

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Discipline : Sciences Pharmaceutiques
Spécialité : Pharmacologie cellulaire et moléculaire

par

Véronique FREUND-MICHEL

**Le facteur de croissance des nerfs NGF
dans l'inflammation et le remodelage bronchique
dans l'asthme**

Soutenue le 26 juin 2006

Jury de thèse :

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Directeur de thèse

Pr Dominique ISRAËL-BIET
Dr Pascal CHANEZ
Pr Dominique WACHSMANN
Dr Nelly FROSSARD

A Philippe,
Merci pour ta présence, ta précieuse aide,
et ton soutien de tous les instants.

A mes parents,
Merci de m'avoir soutenue et encouragée
tout au long de ce doctorat.
Vous m'avez permis de ne pas douter,
d'aller toujours de l'avant
et de mener à bien ce travail.

A la Chap's Family,
Merci à tous les cinq
pour votre soutien toujours présent
même à distance.

Ce travail a été réalisé sous la direction de **Madame Le Docteur Nelly Frossard** au sein du laboratoire INSERM U425 puis EA 3771 à la Faculté de Pharmacie. Je tenais à la remercier pour ses qualités humaines et scientifiques ainsi que pour la confiance qu'elle m'a accordée très tôt dans mon cursus. Mes premiers pas dans la recherche ont été faits sous sa direction, et la patience et la disponibilité dont elle a fait preuve m'ont permis de pleinement apprécier ce domaine, de m'épanouir dans cette voie et de mener à bien ce travail.

Madame Le Professeur Dominique Wachsmann m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteur interne. Qu'elle reçoive ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Madame Le Professeur Dominique Israël-Biet a accepté de faire partie de ce jury en tant que rapporteur externe. Je l'en remercie très sincèrement et lui exprime toute ma gratitude.

Je remercie très sincèrement **Monsieur Le Docteur Pascal Chanez** de l'intérêt qu'il a porté à ce travail en tant que rapporteur externe. Je lui adresse toute ma reconnaissance.

Enfin, un grand merci aux membres du laboratoire EA3771 pour tous les bons moments passés au cours de ce doctorat. Un grand merci en particulier à Julien pour sa gentillesse, sa bonne humeur et son enthousiasme débordant qu'il réussit toujours à transmettre à son entourage, même dans des domaines « para-scientifiques ». Merci aussi à Manu et Laurent pour l'animation dans notre bureau, les pauses café à toute heure de la journée, mais aussi et surtout pour leur apport scientifique et technique dans des domaines où j'ai pu progresser grâce à eux. Merci enfin à Carine, loin désormais, mais qui a largement contribué à l'atmosphère chaleureuse dans laquelle j'ai mené à bien ce travail.

SOMMAIRE

 Liste des abréviations

Résumé

PREFACE**INTRODUCTION** _____ **1****1. LE FACTEUR DE CROISSANCE DES NERFS** _____ **1****1.1. Découverte du NGF** _____ **1****1.2. Structure du 7S-NGF** _____ **2****1.3. La sous-unité β ou β -NGF** _____ **3****1.3.1. Transcription du β -NGF** _____ **3***1.3.1.1. Structure du gène codant pour le β -NGF* _____ *3**1.3.1.2. Structure du promoteur du gène du β -NGF* _____ *4**1.3.1.3. Les différents transcrits du β -NGF* _____ *4**1.3.1.4. Régulation de la transcription du β -NGF* _____ *6*

1.3.1.4.1. Conditions pro- et anti-inflammatoires _____ 6

1.3.1.4.2. Lésions tissulaires _____ 7

1.3.1.4.3. Activation des récepteurs de la vitamine D3 et β 2-adrénergiques _____ 7

1.3.1.4.4. Polymorphismes _____ 8

1.3.2. Traduction du β -NGF _____ **8****1.3.3. Structure protéique du β -NGF** _____ **9****1.4. Les sous-unités α et γ** _____ **11****1.4.1. La sous-unité α** _____ **11****1.4.2. La sous-unité γ** _____ **12****2. RECEPTEURS DU NGF ET VOIES DE SIGNALISATION** _____ **13****2.1. Le récepteur TrkA** _____ **13****2.1.1. Gène codant pour le récepteur TrkA** _____ **14****2.1.2. Structure du récepteur** _____ **14****2.1.3. Les différentes isoformes du récepteur TrkA** _____ **16****2.1.4. Caractéristiques de liaison du NGF au récepteur TrkA** _____ **17***2.1.4.1. Affinité du NGF pour le récepteur TrkA* _____ *17**2.1.4.2. Interactions entre le NGF et le récepteur TrkA* _____ *18***2.1.5. Voies de signalisation du récepteur TrkA** _____ **20***2.1.5.1. Transphosphorylation du récepteur TrkA* _____ *20**2.1.5.2. Voie Ras/Raf* _____ *21**2.1.5.3. Voie PLC/PKC* _____ *22**2.1.5.4. Voie PI3K* _____ *22***2.1.6. Transactivation du récepteur TrkA par les RCPG** _____ **23****2.1.7. Internalisation et transport rétrograde du récepteur TrkA** _____ **25***2.1.7.1. Mécanismes d'internalisation du récepteur TrkA* _____ *25**2.1.7.1.1. Internalisation par la voie de la clathrine* _____ *26**2.1.7.1.2. Internalisation par la voie des cavéoles* _____ *26**2.1.7.1.3. Internalisation par macropinocytose* _____ *27*

