1994). Deletion mutation in the putative third intracellular loop of the rat neurotensin receptor abolishes polyphosphoinositide hydrolysis but not cyclic AMP formation in CHO-K1 cells. *Mol. Pharmacol.* 46, 470–476.
- Yamada, M., Yamada, M., Lombet, A., Forgez, P., and Rostène, W. (1998). Distinct functional characteristics of levocabastine sensitive rat neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci.* 62, PL 375–380.
- Yamashita, T., Tucker, K.L., and Barde, Y.A. (1999). Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24, 585–593.
- Yan, H., and Chao, M.V. (1991). Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J. Biol. Chem.* 266, 12099–12104.
- Yano, H., and Chao, M.V. (2000). Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm. Acta Helv.* 74, 253–260.
- Yano, H., Torkin, R., Martin, L.A., Chao, M.V., and Teng, K.K. (2009). Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: evidence for retrograde-directed cell killing. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 14790–14802.
- Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J.J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C.A., et al. (1999). TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J. Biol. Chem.* 274, 30202–30208.



- Ye, Y., Long, X., Zhang, L., Chen, J., Liu, P., Li, H., Wei, F., Yu, W., Ren, X., and Yu, J. (2016). NTS/NTR1 co-expression enhances epithelial-to-mesenchymal transition and promotes tumor metastasis by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7, 70303–70322.
- Yeiser, E.C., Rutkoski, N.J., Naito, A., Inoue, J., and Carter, B.D. (2004). Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in *traf6*^{-/-} mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 10521–10529.
- Yoffe, G., Howard-Peebles, P.N., Smith, R.G., Tucker, P.W., and Buchanan, G.R. (1990). Childhood chronic lymphocytic leukemia with (2;14) translocation. *J. Pediatr.* 116, 114–117.
- York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W., and Stork, P.J. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392, 622–626.
- York, R.D., Molliver, D.C., Grewal, S.S., Stenberg, P.E., McCleskey, E.W., and Stork, P.J. (2000). Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8069–8083.
- Younes, M., Wu, Z., Dupouy, S., Lupo, A.M., Mourra, N., Takahashi, T., Fléjou, J.F., Trédaniel, J., Régnard, J.F., Damotte, D., et al. (2014). Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget* 5, 8252–8269.
- Young, J.-A.H. (2011). Epidemiology and management of infectious complications of contemporary management of chronic leukemias. *Infect. Disord. Drug Targets* 11, 3–10.
- Yu, J., Ren, X., Chen, Y., Liu, P., Wei, X., Li, H., Ying, G., Chen, K., Winkler, H., and Hao, X. (2013). Dysfunctional activation of neurotensin/IL-8 pathway in hepatocellular carcinoma is associated with increased inflammatory response in microenvironment, more epithelial mesenchymal transition in cancer and worse prognosis in patients. *PLoS One* 8, e56069.
- Yuille, M.R., Matutes, E., Marossy, A., Hilditch, B., Catovsky, D., and Houlston, R.S. (2000). Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br. J. Haematol.* 109, 794–799.
- Zent, C.S., and Kay, N.E. (2010). Autoimmune complications in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 23, 47–59.
- Zenz, T., Kröber, A., Scherer, K., Häbe, S., Bühler, A., Benner, A., Denzel, T., Winkler, D., Edelmann, J., Schwänen, C., et al. (2008). Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 112, 3322–3329.
- Zenz, T., Mohr, J., Edelmann, J., Sarno, A., Hoth, P., Heuberger, M., Helfrich, H., Mertens, D., Dohner, H., and Stilgenbauer, S. (2009). Treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia: the role of the p53 pathway. *Leuk. Lymphoma* 50, 510–513.
- Zhang, X., Xu, Z.Q., Bao, L., Dagerlind, A., and Hökfelt, T. (1995). Complementary distribution of receptors for neurotensin and NPY in small neurons in rat lumbar DRGs and regulation of the receptors and peptides after peripheral axotomy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 2733–2747.



- Zhang, Y., Matthiesen, P., Harder, S., Siebert, R., Castoldi, G., Calasanz, M.J., Wong, K.F., Rosenwald, A., Ott, G., Atkin, N.B., et al. (2000). A 3-cM commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 52–58.
- Zhang, Y., Zhu, S., Yi, L., Liu, Y., and Cui, H. (2014). Neurotensin receptor1 antagonist SR48692 reduces proliferation by inducing apoptosis and cell cycle arrest in melanoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* 389, 1–8.
- Zhao, D., Kuhnt-Moore, S., Zeng, H., Wu, J.S., Moyer, M.P., and Pothoulakis, C. (2003). Neurotensin stimulates IL-8 expression in human colonic epithelial cells through Rho GTPase-mediated NF-kappa B pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C1397–C1404.
- Zhao, D., Zhan, Y., Zeng, H., Koon, H.W., Moyer, M.P., and Pothoulakis, C. (2007). Neurotensin stimulates expression of early growth response gene-1 and EGF receptor through MAP kinase activation in human colonic epithelial cells. *Int. J. Cancer* 120, 1652–1656.
- Zhao, D., Bakirtzi, K., Zhan, Y., Zeng, H., Koon, H.W., and Pothoulakis, C. (2011). Insulin-like growth factor-1 receptor transactivation modulates the inflammatory and proliferative responses of neurotensin in human colonic epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 286, 6092–6099.
- Zheng, W.-H., Kar, S., and Quirion, R. (2002). FKHRL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *J. Neurochem.* 80, 1049–1061.
- Zhou, J., Yi, L., Ouyang, Q., Xu, L., Cui, H., and Xu, M. (2014). Neurotensin signaling regulates stem-like traits of glioblastoma stem cells through activation of IL-8/CXCR1/STAT3 pathway. *Cell. Signal.* 26, 2896–2902.
- Zsürger, N., Chabry, J., Coquerel, A., and Vincent, J.P. (1992). Ontogenesis and binding properties of high-affinity neurotensin receptors in human brain. *Brain Res.* 586, 303–310.
- Zsürger, N., Mazella, J., and Vincent, J.P. (1994). Solubilization and purification of a high affinity neurotensin receptor from newborn human brain. *Brain Res.* 639, 245–252.
- Zupan, A.A., Osborne, P.A., Smith, C.E., Siegel, N.R., Leimgruber, R.M., and Johnson, E.M. (1989). Identification, purification, and characterization of truncated forms of the human nerve growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 11714–11720.
- Zupo, S., Massara, R., Dono, M., Rossi, E., Malavasi, F., Cosulich, M.E., and Ferrarini, M. (2000). Apoptosis or plasma cell differentiation of CD38-positive B-chronic lymphocytic leukemia cells induced by cross-linking of surface IgM or IgD. *Blood* 95, 1199–1206.





Annexe





RESEARCH ARTICLE

IL22/IL-22R Pathway Induces Cell Survival in Human Glioblastoma Cells

Hussein Akil^{1*}, Amazigh Abbaci¹, Fabrice Lalloué¹, Barbara Bessette¹, Léa M. M. Costes¹, Linda Domballe¹, Sandrine Charreau², Karline Guilloteau^{3,4}, Lucie Karayan-Tapon^{3,4}, François-Xavier Bernard^{2,5}, Franck Morel², Marie-Odile Jauberteau¹, Jean-Claude Lecron^{2,6}

1 Laboratoire Homéostasie Cellulaire et Pathologies (LHCP-EA 3842), Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Limoges, Limoges, France, **2** Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC-EA 4331), Université de Poitiers, Poitiers, France, **3** INSERM U1084, Université de Poitiers, Poitiers, France, **4** Laboratoire de Cancérologie Biologique, CHU de Poitiers, Poitiers, France, **5** BIOalternatives, Gençay, France, **6** Service Immunologie et inflammation, CHU de Poitiers, Poitiers, France

✉ These authors contributed equally to this work.
* hussein.akil@outlook.fr



 OPEN ACCESS

Citation: Akil H, Abbaci A, Lalloué F, Bessette B, Costes LMM, Domballe L, et al. (2015) IL22/IL-22R Pathway Induces Cell Survival in Human Glioblastoma Cells. PLoS ONE 10(3): e0119872. doi:10.1371/journal.pone.0119872

Academic Editor: Bernhard Ryffel, French National Centre for Scientific Research, FRANCE

Received: November 19, 2014

Accepted: February 2, 2015

Published: March 20, 2015

Copyright: © 2015 Akil et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by grants from the Pôle de Recherche et d'Enseignement Supérieur (PRES) Limousin Poitou-Charentes and the Conseil Régional du Limousin; MOJ JCL. BIOalternatives provided support in the form of salaries for authors [FXB], but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of this author are articulated in the 'author contributions' section.