2.1.7.1.4. Rôle de la kinase du récepteur TrkA dans son internalisation	27
2.1.7.2. Mécanismes du transport rétrograde	28
2.1.7.3. Notion d'endosome de signalisation (« Signalling endosome »)	30
2.1.7.4. Voies de signalisation activées	30
2.1.7.4.1. Signalisation locale dans la terminaison nerveuse	30
2.1.7.4.2. Signalisation au niveau du corps cellulaire	31
2.1.8. Dégradation et recyclage du récepteur TrkA	31
2.2 Le récepteur p75^{NTR}	33
2.2.1 Gène codant pour le récepteur p75^{NTR}	33
2.2.2 Structure du récepteur p75^{NTR}	34
2.2.2.1 Domaines extracellulaire et transmembranaire	35
2.2.2.2 Domaine intracellulaire	35
2.2.3 Les différentes formes du récepteur p75^{NTR}	37
2.2.4 Caractéristiques de liaison avec le NGF	38
2.2.4.1 Affinité du NGF pour le récepteur p75 ^{NTR}	38
2.2.4.2 Interactions entre le NGF et le récepteur p75 ^{NTR}	38
2.2.4.2.1 Sites d'interactions avec le NGF	39
2.2.4.2.2 Stoechiométrie du complexe NGF-p75 ^{NTR}	40
2.2.4.3 Liaison des pro-neurotrophines au récepteur p75 ^{NTR}	41
2.2.5 Voies de signalisation du récepteur p75^{NTR}	42
2.2.5.1 Voies de signalisation conduisant à l'apoptose	42
2.2.5.1.1 Voies de signalisation conduisant à l'activation de JNK	43
2.2.5.1.1.1 Recrutement de protéines adaptatrices	43
2.2.5.1.1.1.1 NRIF (« Neurotrophin Receptor Interacting Factor »)	43
2.2.5.1.1.1.2 NRAGE (« Neurotrophin receptor-interacting MAGE »)	44
2.2.5.1.1.1.3 NADE (« p75 ^{NTR} -associated cell death executor»)	45
2.2.5.1.1.1.4 SC-1 (« Schwann cell factor-1 »)	45
2.2.5.1.1.2 Synthèse des céramides	45
2.2.5.1.1.3 Activation de la protéine Rac1	46
2.2.5.1.2 Activation de la MAPK JNK et induction de l'apoptose	47
2.2.5.2 Voies de signalisation conduisant à la survie cellulaire	48
2.2.5.2.1 Voies de signalisation activant le facteur de transcription NFκB	48
2.2.5.2.1.1 Recrutement de TRAF et activation de IRAK et PKCι	48
2.2.5.2.1.2 Recrutement de la protéine adaptatrice RIP-2	49
2.2.5.2.1.3 Activation des protéines PI3K et PKB	49
2.2.5.2.2 Activation du facteur de transcription NFκB	50
2.2.5.3 Autres voies de signalisation	51
2.2.6 Les co-récepteurs du récepteur p75^{NTR}	52
2.2.6.1 Interactions avec le récepteur TrkA	52
2.2.6.2 Interactions avec le récepteur NogoR	55
2.2.6.3 Interactions avec la sortiline	55
2.2.7 Internalisation, dégradation et recyclage du récepteur p75^{NTR}	56
3. EXPRESSION DU NGF DANS LES VOIES AERIENNES	58
3.1. Sources cellulaires de NGF	58
3.1.1. Etudes <i>in vitro</i>	58
3.1.1.1. Cellules inflammatoires	58
3.1.1.2. Cellules structurales des voies aériennes	58
3.1.2. Etudes <i>in vivo</i>	59