Abstract

Interleukin-22 (IL-22) is a member of the IL-10 cytokine family that binds to a heterodimeric receptor consisting of IL-22 receptor 1 (IL-22R1) and IL-10R2. IL-22R expression was initially characterized on epithelial cells, and plays an essential role in a number of inflammatory diseases. Recently, a functional receptor was detected on cancer cells such as hepatocarcinoma and lung carcinoma, but its presence was not reported in glioblastoma (GBM). Two GBM cell lines and 10 primary cell lines established from patients undergoing surgery for malignant GBM were used to investigate the expression of IL-22 and IL-22R by using quantitative RT-PCR, western blotting and confocal microscopy studies. The role of IL-22 in proliferation and survival of GBM cell lines was investigated *in vitro* by BrdU and ELISA cell death assays. We report herein that the two subunits of the IL-22R complex are expressed on human GBM cells. Their activation, depending on exogenous IL-22, induced antiapoptotic effect and cell proliferation. IL-22 treatment of GBM cells resulted in increased levels of phosphorylated Akt, STAT3 signaling protein and its downstream antiapoptotic protein Bcl-xL and decreased level of phosphorylated ERK1/2. In addition, IL-22R subunits were expressed in all the 10 tested primary cell lines established from GBM tumors. Our results showed that IL-22R is expressed on GBM established and primary cell lines. Depending on STAT3, ERK1/2 and PI3K/Akt pathways, IL-22 induced GBM cell survival. These data are consistent with a potential role of IL-22R in tumorigenesis of GBM. Since endogenous IL-22 was not detected in all studied GBM cells, we hypothesize that IL-22R could be activated by immune microenvironmental IL-22 producing cells.



Competing Interests: FXB is an employee of BIOalternatives, and received salary from them. This does not alter his adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Introduction

Interleukin 22 (IL-22), a member of the IL-10 cytokine family, is produced by several subsets of lymphocytes such as CD4⁺ T helper 17 (Th17) cells (able to produce also IL-17A and IL-17F) and Th22 cells, CD8⁺ cytotoxic T cells, natural killer (NK) cells, $\gamma\delta$ T cells and lymphoid tissue inducer (LTi)-like cells [1]. IL-22 signals through a heterodimeric receptor composed of two subunits, the specific receptor IL-22R1 and the shared subunit, IL-10R2 [2, 3]. Unlike IL-10 and most of the cytokines, IL-22 has no effect on immune cells [4, 5].

In agreement, IL-22R1 is not expressed on immune cells [6] but selectively detected on epithelial cells, *ie* keratinocytes [7], hepatocytes [8], pancreatic cells [9], lung cells [10], kidney cells [11] and colonic epithelial cells [12]. Binding of IL-22 to its receptor activates the Janus kinase 1 (JAK1), followed by the signal transducers and activators of transcription protein 3 (STAT3) and STAT5 pathways [13, 14]. IL-22 also activates the MAP kinase pathways such as the extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2), mitogen activated protein kinases (MAPK) like c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 [1, 8, 13]. In addition, IL-22 activates the phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) pathway [8, 15, 16].

The biological role of IL-22 was initially described in hepatoma [5], pancreatic acinar [9] cells and keratinocytes [7], thereafter reported to be involved in the pathogenesis of numerous inflammatory diseases, notably in skin inflammation such as psoriasis [17, 18]. Indeed, IL-22 induces an inflammatory phenotype on keratinocytes and inhibits their differentiation [7, 19]. Beside these well characterized immunopathological functions on epithelial tissues, the role of IL-22 in cancer cell biology has been recently reported in lung [20], gastric [21], colorectal [22, 23], pancreatic [24, 25], and hepatocellular carcinomas [26], whose cells expressed the IL-22R1/IL-10R2 receptor subunits. Indeed, IL-22 was described as an autocrine factor of human lung cancer cells contributing to cancer cell survival and resistance to chemotherapy, and its therapeutic effect was showed in an *in vivo* xenograft model using IL-22-RNAi plasmids [20]. In hepatocellular carcinoma, tumor infiltrated leukocytes were significantly enriched in IL-22 expressing cells. Moreover, IL-22 expression was positively correlated with tumor growth, metastasis and tumor stages [26]. *In vitro*, IL-22 induced hepatocyte cells survival and proliferation by activating STAT3 phosphorylation and Akt [13]. The role of IL-22 in colorectal cancer was also investigated by Jiang et al., who demonstrated that upregulation of IL-22 in human colon cancer microenvironment enhances tumor growth, inhibition of apoptosis and promotion of metastasis by activating STAT3 phosphorylation [22]. In addition, IL-22 levels were positively correlated with colorectal cancer tumor stages [27], and serum IL-22 level was elevated in chemoresistant patients [23]. In pancreatic cancer, IL-22 enhances metastatic ability of pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines, and high expression of IL-22 and IL-22R1 was associated to poor prognosis [25].

In the central nervous system, the presence of human Th17 lymphocytes and their deleterious role were described in multiple sclerosis lesions. Kebir and colleagues reported the expression of IL-17 and IL-22 receptors on blood-brain barrier endothelial cells during multiple sclerosis lesions and in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a mouse model of multiple sclerosis [28]. They showed that Th17 lymphocytes transmigrate efficiently from the systemic compartment into the central nervous system across the human blood-brain barrier endothelial cells. In addition, the presence of Th17 lymphocytes has been recently reported in primary human malignant GBM [29]. These authors showed that IL-17A mRNA levels in human GBM were higher than in normal human brain. To the best of our knowledge, the expression of IL-22R in GBM has never been reported. Although the mechanisms underlying the



malignant transformation of glial cell into GBM are not well elucidated, the hypothesis of an early block in the differentiation of glial progenitors into differentiated cells is issued [30–32].

Given the implication of Th17 lymphocytes in multiple sclerosis lesions and their presence in human GBM, the target tissues of Th17 cell-derived IL-22, its ability to inhibit the cellular differentiation and the association of its expression to various cancer, we questioned on a direct role of IL-22 on GBM cells. Herein, we report that human GBM cell lines as well as GBM-initiating cells express the two subunits of the functional IL-22 receptor. Activation of IL-22 receptor by IL-22 induces GBM cell survival and proliferation by activating STAT3 and PI3k/Akt pathways. Collectively, a role for IL-22 in the growth and potential invasiveness of GBM is suggested.

Materials and Methods

Cell lines and cell culture

Human GBM cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC/LGC Standards). U87MG cells were maintained in MEM medium with Earle's salts supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Calf Serum (FCS), 1mM sodium pyruvate, 1% non essential amino acids, 50 IU/mL penicillin and 50 mg/mL streptomycin. U118MG cells were cultured in DMEM, high glucose, glutamax medium supplemented with 10% FCS, 1mM sodium pyruvate, 50 IU/mL penicillin and 50mg/mL streptomycin (all from Gibco/Life Technologies), at 37°C under humidified atmosphere and 5% CO₂. NHEK were obtained from surgical samples of healthy breast skin and cultured as previously described [7]. Cells were serum-starved for 4 hours (h) before recombinant IL-22 treatment. The recombinant human IL-22 (20 ng/mL) was purchased from R&D Systems, recombinant human SuperFasLigand (100 ng/mL) from Enzo Life Sciences, LY294002 and U0126 from Cell Signaling Technology. Vehicle (0.05% v/v DMSO) was used as control.

GBM-initiating cells culture

Tumor samples were obtained within 30 min after surgical resection from ten adult GBM patients (Department of Neurological Surgery, Poitiers University Hospital, France). Written informed consent forms were obtained from all patients enrolled in this study, which was approved by the Poitiers University Hospital Ethics Committee (DHOS/OPRC/FCnotif-tumoro-jun04: 04056) and in accordance with the Declaration of Helsinki. Tumor tissues were washed and mechanically dissociated. Cells were resuspended in a defined serum free medium and cultured as previously described [33].

Real-time RT-PCR analysis

Total cellular RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen/Life Technologies) and treated with DNase I (0.05 U/μl; Clontech/Ozyme). Four μg of total RNA were reverse transcribed using Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was carried out using the LightCycler-FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I kit (Roche Molecular Diagnostic). The reaction components were 1X FastStart DNA Master SYBR Green I, 3 mM MgCl₂, and 0.5 μM of forward and reverse primers as previously described [18, 19]. A calibration curve was performed with purified PCR products of target genes. The cycling conditions comprised 10 min polymerase activation at 95°C and 45 cycles at 95°C for 10 s, 64°C for 5 s, and 72°C for 18 s with a single fluorescence measurement. Melting curve analysis, obtained by increasing the temperature from 60°C to 95°C with a heating rate of 0.1°C per second and a continuous fluorescence



measurement, revealed a single, narrow peak of suspected fusion temperature. The Delta Ct mathematical model was used to determine the relative quantification of target genes compared with the GAPDH reference gene.

Western blotting

Anti-IL-22R1 antibody (Ab) (0.5 µg/mL) was purchased from Abcam, anti-IL-10R2 Ab (1 µg/mL) from R&D Systems, anti-phospho-STAT3 (Tyr705) (1:2000), anti-STAT3 (1:1000), anti-phospho-Akt (1:2000), anti-Akt (pan) (1:2000) Abs from Cell Signaling Technology and anti-Actin Ab (1:10000) from Sigma-Aldrich. Cell lines cultures were lysed using 1X Cell lysis buffer (Cell Signaling Technology), according to the manufacturer's instructions. Protein concentration was determined using Bradford protein concentration assay (Sigma). SDS-PAGE was performed and the proteins were electro-blotted onto Immobilon PVDF membranes (Merck Millipore). After 1 h of incubation at room temperature in blocking solution (5% non-fat dry milk in 1X TBS-0.1% Tween-20), the membranes were exposed to the specific primary Abs in blocking solution overnight at 4°C. Then, membranes were washed thrice for 5 min with TBS-0.1% Tween-20 and the immunoreactions were detected by horseradish peroxidase-conjugated secondary Ab to mouse or rabbit Ig (Dako) diluted at 1:2000 in blocking solution for 1 h at room temperature. After washing, visualization of immunocomplexes was accomplished using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore). Protein-loading control was performed with anti-Actin Ab. Western blots were scanned using a bio-imaging system (Genesnap; Genetool; Syngene). Densitometric analyses were performed using an IMAGEJ software program (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Protein expression was determined in relative units in reference to actin expression.

Immunofluorescence

Cells grown on 14-mm coverslips (Fisher Scientific) were fixed with 4% formaldehyde in 1X PBS at room temperature for 15 min (in fume hood), rinsed three times in PBS and permeabilized or not with ice-cold 100% methanol for 10 min at -20°C. After 5 min of wash in PBS, non-specific binding was blocked by 30 min incubation with blocking buffer (1X PBS-5% normal goat serum with or without 0.3% Triton X-100) at room temperature. Coverslips were then incubated overnight at 4°C in Ab dilution buffer (1X PBS-1% BSA with or without 0.3% Triton X-100) with the primary Ab. The following primary Abs were used: rabbit polyclonal anti-IL-22R1 Ab (10 µg/mL; Abcam), mouse monoclonal anti-IL-10R2 Ab (5 µg/mL; R&D Systems), rabbit monoclonal anti-phospho-STAT3 (Tyr705) (1:100; Cell Signaling Technology) and mouse monoclonal anti-STAT3 Ab (1:1600; Cell Signaling Technology). Cells were washed 3 times in PBS, and incubated for 2 h at room temperature (in dark) with 488 nm Alexa Fluor-conjugated secondary Abs (Invitrogen) diluted 1:1000 in Ab dilution buffer. After 3 washes in PBS, nuclei were stained for 5 min with DAPI (Sigma). After intensive washes, coverslips were inverted on slides and mounted with Dako Fluorescent Mounting Medium. Isotype controls were cells incubated with irrelevant normal rabbit or mouse IgG (Sigma). Pictures were taken using a confocal microscope (Carl Zeiss, LSM 510).

ELISA

IL-22 in U87MG and U118MG cell line supernatants was detected by sandwich ELISA (Peprotech), according to manufacturer's instructions. Concentrations below the detection limit (5pg/mL) were considered undetectable.



Cell proliferation assays

Cell proliferation was measured using the BrdU cell Proliferation Assay (Cell Signaling Technology), according to the manufacturer's instructions. Proliferation values were measured using a microplate photometer (Thermo Fisher Scientific). Absorbance values were measured at 450 nm.

Apoptosis assay

Apoptosis was measured by the detection of cytoplasmic soluble nucleosomes using a calorimetric assay, Cell Death Detection ELISAPLUS kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Absorbance values were measured at 405–490 nm dual wavelengths.

Statistical analysis

Statistical significance was determined by a one-way analysis of variances (ANOVA) with Statview 5.0 software (Abacus Concepts). *P* values < 0.05 were considered significant. Mean and SEM values were obtained from at least 3 independent experiments.

Results

GBM cell lines express IL-22R1 and IL-10R2 receptors but not Interleukin-22

The two subunits of the functional IL-22R complex, IL-22R1 and IL-10R2 were detected in the U87MG and the U118MG GBM cell lines both at mRNA (Fig. 1A and 1B) and protein (Fig. 1D and 1E) levels with a higher expression in U87MG cell line. By using NHEK as positive controls for mRNA expression, we showed lower expression levels for IL-10R2, but higher levels for IL-22R1 than in GBM cell lines. By contrast, the IL-22 cytokine transcript was not detectable in both the GBM cell lines nor NHEK, whereas it is present in the psoriatic skin samples, reported to express IL-22 mRNA [18] (Fig. 1C). In agreement, IL-22 was not detected (<5pg/mL) in culture supernatant of both GBM cell lines (data not shown). The membranous and cytoplasmic expression of IL-22R1 and IL-10R2 were detected by immunofluorescence in the two GBM cell lines (Fig. 1F), in agreement with the transcriptional and western blot studies, suggesting that GBM cancer cell lines have the ability to respond to IL-22 stimulation.

Interleukin-22 induced GBM cell proliferation and survival

Since IL-22R complex was expressed by GBM cells, we further searched for biological functions of IL-22. We thus performed proliferation assays with exogenous IL-22 either in FCS-free or in 10% FCS-containing cultures. A 24 h and 48 h incubation of U87MG cells with exogenous IL-22 induced cell proliferation assessed by BrdU assays, whatever the cell culture conditions (Fig. 2A). Proliferation is observed only at 48 h for U118MG cells, under the serum-free culture condition (Fig. 2B). To further evaluate the role of exogenous IL-22 on GBM cell survival, apoptosis was evaluated by measuring soluble nucleosome cytoplasmic levels in cultures in the presence or not of the Fas ligand-inducing apoptosis (Super Fas Ligand), as previously reported [34]. In the presence of the Fas ligand, IL-22 significantly decreases the apoptotic ratio of U87MG (Fig. 2C) and U118MG cell lines (Fig. 2D), whereas no significant effect was observed on cells cultured in medium alone (Fig. 2C and 2D), suggesting that IL-22 protects GBM cells from Fas ligand-induced apoptosis. Previous studies revealed the activation of the antiapoptotic protein Bcl-xL by IL-22 in lung cancer [20], colon cancer [22] and hepatocarcinoma [26] cells. We thus examined the relationship between Bcl-xL protein and IL-22 in U87MG cells.



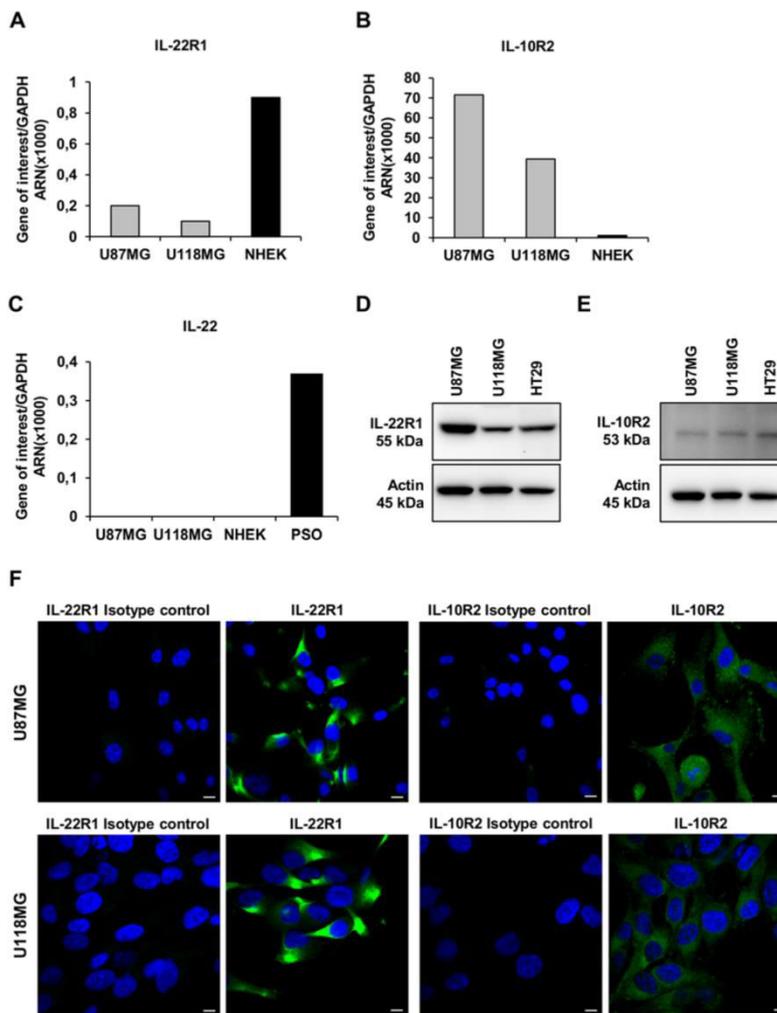


Fig 1. Expression of IL-22, IL-22R1 and IL-10R2 in GBM cell lines. (A-C) Quantitative RT-PCR analysis of IL-22 and its two receptors (IL-22R1, IL-10R2) in total RNA extracted from U87MG and U118MG cell lines. Positive controls were the human epidermal keratinocytes (NHEK) for IL-22R1 (A) and IL-10R2 (B) and the human psoriatic skin biopsies (PSO) for IL-22 expression (C). Target gene expression was normalized to the housekeeping GAPDH mRNA. (D, E) Detection of IL-22R1 (D) and IL-10R2 (E) proteins assessed by western blot analysis in the two studied cell lines. Positive control was the colorectal cancer cell line HT29 for both IL-22R1 and IL-10R2 expression. Actin was used as a loading protein control. (F) Confocal microscopy analysis of IL-22R1 and IL-10R2 labeled with specific antibodies and revealed with Alexa fluor-488 conjugated fluorescent antibodies (green) in U87MG and U118MG cell lines. Nuclei were counter stained with the blue-fluorescent DNA stain DAPI. Scale bars, 10µm.