3.2. Régulation de la synthèse de NGF dans les voies aériennes	60
3.2.1. Régulation en fonction de la densité cellulaire	60
3.2.2. Conditions inflammatoires	61
3.2.3. Conditions anti-inflammatoires	62
4. EFFET DU NGF DANS LES VOIES AERIENNES	63
4.1. Effet du NGF sur les cellules neuronales	63
4.2. Effet du NGF sur les cellules inflammatoires	64
4.2.1. Effet sur les mastocytes	64
4.2.1.1. Effets <i>in vitro</i>	64
4.2.1.2. Effets <i>in vivo</i>	64
4.2.2. Effet sur les lymphocytes	65
4.2.2.1. Effets <i>in vitro</i>	65
4.2.2.2. Effets <i>in vivo</i>	66
4.2.3. Effet sur les éosinophiles	66
4.2.3.1. Effets <i>in vitro</i>	66
4.2.3.2. Effets <i>in vivo</i>	67
4.2.4. Effet sur les monocytes / macrophages	68
4.2.5. Effet sur les basophiles	68
4.2.6. Effet sur les neutrophiles	69
4.3. Effet du NGF sur les cellules structurales	69
5. ROLE DU NGF DANS L'ASTHME	70
5.1. Expression et libération de NGF dans l'asthme	70
5.2. NGF, innervation et hyperréactivité bronchique	70
5.3. NGF et inflammation des voies aériennes	72
5.4. NGF et remodelage bronchique	73
5.4.1. Le remodelage bronchique dans l'asthme	73
5.4.2. Rôle potentiel du NGF dans le remodelage bronchique	73
OBJECTIFS	75
RESULTATS	77
➤ Publication N°1	77
Nerve Growth Factor secretion by human lung epithelial A549 cells in pro- and anti-inflammatory conditions <i>European Journal of Pharmacology</i> 2001 ; 428 : 365-369.	
➤ Publication N°2	78
Upregulation of nerve growth factor expression by human smooth muscle cells in inflammatory conditions <i>European Respiratory Journal</i> 2002 ; 20 : 458-463.	
➤ Publication N°3	79

TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation
Cellular Signalling 2006 ; 18 : 621-627.

- **Publication N°4** _____ **80**
Trafficking of the TrkA receptor in human airway smooth muscle cells in culture
Cellular and Molecular Biology 2006 ; soumis.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES _____ **82**

BIBLIOGRAPHIE _____ **91**

Liste des publications _____ **115**

ANNEXES _____ **118**

- **Annexe N°1** _____ **119**
Le facteur de croissance des nerfs : un nouveau médiateur de l'inflammation ?
Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique 2001 ; 41 : 571-578.
- **Annexe N°2** _____ **120**
Expression of nerve growth factor in the airways and its possible role in asthma
Progress in Brain Research 2004 ; 146 : 335-346.
- **Annexe N°3** _____ **121**
Le facteur de croissance des nerfs (NGF) dans l'inflammation et l'asthme
Revue des Maladies Respiratoires 2004 ; 21 : 328-342.
- **Annexe N°4** _____ **122**
Nerve growth factor and its receptors in asthma
European Journal of Pharmacology 2004 ; 500 : 453-465.
- **Annexe N°5** _____ **123**
Le facteur de croissance des nerfs (NGF) : nouveau rôle d'un médiateur
du système nerveux dans le système bronchique
Pathologie Biologie 2006 ; 54 : 122-124 (Editorial).

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ADNc : ADN complémentaire
AMPc : Acide adénosine monophosphorique cyclique
ARMS : Ankyrin repeat-rich membrane spanning
ARNm : ARN messager
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor
bFGF : basic Fibroblast growth factor
BH3 : Bcl-2 Homology Domain 3
bHLH : Basic-helix-loop-helix
C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein
CARD : CAspase Recruiting Domain
CGRP : Calcitonin gene-related protein
CRD : Cystein rich domain
CRE : cAMP responsive element
CREB : cAMP responsive element binding protein
CRIB : cdc-42/Rac1 interactive binding motif
CSF-1 : Colony-stimulating factor-1
Csk : C-terminal Src kinase
DAG : diacylglycérol
DD : Death domain
DISC : Death-inducing signalling complex
EEA1 : Early endosome antigen 1
EGF : Epidermal growth factor
EGFR : EGF receptor
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ERK : Extracellular-regulated protein kinase
FADD : Fas associated death domain
FAP-1 : Fas-associated phosphatase-1
Gab-1 : Grb2-associated binder-1
GAPDH : Glycéraldehyde 3-phosphate deshydrogénase
GR : Glucocorticoid receptor
Grb2 : Growth factor receptor bound protein-2
Grb-7 : Growth factor receptor binding protein 7
HIAP : Human inhibitor of T-cell apoptosis
I κ B : Inhibitory κ B
IAP : Inhibitor of apoptosis
Ig : Immunoglobuline
IKK : I κ B kinase
IL : Interleukine
IP₃ : Inositol triphosphate
IRAK : IL-1 receptor-associated kinase
IRS-1 : Insulin receptor substrate-1
JM : domaine juxtamembranaire ou domaine « Chopper »
JNK : c-jun N-terminal kinase
LDLR : Low density lipoprotein receptor
MAG : Myelin-Associated Glycoprotein
MAGE : Melanoma-associated antigens
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MAPKK : MAPK kinase
MAPKKK : MAPK kinase kinase
MBGI : derived Myelin-Based Growth Inhibitors