doi:10.1371/journal.pone.0119872.g001



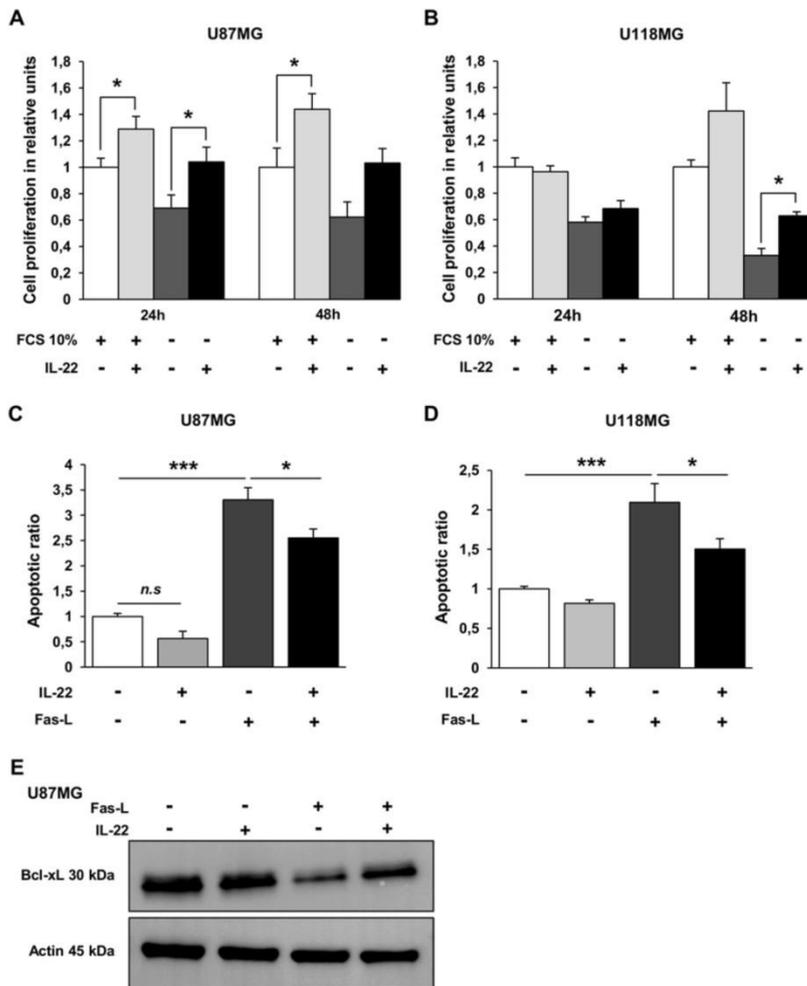


Fig 2. Exogenous IL-22 promotes cell survival of GBM cell lines. U87MG (A) and U118MG (B) cell lines were incubated for 24 to 48 h in basal culture medium (FCS 10%, +) and in serum-free medium (FCS 10%, -) in the presence of exogenous IL-22 (+) or without IL-22 (-). Cell proliferation was determined using BrdU cell proliferation assay. The data are represented as histograms of proliferating cells in relative units \pm SEM of three independent experiments. *, a value of $p < 0.05$; when compared with respective control without exogenous IL-22. (C, D) Apoptotic ratios of soluble nucleosomes were detected by ELISA cell death for U87MG (C) and U118MG (D) cell lines induced after 48 h of incubation with Fas activation alone (Fas-L, +) or in combination with 20 ng/mL of recombinant IL-22 (IL-22, +). Histograms mean ratio of apoptotic cells \pm SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; when compared with respective control. (E) The antiapoptotic factor Bcl-xL expression was assessed by western blotting (in reference to actin) in total cellular protein extracted from cells treated or not with Fas-L, with or without recombinant IL-22 for 48 h.

doi:10.1371/journal.pone.0119872.g002



We showed that Bcl-xL protein is downregulated by Fas ligand and that IL-22 was able to rescue this effect (Fig. 2E), in accordance with the above-mentioned results obtained by the ELISA cell death assays.

Interleukin-22 triggers phosphorylation of STAT3 in GBM cells

To determine the signal transduction pathway induced by IL-22R activation, we searched for STAT3 phosphorylation in the two GBM cell lines following IL-22 stimulation. The treatment of U87MG by IL-22 induced STAT3 phosphorylation at Tyr-705, and the maximum phosphorylation levels were detected at 10 min (4.4-fold increase) and remained detected up to 3 h (1.6-fold increase) (Fig. 3A). Although weaker, IL-22 treatment of U118MG cells also increase the phosphorylation of STAT3 at 10 min (1.6-fold increase), 20 min (1.3-fold increase) and 30 min (1.4-fold increase) (Fig. 3B). Immunofluorescence studies on GBM cells further confirmed the IL-22-induced STAT3 phosphorylation, and showed its nuclear localization in both studied GBM cell lines after 10 min (data not shown) and 30 min of treatment (Fig. 4A and 4B), demonstrating the STAT3 nuclear translocation in the presence of IL-22 (Fig. 4A and 4B).

Involvement of Akt and ERK1/2 pathways in IL-22-mediated cell survival in GBM cells

IL-22 has also been shown to be involved in the activation of PI3Kinase-Akt pathway [8, 15, 16]. As shown for the U87MG cell line, the expression of phospho-Akt (Ser-473) was enhanced

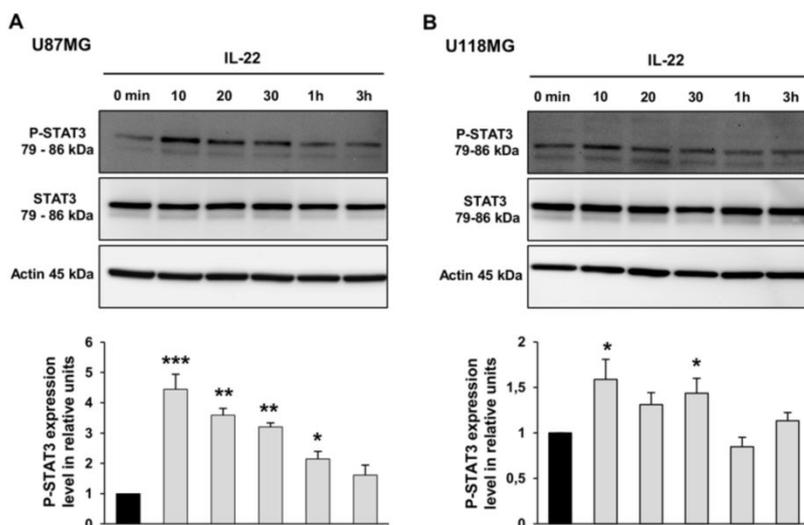


Fig 3. IL-22 activates the STAT3 signaling pathway in GBM cell lines. (A, B) The ability of IL-22 to activate signaling pathway in GBM cells was assessed using antibodies specific to STAT3 and Phospho-STAT3 (P-STAT3). U87MG (A) and U118MG (B) cells were stimulated with IL-22 and harvested at indicated times. Thirty mg of protein lysates was analyzed for P-STAT3 (Tyr705) and total STAT3 by western blot analysis. The density of each P-STAT3 band was corrected for variance in loading, using the density of the corresponding total STAT3. The expression level was evaluated as the ratio of phosphorylated STAT3 protein densities between control (0 min) and treated cells. Histograms are means \pm SEM of three independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; when compared with control.

doi:10.1371/journal.pone.0119872.g003



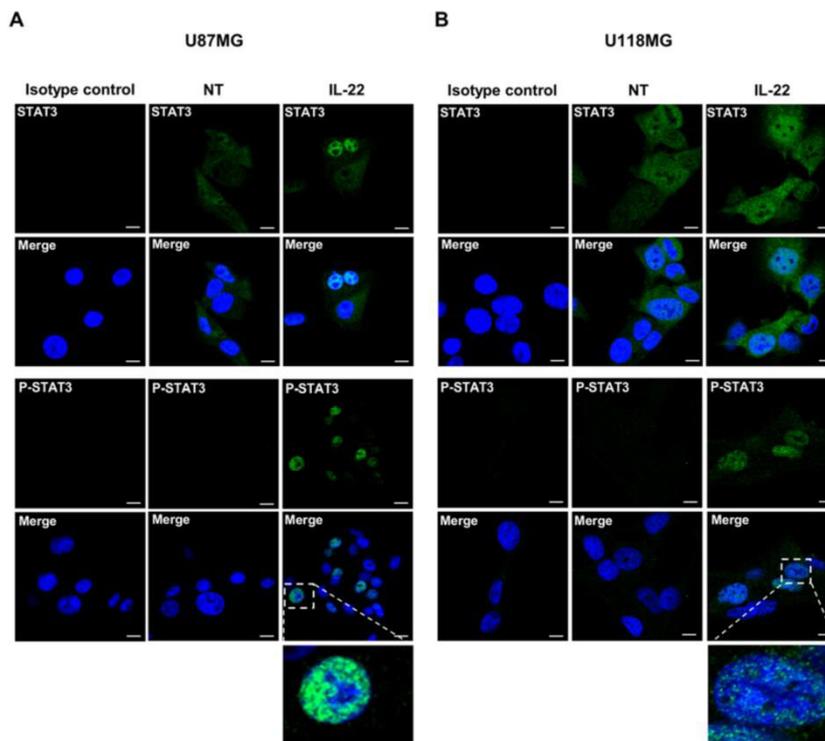


Fig 4. IL-22 induces STAT3 nuclear translocation and P-STAT3 nuclear accumulation in GBM cells. (A, B) Immunofluorescence analysis of STAT3 and P-STAT3 in U87MG (A) and U118MG (B) cells that were non-treated (NT) or treated with IL-22 for 30 minutes (IL-22). After the treatment, cells were fixed and stained with anti-STAT3 mouse mAb and anti-P-STAT3 rabbit mAb followed by Alexa fluor-conjugated fluorescent secondary antibody. Nuclei were counter stained with the blue-fluorescent DNA stain DAPI to point out nuclear localization of STAT3. Scale bars, 10 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0119872.g004

after 10 min of IL-22 treatment (Fig. 5A). IL-22 treatment of U118MG cells appears to be effective to increase the phosphorylation of Akt at 30 min (data not shown).

IL-22-induced Akt phosphorylation was inhibited by pretreatment of U87MG cells with increasing concentrations of the PI3Kinase inhibitor (LY294002), confirming that this effect is indeed mediated by the PI3Kinase pathway (Fig. 5B). On the other hand, IL-22 treatment inhibited the phosphorylation of ERK1/2 in the U87MG (Fig. 6A) and the U118MG (Fig. 6B) cell lines. The decreased level of ERK1/2 phosphorylation was detected from 10 min of IL-22 treatment (1.6-fold decrease for U87MG and 1.7-fold decrease for U118MG) and remained lower than the control up to 1 h of treatment for both cell lines. Given that inactivation of ERK1/2 is not often correlated with cell proliferation in GBM cells, we examined the effect of the ERK chemical inhibitor (U0126) on GBM cell lines to see whether it could mimic the effect of IL-22 stimulation. Accordingly, 0.5 and 2.5 μ M of U0126 significantly increased proliferation of both GBM cell lines (Fig. 6C and 6D). Altogether, these data suggest that IL-22 enhances GBM cell



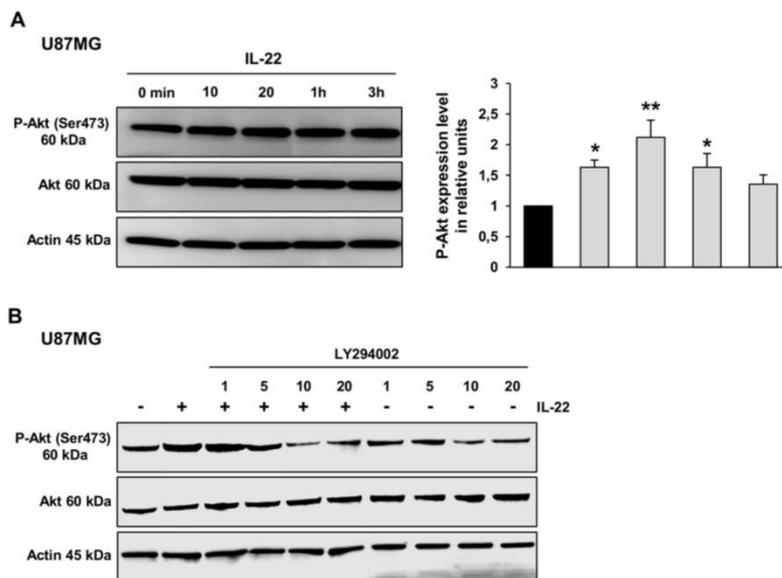


Fig 5. IL-22 enhances Akt phosphorylation in GBM cell lines. (A) The expression of phosphorylated Akt and the total amount of Akt were analyzed by western blotting for U87MG along a 3 h treatment with recombinant IL-22. Thirty mg of protein lysates was analyzed for P-Akt (Ser473) and total Akt by western blot analysis. The density of each P-Akt band was corrected for variance in loading, using the density of the corresponding total Akt. The expression level was evaluated as the ratio of phosphorylated Akt protein densities between control (0 min) and treated cells. A representative results of three independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; when compared with control. (B) Western blot analysis of cellular protein extracted from U87MG cells pretreated with increasing concentrations of LY294002 for 2 h, then treated or not with recombinant IL-22 for 20 min. Thirty mg of protein lysates was analyzed for P-Akt (Ser473) and total Akt. Actin was used as a loading protein control.

doi:10.1371/journal.pone.0119872.g005

proliferation and cell survival *via* inactivation of ERK1/2 and activation of STAT3 and PI3K-Akt phosphorylation.

Interleukin-22 receptor complex is expressed in GBM-initiating cells

We further analyzed IL-22R expression in 10 GBM-initiating cells established from GBM tumors [33, 35]. Interestingly, mRNA expression of IL-22R1 and IL-10R2 was detected at various levels in all the samples, with prominent expression of the ubiquitous receptor component IL-10R2 (Fig. 7A and 7B). We used NHEK as positive controls, and showed expression levels higher for IL-10R2 but at similar levels for IL-22R1 in glioblastoma primary cells. Otherwise, IL-22 mRNA was not detected in all studied human GBM-initiating cells (Fig. 7C), while they were detected in psoriasis skin samples used as a positive controls [18]. In accordance with the transcriptomic results, protein expression of both IL-22R subunits was confirmed by western blot analysis in total cellular protein extracted from GL6 and GL10 GBM-initiating cells (Fig. 7D), confirming the results obtained with U87MG and U118MG cell lines.

Discussion

The first reports on the involvement of IL-22 in physiopathology were in chronic inflammatory diseases, as psoriasis or colitis, since IL-22 contributes to tissue inflammation. A functional role



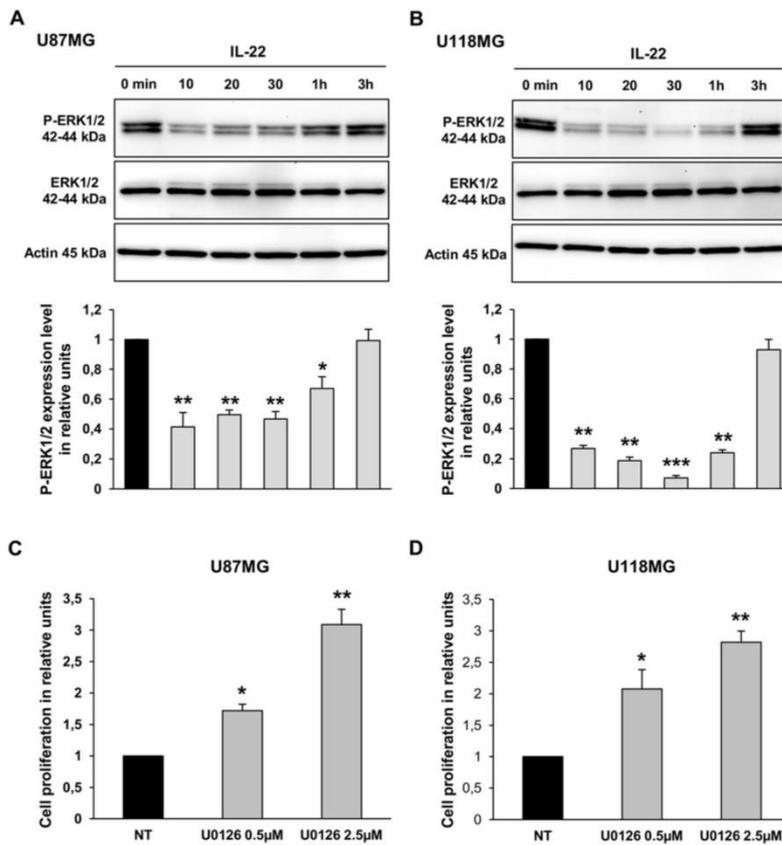


Fig 6. IL-22 reduces ERK1/2 phosphorylation in GBM cell lines. (A, B) The expression of P-ERK1/2 and the total amount of ERK1/2 were analyzed by western blotting in total cellular protein extracted from U87MG (A) and U118MG (B) cells treated with IL-22 for the indicated times. Thirty mg of protein lysates was analyzed for P-ERK1/2 and total ERK1/2. The density of each P-ERK1/2 band was corrected for variance in loading, using the density of the corresponding total ERK1/2. The expression level was evaluated as the ratio of phosphorylated ERK1/2 protein densities between control (0 min) and treated cells. A representative results of three independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; when compared with control. (C, D) Effect of U0126 on proliferation of GBM cells. BrdU cell proliferation assays of U87MG (C) and U118MG (D) cells treated for 24 h in serum-free medium with vehicle (non-treated; NT) or with 0.5 and 5 μM of U0126. The data are represented as histograms of proliferating cells in relative units. Error bars indicate \pm SEM. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