MEF2 : Myocyte-specific enhancer 2
MEK : MAPK ERK kinase
MMP : métalloprotéinase
NADE : p75^{NTR}-associated cell death executor
NAIP : Neuronal apoptosis-inhibitory protein
NGF : Nerve growth factor
NogoR : Nogo Receptor
NRAGE : Neurotrophin receptor-interacting MAGE
NRH-2 : Neurotrophin receptor homolog-2
NRIF : Neurotrophin Receptor Interacting Factor
NT : Neurotrophine
OmGP : Oligodendrocyte myelin GlycoProtein
p75^{NTR/-} : Souris dont le gène du récepteur p75^{NTR} a été invalidé
p75^{NTR} : récepteur p75 des neurotrophines
PACAP : Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PAI-I : Plasminogen Activator Inhibitor-I
PCR : Polymerase chain reaction
PDGF : Platelet-derived growth factor
PDK1 : 3-phosphoinositide-dependent kinase 1
PDZ : Post-synaptic disc-large zona
PI3K : Phosphatidyl-inositol 3-kinase
PKB : Protein kinase B
PKC : Protein-kinase C
PLC : Phospholipase C
RafK : Raf kinase
RAP : Receptor-associated protein
RCPG : récepteur couplé aux protéines G
RIP : Regulated intramembrane proteolysis
RIP-2 : Receptor interacting-protein 2
RSK : p90 ribosomal S6 kinase
RT : Reverse transcription
SAP : Sphingolipid activator protein
SC-1 : Schwann cell factor-1
SCF : Stem cell factor
Sos : Son of sevenless
TEF : TRAF domain-encompassing factor
TGF- β : Transforming growth factor- β
TNF α : Tumor necrosis factor α
TRADD : TNF receptor 1-associated death domain
TRAF : TNF receptor-associated factor
Trk : Tropomyosin receptor kinase
TRPV1 : Transient receptor vanilloid-1
VDR : Vitamine D3 receptor
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VPS10 : Vacuolar carboxy-Peptidase Sorting receptor-10
XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis

RESUME DES TRAVAUX

RESUME DES TRAVAUX

L'asthme est une maladie chronique caractérisée par une inflammation, une hyperréactivité bronchique et un remodelage structural des voies aériennes. Les mécanismes impliqués dans ces modifications ne sont pas totalement élucidés. De nombreux médiateurs inflammatoires sont actuellement à l'étude, et nous nous sommes intéressés à l'un d'eux en particulier, le facteur de croissance des nerfs ou NGF. En effet, le NGF, bien connu pour son rôle dans la croissance et la survie des nerfs, est présenté actuellement comme un médiateur de l'inflammation, en particulier dans le système pulmonaire.

Expression du NGF dans les voies aériennes

Des taux plus élevés de NGF ont été mesurés dans le sérum des patients asthmatiques par rapport à des sujets contrôles non asthmatiques. Une augmentation des taux de NGF a également été mise en évidence dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire de ces patients, et cette augmentation est encore plus grande après provocation allergénique. Ces résultats sont parallèles aux résultats observés dans les voies aériennes nasales chez les patients souffrant de rhinite allergique, montrant une augmentation des taux de NGF. La présence de NGF dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire et nasal suggère une libération locale de NGF dans les voies aériennes.

Nous avons alors voulu étudier au laboratoire les sources potentielles de NGF dans les voies aériennes. Une étude antérieure *in vitro* montrait l'expression constitutive de NGF par les fibroblastes pulmonaires humains en culture primaire (Olgart et Frossard, 2001). Par la suite, une étude *in vivo* a été réalisée par immunomarquage du NGF sur des coupes de biopsies bronchiques de patients non asthmatiques à l'aide d'un anticorps anti-NGF (Olgart-Höglund et al., 2002). Ces études ont montré un marquage des fibroblastes, confirmant les résultats obtenus *in vitro*, mais également un marquage de l'épithélium et du muscle lisse bronchique, suggérant que ces cellules structurales étaient des sources de NGF dans les voies aériennes. Nous avons confirmé ces données *in vitro* en montrant une expression constitutive du NGF par les cellules épithéliales pulmonaires A549, dans le surnageant de culture par dosage ELISA et par immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-NGF (**Publication n°1**). Nous avons également confirmé l'expression constitutive du NGF dans les cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture primaire, en mettant en évidence l'ARNm du NGF par PCR quantitative en temps réel et la protéine du NGF par dosage ELISA dans le surnageant de culture cellulaire (**Publication n°2**).

Nous avons recherché quelles cellules produisant du NGF dans les voies aériennes pouvaient être impliquées dans l'augmentation des taux de NGF en conditions inflammatoires. Les conditions inflammatoires des voies aériennes ont été « mimées » *in vitro* par traitement des cellules par l'interleukine-1 β (IL-1 β), une cytokine pro-inflammatoire libérée en grandes quantités dans les voies aériennes des patients asthmatiques. L'IL-1 β induit une augmentation de l'expression du NGF dans les cellules épithéliales humaines A549 (**Publication n°1**) et dans les cellules musculaires lisses bronchiques humaines (**Publication n°2**), avec une augmentation maximale de la protéine du NGF de près de deux fois les taux de base après 24h de traitement. Un immunomarquage réalisé sur des coupes de biopsies bronchiques provenant de patients asthmatiques montre un marquage de

l'épithélium et du muscle lisse bronchique, mais également des cellules inflammatoires infiltrées. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que les taux élevés de NGF mesurés dans les voies aériennes des patients asthmatiques pourraient avoir plusieurs origines cellulaires : d'une part les cellules structurales exprimant plus de NGF en conditions inflammatoires, et d'autre part les cellules inflammatoires infiltrées dans la muqueuse bronchique, exprimant le NGF de manière constitutive ou en quantités plus importantes.

Enfin, nous avons voulu savoir si l'augmentation des taux de NGF en conditions inflammatoires pouvait être modulée par des traitements anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes utilisés dans le traitement de l'asthme. Nous avons ainsi montré *in vitro* que la sécrétion de NGF induite par l'IL-1 β , de même que la sécrétion constitutive de NGF, sont inhibées après pré-traitement des cellules par la dexaméthasone (**Publication n°1**). Ces résultats sont en accord avec les résultats antérieurs obtenus *in vitro* au laboratoire dans les fibroblastes pulmonaires humains (*Olgart et Frossard, 2001*), et également avec les données obtenues *in vivo* montrant une diminution des taux circulants de NGF chez les patients asthmatiques traités par des glucocorticoïdes inhalés (*Noga et al., 2001*). Ces résultats suggèrent ainsi que les glucocorticoïdes inhibent la sécrétion de NGF en conditions inflammatoires et que les cellules structurales des voies aériennes pourraient être des cibles de l'action anti-inflammatoire des glucocorticoïdes.

Rôle du NGF dans l'asthme

De nombreuses études ont proposé un rôle potentiel du NGF dans l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation des voies aériennes. Au contraire, peu d'études ont été consacrées au rôle potentiel du NGF dans le remodelage bronchique. Ce remodelage structural implique notamment un épaississement du muscle lisse bronchique, dû en partie à une prolifération excessive des cellules musculaires lisses bronchiques. Nous avons alors proposé l'hypothèse d'un rôle du NGF dans la prolifération accrue des cellules musculaires lisses bronchiques (**Publication n°3**). Les voies de signalisation du NGF sont bien connues dans les cellules neuronales : l'activation de son récepteur à haute affinité, le récepteur TrkA (Tropomyosin-related kinase A), conduit notamment à l'activation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ERK1/2 et p38. Or l'activation de ces mêmes MAPK est impliquée dans la prolifération du muscle lisse bronchique induite par d'autres facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou le PDGF (Platelet-derived Growth Factor). Ainsi, le NGF pourrait participer à la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques par l'intermédiaire de l'activation de son récepteur TrkA, dont l'expression constitutive a été montrée *in vivo* dans les bronches humaines, en particulier dans le muscle lisse bronchique (*Ricci et al., 2004*).

Nous avons ainsi montré que le NGF induit la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture primaire, via l'activation d'un récepteur TrkA fonctionnel exprimé sur ces cellules (**Publication n°3**). Deux voies de signalisation distinctes activées par le récepteur TrkA sont impliquées dans cet effet : l'activation de la protéine kinase C (PKC) conduisant à l'activation de la MAPK p38 d'une part, et l'activation de la voie ras/raf conduisant à l'activation de la MAPK ERK1/2 d'autre part. L'activation de ces deux voies est nécessaire à l'effet prolifératif du NGF dans les cellules musculaires lisses bronchiques humaines.

Dans les cellules neuronales, le NGF induit une internalisation du récepteur TrkA après activation, ayant notamment pour but de réguler l'expression du récepteur TrkA à la surface de ces cellules. En conditions inflammatoires, les taux de NGF élevés dans les voies aériennes pourraient contribuer à une activation massive des récepteurs TrkA exprimés sur le muscle lisse bronchique. Nous avons alors proposé l'hypothèse de mécanismes d'internalisation du récepteur TrkA après activation par le NGF, comme c'est le cas dans les cellules neuronales, afin de réguler l'expression de ce récepteur à la surface des cellules musculaires lisses bronchiques. Nous avons ainsi étudié les mécanismes d'internalisation, de dégradation et de resynthèse du récepteur TrkA après activation par le NGF dans ces cellules en culture primaire (**Publication n°4**).