doi:10.1371/journal.pone.0119872.g006

of IL-22 in carcinogenesis has been therefore reported in lung, colorectal, gastric, pancreatic and hepatocarcinomas [1]. In the present study, we show the expression of the IL-22 receptor subunits IL-22R1 and IL-10R2 in GBM cell lines and in 10 GBM-initiating cells established from patients undergoing surgery for malignant GBM (WHO grade IV). All the 10 studied cell lines expressed both chains, with large variation of expression levels. Different studies have shown that IL-22 expression is associated with pro-survival and proliferation in a number of human cancer cells. In lung cancer, IL-22 induces cell proliferation and prevents from chemotherapy [20] and IFN- γ [36]-induced apoptosis. In hepatocellular carcinoma, IL-22 induces



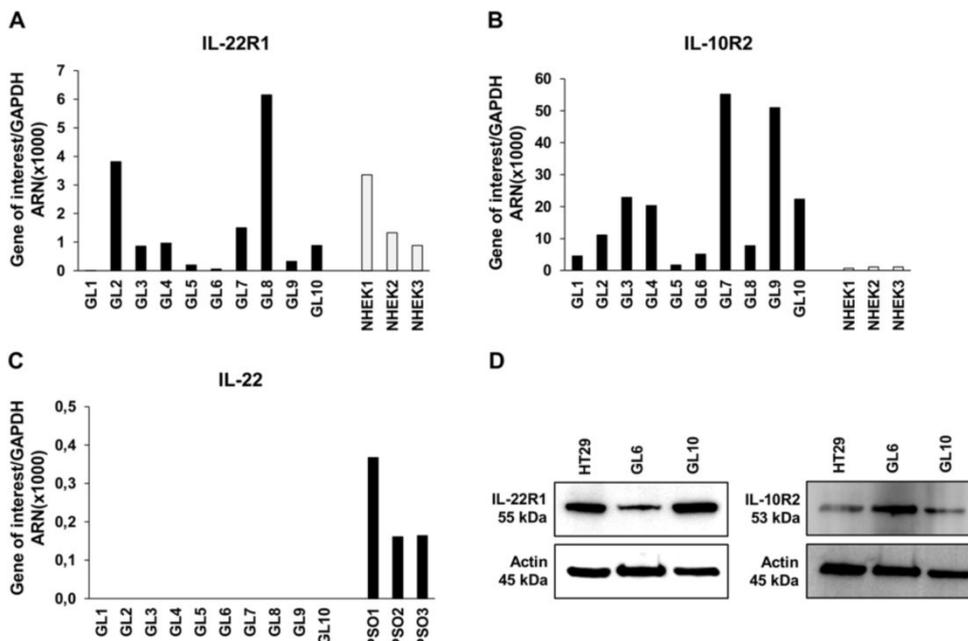


Fig 7. IL-22 receptors are expressed in human GBM tumors. (A-C) Quantitative RT-PCR analysis of IL-22R (IL-22R1, IL-10R2) and IL-22 in total RNA extracted from 10 GBM-initiating cells established from GBM tumors (GL). Three independent NHEK cultures were used as a positive control for IL-22R1 (A) and IL-10R2 (B) mRNA expression and three human psoriatic skin biopsies (PSO) were used as a positive control for IL-22 (C). Target gene expression was normalized to the housekeeping GAPDH mRNA. (D) Detection of IL-22R1 and IL-10R2 proteins assessed by western blot analysis from two GBM-initiating cells. Positive control was HT29 cell line. Actin was used as a loading protein control.

doi:10.1371/journal.pone.0119872.g007

cell survival and proliferation [13, 26]. IL-22 also enhances tumor growth and metastasis in both colon cancer [22] and pancreatic adenocarcinoma [24, 25]. In the current study, we showed that IL-22 protects GBM cells from Fas ligand-induced apoptosis and promotes cell proliferation. In agreement, IL-22 was able to increase the expression of the antiapoptotic protein Bcl-xL in U87MG cells treated with Fas ligand. We can hypothesize that the enhancement of cell proliferation is linked to the inhibition of apoptosis, allowing the proliferation of rescued cells. IL-22 has been also reported to involve different signaling pathways including STAT3, ERK, and Akt in cancerous cells [1], depending of the cell type. In liver, gastric or breast cells, IL-22 enhances tumor growth and progression by activating STAT3, followed by ERK1/2 [13, 21, 37] and/or Akt phosphorylation [8, 16]. However, in EMT6 breast cancer cells, IL-22 induces STAT3 phosphorylation, but reduced ERK1/2 and Akt phosphorylation [38]. In renal carcinoma cells, IL-22 suppresses cell growth in a dose dependent manner and inhibits the growth of tumor xenografts; these effects were in part mediated through regulation of STAT1 and ERK1/2 signaling pathways [39]. Despite these conflicting results, inhibition of ERK1/2 phosphorylation has been suggested as a treatment approach in breast cancer cells [40], lung cancer cells [41] and GBM cells. For example, it was reported that miltefosine-induced GBM cell apoptosis is dependent on ERK1/2 activation [42]. Similarly, allicin-induced apoptosis is regulated



by MAPK/ERK-dependent pathway [43]. In our hands, IL-22 treatment promotes GBM cell proliferation and protects them from apoptosis *via* the phosphorylation of STAT3, Akt and inactivation of ERK1/2. Using confocal microscopy, we confirmed IL-22 induces P-STAT3 nuclear accumulation and STAT3 nuclear translocation, as recently described in oral squamous cell carcinoma [44]. The differential response of GBM cell lines to IL-22 stimulation could be explained by the higher expression of IL-22R in U87MG cell line. Otherwise, deregulated expression and/or mutations of PTEN (phosphatase and tensin homolog) and p53 have been described to act synergistically as activator of STAT3 signaling in tumors outside the brain, including breast cancer [45]. For this study we used U87MG (PTEN-mutant; p53-wt) and U118MG (PTEN-mutant; p53-mutant) cell lines, both classified as grade IV glioblastoma. We suggest that the reduced phosphorylation level of STAT3 induced by IL-22 in U118MG cells compared to U87MG could be explained by a higher constitutively activated STAT3 in PTEN/p53-comutant U118MG cells.

In many cancer cells, autocrine production of cytokines is essential for cell survival and proliferation. Recently, this autocrine mechanism was demonstrated in human lung cancer cells secreting IL-22- [20] and IL-6- [46] induced STAT3 phosphorylation, thus contributing to the pathogenesis of lung adenocarcinoma and formation of pleural effusion. An autocrine production of IL-4 and IL-10 has also been reported in thyroid carcinoma cells, promoting resistance to Fas-induced apoptosis through the activation of JAK/STAT pathways [47]. By contrast, GBM cells did not produce IL-22, whereas they express a functional IL-22 receptor, suggesting that IL-22 could be provided by microenvironmental cells. Recently, Th17 cells invasion was reported in experimental mouse model of malignant glioma as well as in human glioma [29]. In this context, it is tempting to speculate that the functional effect of IL-22 in GBM could be induced by neighboring immune cells such as Th17 cells. Additional studies will be helpful to confirm that Th17 cells are possible source of IL-22 in human GBM. Nowadays, it is known that GBM has a characteristic cytokine expression pattern, and dysregulations of normal cytokine-mediated cell proliferation have been implicated in gliomagenesis [48]. Amongst them, IL-6 and IL-10 share signaling pathways with IL-22. IL-6 is secreted by human GBM cell lines such as U87MG, promoting their invasion [49]. IL-6 expression was positively associated to the aggressiveness, histopathological grade and poor overall survival of patients with GBM [50]. IL-10 was described to be produced by primary cultured glioma cells as well as glioma cancer stem cells [51]. IL-10 inhibits human T cell proliferation by downregulation of MHC class II expression, inhibiting the antigen-presenting capacity of monocytes and subsequently promotes glioma tumor growth [48, 52].