Les résultats obtenus montrent que l'activation du récepteur TrkA par le NGF conduit à son internalisation dans les cellules musculaires lisses bronchiques humaines, impliquant le recrutement de la clathrine, une molécule qui se polymérise sous la membrane cellulaire et favorise la formation des endosomes d'internalisation. Le récepteur TrkA est ensuite dégradé dans les lysosomes. De nouveaux récepteurs sont synthétisés et une augmentation de plus de 50% d'expression du récepteur TrkA est observée à la surface des cellules après 24h de traitement par le NGF (**Publication n°4**). Ainsi, nos résultats suggèrent que l'activation du récepteur TrkA par le NGF conduit après internalisation, dégradation et resynthèse, à une régulation positive de son expression à la surface des cellules. Ce mécanisme, en augmentant l'expression du récepteur TrkA à la surface du muscle lisse bronchique, pourrait induire une potentialisation des effets du NGF sur ces cellules dans les voies aériennes. Ceci reste bien sûr une hypothèse pour l'instant, qu'il faudra étudier plus en détail. Il faudra notamment vérifier la fonctionnalité des nouveaux récepteurs exprimés à la surface des cellules musculaires lisses bronchiques humaines *in vitro*, et étudier *in vivo* une augmentation potentielle de l'expression du récepteur TrkA dans les voies aériennes des patients asthmatiques.

Conclusion

Les travaux réalisés au cours de ce doctorat ont permis d'apporter des arguments supplémentaires à l'hypothèse d'un rôle du NGF dans les maladies inflammatoires comme l'asthme. Cependant, la découverte d'une expression constitutive de NGF dans les voies aériennes des sujets sains implique une fonction physiologique du NGF dans le système bronchique qu'il reste à définir et étudier. De plus, il reste à élucider un rôle potentiel de l'expression des récepteurs du NGF dans l'asthme. En effet, les expériences en cours au laboratoire suggèrent l'hypothèse d'une modification par le NGF de l'expression de ses récepteurs. Cette hypothèse reste à confirmer, mais une telle modification d'expression pourrait exister dans les voies aériennes des patients asthmatiques où les concentrations de NGF sont augmentées, et contribuer aux effets du NGF dans l'asthme.

INTRODUCTION

1. LE FACTEUR DE CROISSANCE DES NERFS

Le facteur de croissance des nerfs ou NGF appartient à la famille des neurotrophines, qui comprend chez l'homme également le facteur de croissance dérivé du cerveau (BDNF) et les neurotrophines 3 et 4/5 (NT-3 et NT-4/5). Au départ extrait à partir de sarcomes ou de glandes salivaires de souris et de venin de serpent, on sait aujourd'hui que le NGF est produit par un grand nombre de cellules, comme les cellules du système immunitaire, en particulier les lymphocytes (*Ehrhard et al., 1994 ; Lambiase et al., 1997*) et les mastocytes (*Leon et al., 1994 ; Tam et al., 1997*). Il a été montré au laboratoire que les cellules inflammatoires infiltrées dans les voies aériennes synthétisent du NGF (*Olgart Hoglund et al., 2002*). Les cellules structurales peuvent également libérer du NGF : c'est le cas par exemple des fibroblastes (*Lindholm et al., 1987 ; Lindholm et al., 1988*) ou des cellules musculaires lisses vasculaires (*Ueyama et al., 1993*). Nous avons montré au laboratoire que le NGF est produit par les cellules structurales des voies aériennes *in vivo* (*Kassel et al., 2001 ; Olgart Hoglund et al., 2002*) et *in vitro*, en particulier les fibroblastes pulmonaires (*Olgart et Frossard, 2001*), les cellules épithéliales A549 (*Pons et al., 2001*) [Publication N°1] et les cellules musculaires lisses bronchiques (*Freund et al., 2002*) [Publication N°2].

1.1. Découverte du NGF

Le NGF a été découvert il y a plus de 50 ans par Rita Levi-Montalcini et collaborateurs (*Levi-Montalcini et Hamburger, 1951 ; Levi-Montalcini, 1987 ; Levi-Montalcini et al., 1995*). Les premières expériences réalisées en 1948 ont utilisé la greffe de fragments de sarcome de souris sur des embryons de poulet âgés de 3 à 11 jours. Trois à cinq jours après la greffe, l'analyse histologique des embryons a montré une invasion du sarcome par des fibres sensibles issues du ganglion de la corne dorsale situé à proximité de la greffe. Les études complémentaires réalisées par Rita Levi-Montalcini et Viktor Hamburger ont montré que des fibres sympathiques allaient également innover la greffe, et que la taille des ganglions innervant la tumeur grossissait progressivement, atteignant jusqu'à 6 fois leur volume de départ. Enfin, des greffes de tumeurs

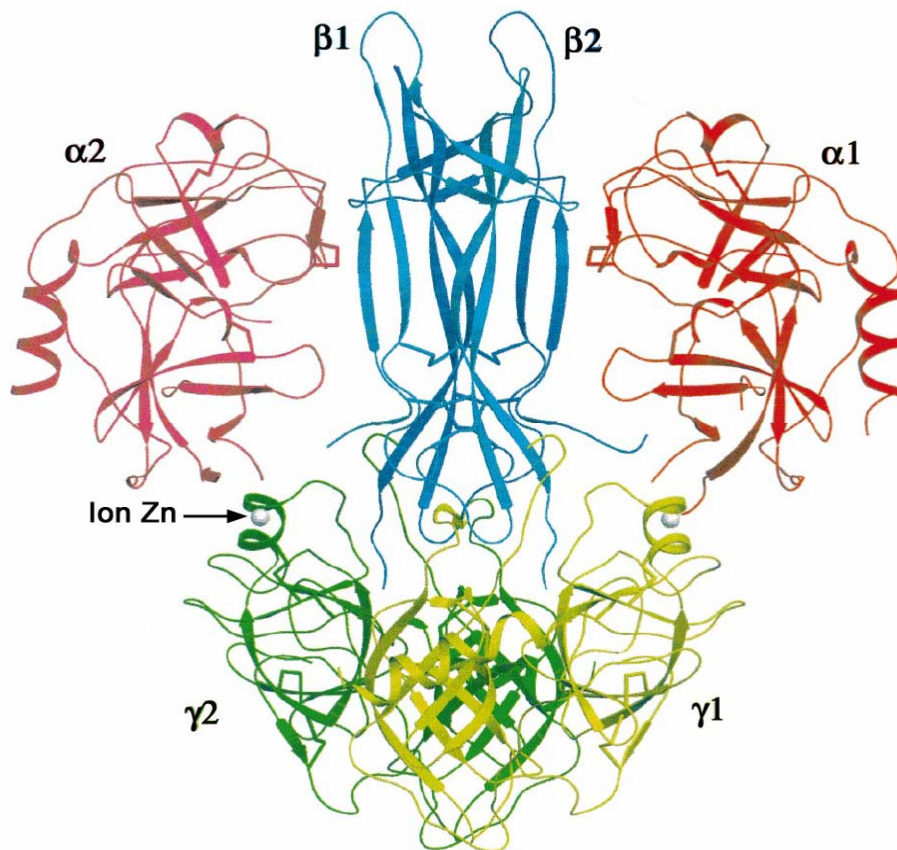


Figure 1. Structure du 7S-NGF

La sous-unité β portant l'activité biologique de facteur de croissance est sous forme de dimère et représentée en bleu. Les sous-unités γ représentées en vert sont fortement liées entre elles et aux sous-unités α par l'intermédiaire d'un ion zinc. Chaque site actif de la sous-unité γ est lié à l'extrémité C-terminale de la sous-unité β .

D'après Bax et al., 1997 et Yarski et al., 2000

ont été réalisées sur les membranes chorio-allantoïdiennes d'embryons de poulet. La tumeur n'était pas en contact direct avec les tissus embryonnaires, mais seulement reliée aux autres tissus par le système circulatoire. Quatre jours après la greffe, la tumeur était innervée par des nerfs issus de l'embryon (*Levi-Montalcini et Hamburger, 1951*). L'ensemble de ces résultats a permis d'avancer l'hypothèse de l'existence d'un agent soluble libéré par la tumeur et favorisant son innervation. Cet agent fut isolé quelques années plus tard à partir de sarcomes et de glandes salivaires de souris de même qu'à partir de venin de serpent, et a été appelé facteur de croissance des nerfs ou NGF.

1.2. Structure du 7S-NGF

L'analyse du NGF après extraction des glandes salivaires sous-maxillaires de souris a permis l'identification d'une structure de haut poids moléculaire (entre 130 et 140 kDa). Cette structure a été appelée le 7S-NGF car son coefficient de sédimentation est de 7 svedbergs (S). Le 7S-NGF a été mis en évidence uniquement dans les glandes salivaires, en particulier chez la souris (*Bradshaw et al., 1994*). Ce complexe est constitué de 3 sous-unités appelées α , β et γ . Le complexe 7S-NGF soluble se dissocie à pH situé entre 5 et 8, les liaisons entre les différentes sous-unités ne sont stables qu'en dehors de cet intervalle de pH (*Yarski et al., 2000*).

La stœchiométrie du complexe 7S-NGF est généralement $\alpha_2\beta_2\gamma_2$: le dimère β est situé au centre de la structure et les sous-unités α et γ forment autour une structure en fer à cheval, en s'arrangeant de manière symétrique autour de l'axe central formé par le dimère β (Figure 1). Les deux sous-unités α sont liées au β -NGF mais pas entre elles. Les 2 sous-unités γ sont aussi liées au β -NGF, mais également entre elles par une large surface de contact qui contribue à la stabilisation du complexe 7S-NGF (*Bax et al., 1997*). Cette stabilisation est renforcée par la présence de 2 atomes de zinc, localisés aux interfaces entre les sous-unités α et γ . Ils sont liés à la structure grâce aux résidus Glu75 et His82 de chacune des sous-unités α , et aux résidus His217 et Glu222 de chacune des sous-unités γ (*Bax et al., 1997*).