The common feature of these cytokines involved in glioblastoma development is their implication in inflammatory response, underlying the fundamental implication of tumor micro-environment. Amongst the complex cytokine network involved in tumor progression, we suggest that immunocompetent cells can interact with tumor cells and secrete IL-22 to promote GBM tumor development. Indeed, previous studies reported that IL-22 expression is correlated with tumor invasion and poor overall survival in other types of human cancers [21, 26, 27]. Collectively, our results suggest that IL-22 is a new candidate able to play a role in GBM growth and progression. Thorough additional studies will be necessary to consider the IL-22/IL-22R axis as a novel therapeutic target for GBM patients.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MOJ JCL HA FL FM. Performed the experiments: HA AA LMMC LD SC KG. Analyzed the data: HA MOJ JCL FL BB FM. Contributed reagents/materials/analysis tools: MOJ JCL LKT FXB. Wrote the paper: HA JCL MOJ.



References

1. Lim C, Savan R. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014; 25(3):257–71. doi: [10.1016/j.cytogfr.2014.04.005](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.04.005) PMID: [24856143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24856143/)
2. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, et al. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2–4 and IL-22R. *J Biol Chem.* 2000; 275(40):31335–9. doi: [10.1074/jbc.M005304200](https://doi.org/10.1074/jbc.M005304200) PMID: [10875937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10875937/)
3. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem.* 2001; 276(4):2725–32. doi: [10.1074/jbc.M007837200](https://doi.org/10.1074/jbc.M007837200) PMID: [11035029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11035029/)
4. Dumoutier L, Louahed J, Renauld JC. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol.* 2000; 164(4):1814–9. doi: [10.4049/jimmunol.164.4.1814](https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.1814) PMID: [10657629](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10657629/)
5. Dumoutier L, Van Roost E, Colau D, Renauld JC. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(18):10144–9. doi: [10.1073/pnas.170291697](https://doi.org/10.1073/pnas.170291697) PMID: [10954742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10954742/)
6. Lecart S, Morel F, Noraz N, Pene J, Garcia M, Boniface K, et al. IL-22, in contrast to IL-10, does not induce Ig production, due to absence of a functional IL-22 receptor on activated human B cells. *Int Immunol.* 2002; 14(11):1351–6. doi: [10.1093/intimm/dx096](https://doi.org/10.1093/intimm/dx096) PMID: [12407026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12407026/)
7. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol.* 2005; 174(6):3695–702. doi: [10.4049/jimmunol.174.6.3695](https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3695) PMID: [15749908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15749908/)
8. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, Heeg MH, Weiss TS, et al. IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 292(4):G1019–28. doi: [10.1152/ajpgi.00239.2006](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00239.2006) PMID: [17204547](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17204547/)
9. Aggarwal S, Xie MH, Maruoka M, Foster J, Gurney AL. Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *J Interferon Cytokine Res.* 2001; 21(12):1047–53. doi: [10.1089/107999001317205178](https://doi.org/10.1089/107999001317205178) PMID: [11798462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11798462/)
10. Whittington HA, Armstrong L, Uppington KM, Millar AB. Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 31(2):220–6. doi: [10.1165/rcmb.2003-0285OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0285OC) PMID: [15039135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15039135/)
11. Gurney AL. IL-22, a Th1 cytokine that targets the pancreas and select other peripheral tissues. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4(5):669–77. doi: [10.1016/j.intimp.2004.01.016](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.01.016) PMID: [15120651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15120651/)
12. Nagalakshmi ML, Rascole A, Zurawski S, Menon S, de Waal Malefyt R. Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4(5):679–91. doi: [10.1016/j.intimp.2004.01.008](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.01.008) PMID: [15120652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15120652/)
13. Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem.* 2002; 277(37):33676–82. doi: [10.1074/jbc.M204204200](https://doi.org/10.1074/jbc.M204204200) PMID: [12087100](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12087100/)
14. Dumoutier L, de Meester C, Tavernier J, Renauld JC. New activation modus of STAT3: a tyrosine-less region of the interleukin-22 receptor recruits STAT3 by interacting with its coiled-coil domain. *J Biol Chem.* 2009; 284(39):26377–84. doi: [10.1074/jbc.M109.007955](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007955) PMID: [19632985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19632985/)
15. Sabat R, Ouyang W, Wolk K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov.* 2013; 13(1):21–38. doi: [10.1038/nrd4176](https://doi.org/10.1038/nrd4176)
16. Mitra A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. IL-22 induced cell proliferation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *Cytokine.* 2012; 60(1):38–42. doi: [10.1016/j.cyto.2012.06.316](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.06.316) PMID: [22840496](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22840496/)
17. Guilloteau K, Paris I, Pedretti N, Boniface K, Juchaux F, Huguier V, et al. Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1{alpha}, and TNF-{alpha} Recapitulates Some Features of Psoriasis. *J Immunol.* 2010; 184(9):5263–70. doi: [10.4049/jimmunol.0902464](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902464)
18. Boniface K, Guignouard E, Pedretti N, Garcia M, Delwail A, Bernard FX, et al. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2007; 150(3):407–15. doi: [10.1111/j.1365-2249.2007.03511.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03511.x) PMID: [17900301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17900301/)
19. Rabeony H, Petit-Paris I, Garnier J, Barrault C, Pedretti N, Guilloteau K, et al. Inhibition of Keratinocyte Differentiation by the Synergistic Effect of IL-17A, IL-22, IL-1alpha, TNFalpha and Oncostatin M. *PLoS One.* 2014; 9(7):e101937. doi: [10.1371/journal.pone.0101937](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101937) PMID: [25010647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25010647/)



20. Zhang W, Chen Y, Wei H, Zheng C, Sun R, Zhang J, et al. Antiapoptotic activity of autocrine interleukin-22 and therapeutic effects of interleukin-22-small interfering RNA on human lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(20):6432–9. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-07-4401](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4401) PMID: [18927282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18927282/)
21. Fukui H, Zhang X, Sun C, Hara K, Kikuchi S, Yamasaki T, et al. IL-22 produced by cancer-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion via STAT3 and ERK signaling. *Br J Cancer*. 2014; 111(4):763–71. doi: [10.1038/bjc.2014.336](https://doi.org/10.1038/bjc.2014.336) PMID: [24937671](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24937671/)
22. Jiang R, Wang H, Deng L, Hou J, Shi R, Yao M, et al. IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC Cancer*. 2013; 13:59. doi: [10.1186/1471-2407-13-59](https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-59) PMID: [23379788](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23379788/)
23. Wu T, Cui L, Liang Z, Liu C, Liu Y, Li J. Elevated serum IL-22 levels correlate with chemoresistant condition of colorectal cancer. *Clin Immunol*. 2013; 147(1):38–9. doi: [10.1016/j.clim.2013.02.007](https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.02.007) PMID: [23501837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23501837/)
24. Curd LM, Favors SE, Gregg RK. Pro-tumour activity of interleukin-22 in HPAFII human pancreatic cancer cells. *Clin Exp Immunol*. 2012; 168(2):192–9. doi: [10.1111/j.1365-2249.2012.04570.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04570.x) PMID: [22471280](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22471280/)
25. Wen Z, Liao Q, Zhao J, Hu Y, You L, Lu Z, et al. High expression of interleukin-22 and its receptor predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2014; 21(1):125–32. doi: [10.1245/s10434-013-3322-x](https://doi.org/10.1245/s10434-013-3322-x) PMID: [24132627](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132627/)
26. Jiang R, Tan Z, Deng L, Chen Y, Xia Y, Gao Y, et al. Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology*. 2011; 54(3):900–9. doi: [10.1002/hep.24486](https://doi.org/10.1002/hep.24486) PMID: [21674558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21674558/)
27. Petanidis S, Anestakis D, Argyraki M, Hadzopoulou-Cladaras M, Salifoglou A. Differential expression of IL-17, 22 and 23 in the progression of colorectal cancer in patients with K-ras mutation: Ras signal inhibition and crosstalk with GM-CSF and IFN-gamma. *PLoS One*. 2013; 8(9):e73616. doi: [10.1371/journal.pone.0073616](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073616) PMID: [24040001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24040001/)
28. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007; 13(10):1173–5. doi: [10.1038/nm1651](https://doi.org/10.1038/nm1651) PMID: [17828272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17828272/)
29. Wainwright DA, Sengupta S, Han Y, Ulasov IV, Lesniak MS. The presence of IL-17A and T helper 17 cells in experimental mouse brain tumors and human glioma. *PLoS One*. 2010; 5(10):e15390. doi: [10.1371/journal.pone.0015390](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015390) PMID: [21060663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21060663/)
30. Wechsler-Reya R, Scott MP. The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24:385–428. doi: [10.1146/annurev.neuro.24.1.385](https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.385) PMID: [11283316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11283316/)
31. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414(6859):105–11. doi: [10.1038/35102167](https://doi.org/10.1038/35102167) PMID: [11689955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11689955/)
32. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med*. 2005; 353(8):811–22. doi: [10.1056/NEJMra043666](https://doi.org/10.1056/NEJMra043666) PMID: [16120861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16120861/)
33. Villalva C, Martin-Lannere S, Cortes U, Dkhissi F, Wager M, Le Corf A, et al. STAT3 is essential for the maintenance of neurosphere-initiating tumor cells in patients with glioblastomas: a potential for targeted therapy? *Int J Cancer*. 2011; 128(4):826–38. doi: [10.1002/ijc.25416](https://doi.org/10.1002/ijc.25416) PMID: [20473906](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20473906/)
34. Giraud S, Bessette B, Boda C, Lalloue F, Petit D, Mathonet M, et al. In vitro apoptotic induction of human glioblastoma cells by Fas ligand plus etoposide and in vivo antitumour activity of combined drugs in xenografted nude rats. *Int J Oncol*. 2007; 30(1):273–81. doi: [10.3892/ijo.30.1.273](https://doi.org/10.3892/ijo.30.1.273) PMID: [17143538](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17143538/)
35. Cheray M, Petit D, Forestier L, Karayan-Tapon L, Maftah A, Jauberteau MO, et al. Glycosylation-related gene expression is linked to differentiation status in glioblastomas undifferentiated cells. *Cancer Lett*. 2011; 312(1):24–32. doi: [10.1016/j.canlet.2011.07.027](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.07.027) PMID: [21899947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21899947/)
36. Ye ZJ, Zhou Q, Yin W, Yuan ML, Yang WB, Xiang F, et al. Interleukin 22-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion. *Cancer Lett*. 2012; 326(1):23–32. doi: [10.1016/j.canlet.2012.07.013](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.07.013) PMID: [22809567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22809567/)
37. Kim K, Kim G, Kim JY, Yun HJ, Lim SC, Choi HS. Interleukin-22 promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via MAP3K8 activation. *Carcinogenesis*. 2014; 35(6):1352–61. doi: [10.1093/carcin/bgu044](https://doi.org/10.1093/carcin/bgu044) PMID: [24517997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24517997/)
38. Weber GF, Gaertner FC, Erl W, Janssen KP, Bleichert B, Holzmann B, et al. IL-22-mediated tumor growth reduction correlates with inhibition of ERK1/2 and AKT phosphorylation and induction of cell cycle arrest in the G2-M phase. *J Immunol*. 2006; 177(11):8266–72. doi: [10.4049/jimmunol.177.11.8266](https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.8266) PMID: [17114505](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17114505/)



39. Zhang F, Shang D, Zhang Y, Tian Y. Interleukin-22 suppresses the growth of A498 renal cell carcinoma cells via regulation of STAT1 pathway. *PLoS One*. 2011; 6(5):e20382. doi: [10.1371/journal.pone.0020382](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020382) PMID: [21625390](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21625390/)
40. Kronblad A, Hedenfalk I, Nilsson E, Pahlman S, Landberg G. ERK1/2 inhibition increases antiestrogen treatment efficacy by interfering with hypoxia-induced downregulation of ERalpha: a combination therapy potentially targeting hypoxic and dormant tumor cells. *Oncogene*. 2005; 24(45):6835–41. doi: [10.1038/sj.onc.1208830](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208830) PMID: [16007158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16007158/)
41. Chen YL, Lin PC, Chen SP, Lin CC, Tsai NM, Cheng YL, et al. Activation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 via extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase revealed a isochahalactone-triggered apoptotic pathway in human lung cancer A549 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 323(2):746–56. doi: [10.1124/jpet.107.126193](https://doi.org/10.1124/jpet.107.126193) PMID: [17715378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17715378/)
42. Tewari R, Sharma V, Koul N, Sen E. Involvement of mifefosine-mediated ERK activation in glioma cell apoptosis through Fas regulation. *J Neurochem*. 2008; 107(3):616–27. doi: [10.1111/j.1471-4159.2008.05625.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05625.x) PMID: [18710416](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18710416/)
43. Cha JH, Choi YJ, Cha SH, Choi CH, Cho WH. Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis in U87MG human glioblastoma cells through an ERK-dependent pathway. *Oncol Rep*. 2012; 28(1):41–8. doi: [10.3892/or.2012.1772](https://doi.org/10.3892/or.2012.1772) PMID: [22552443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22552443/)
44. Naher L, Kiyoshima T, Kobayashi I, Wada H, Nagata K, Fujiwara H, et al. STAT3 signal transduction through interleukin-22 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2012; 41(5):1577–86. doi: [10.3892/ijo.2012.1594](https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1594) PMID: [22922995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22922995/)
45. Kim G, Ouzounova M, Quraishi AA, Davis A, Tawakkol N, Clouthier SG, et al. SOCS3-mediated regulation of inflammatory cytokines in PTEN and p53 inactivated triple negative breast cancer model. *Oncogene*. 2015; 34(6):671–80. doi: [10.1038/onc.2014.4](https://doi.org/10.1038/onc.2014.4) PMID: [24531711](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24531711/)
46. Yeh HH, Lai WW, Chen HH, Liu HS, Su WC. Autocrine IL-6-induced Stat3 activation contributes to the pathogenesis of lung adenocarcinoma and malignant pleural effusion. *Oncogene*. 2006; 25(31):4300–9. doi: [10.1038/sj.onc.1209464](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209464) PMID: [16518408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16518408/)
47. Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, Bini M, Perez Alea M, Maria Florena A, et al. Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells. *Cancer Res*. 2006; 66(3):1491–9. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-05-2514](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2514) PMID: [16452205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16452205/)
48. Zhu VF, Yang J, Lebrun DG, Li M. Understanding the role of cytokines in Glioblastoma Multiforme pathogenesis. *Cancer Lett*. 2012; 316(2):139–50. doi: [10.1016/j.canlet.2011.11.001](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.11.001) PMID: [22075379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22075379/)
49. Li R, Li G, Deng L, Liu Q, Dai J, Shen J, et al. IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1. *Oncol Rep*. 2010; 23(6):1553–9. doi: [10.3892/or_00000795](https://doi.org/10.3892/or_00000795) PMID: [20428809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20428809/)
50. Tchirkov A, Rohion C, Bertrand S, Dore JF, Dubost JJ, Verrelle P. IL-6 gene amplification and expression in human glioblastomas. *Br J Cancer*. 2001; 85(4):518–22. doi: [10.1054/bjoc.2001.1942](https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1942) PMID: [11506489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11506489/)
51. Qiu B, Zhang D, Wang C, Tao J, Tie X, Qiao Y, et al. IL-10 and TGF-beta2 are overexpressed in tumor spheres cultured from human gliomas. *Mol Biol Rep*. 2011; 38(5):3585–91. doi: [10.1007/s11033-010-0469-4](https://doi.org/10.1007/s11033-010-0469-4) PMID: [21088899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21088899/)
52. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. 1991; 174(4):915–24. PMID: [1655948](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1655948/)



Résumé

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est caractérisée par une accumulation anormale de lymphocytes B matures. Les thérapies actuelles reposent sur l'utilisation d'inhibiteurs ciblant les kinases impliquées dans la voie du récepteur des cellules B (BCR), mais elles sont limitées par le niveau élevé de résistance à l'apoptose des cellules leucémiques. En effet, celles-ci échouent à éradiquer les cellules résistantes à l'apoptose, il est donc essentiel d'identifier d'autres voies de survie comme nouvelles cibles pour les thérapies anticancéreuses. La surexpression des récepteurs de surface couplés aux protéines G (RCPGs) entraîne une transformation cellulaire et joue ainsi un rôle essentiel dans les tumeurs malignes. Dans cette étude, nous montrons que le récepteur de la neurotensine de type 2 (NTSR2), un récepteur couplé aux protéines G, est un acteur essentiel dans les mécanismes de résistance à l'apoptose dans les cellules leucémiques. Le récepteur NTSR2 est surexprimé et constitutivement actif dans les cellules leucémiques, son activation dépend de son interaction avec le récepteur TrkB (*Tropomyosin-related kinase B*) et du recrutement des protéines $G_{i\alpha}$ à la place de son interaction avec son ligand naturel, la neurotensine (NTS). L'interaction NTSR2-TrkB agit comme un oncogène conditionnel nécessitant le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), le ligand de TrkB, qui est fortement exprimé dans les cellules B leucémiques, contrairement à son ligand naturel la NTS. L'interaction NTSR2-TrkB active les voies de signalisation de survie, y compris les voies de Src et Akt, ainsi que l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) et Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*). Néanmoins le récepteur TrkB seul ne protège pas les cellules B leucémiques d'une diminution drastique de la viabilité par apoptose lorsque NTSR2 est inactivé. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'interaction NTSR2-TrkB et l'activation soutenue des voies de signalisation dépendante de cette interaction constituent un mécanisme essentiel d'échappement à l'apoptose des cellules B leucémiques. Le ciblage du récepteur NTSR2 représente une stratégie prometteuse pour le traitement de cette pathologie.

Mots-clés : Lymphocytes B leucémiques, RCPG, NTSR2, TrkB, apoptose.