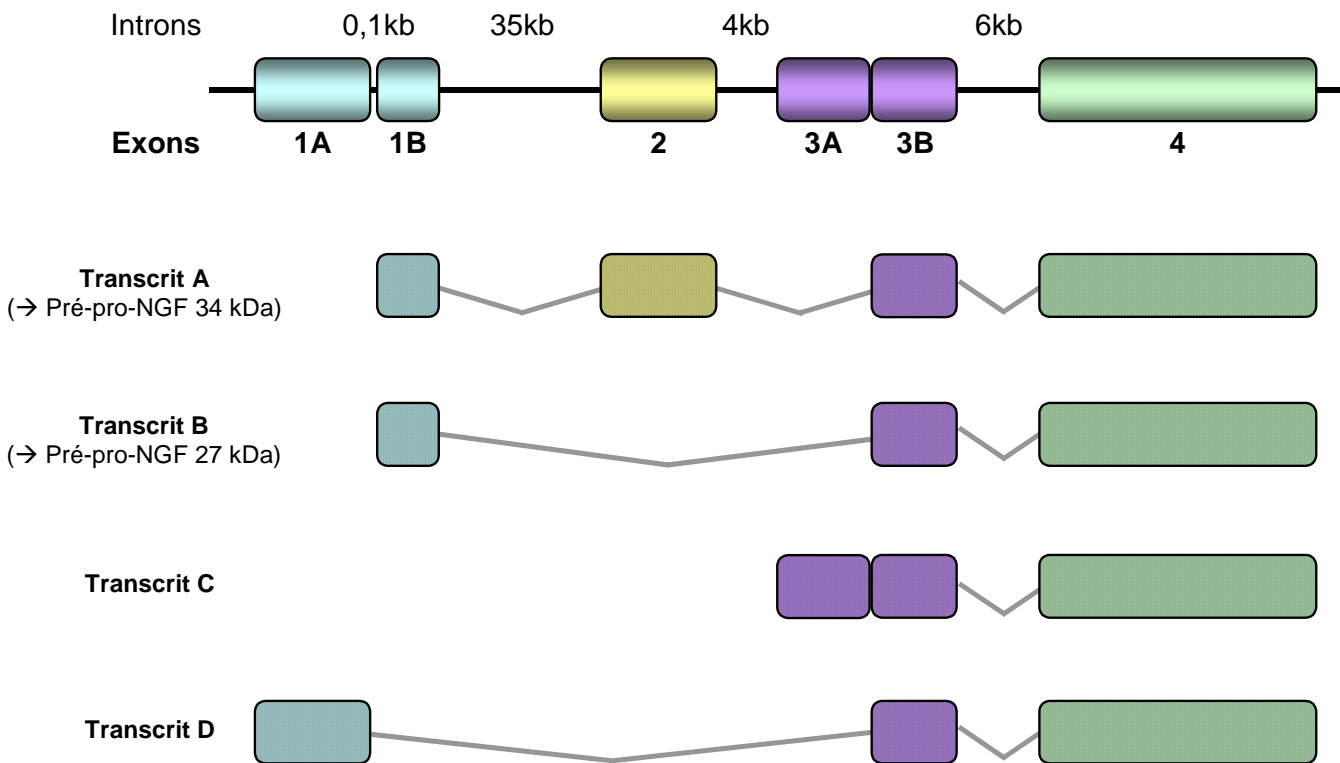


Figure 2. Structure du gène murin du NGF et de ses différents transcrits

Le gène codant pour le β -NGF est constitué de 6 exons séparés par 4 introns de tailles très différentes allant de 0,1 à 35kb. Les premiers exons sont courts et non codants, et seul l'exon 4 code pour la protéine du β -NGF. 80% d'homologie de séquence ont été mis en évidence entre les gènes murins et humains du β -NGF, allant jusqu'à 90% d'homologie de séquence dans le dernier exon. L'épissage alternatif de l'exon 2 ainsi que la présence d'un deuxième promoteur interne en amont de l'exon 3 conduit à la formation de 4 transcrits A, B, C et D. Les transcrits majeurs A et B ont été caractérisés chez l'homme, et conduisent à la synthèse de deux pré-pro-NGF de 34 et 27 kDa respectivement (voir Figure 3).

D'après Carrier et al., 1996 et Yu et Fahnestock 2002

1.3. La sous-unité β ou β -NGF

La sous-unité β ou β -NGF se présente sous la forme d'un dimère à pH physiologique et c'est ce dimère qui porte l'activité biologique. Le β -NGF est inactif dans le complexe 7S, suggérant que cette forme de haut poids moléculaire serait plutôt une forme de stockage du NGF (*Yarski et al., 2000*).

1.3.1. Transcription du β -NGF

1.3.1.1. Structure du gène codant pour le β -NGF

Le gène codant pour la protéine du β -NGF est situé sur le chromosome 3 chez la souris (*Zabel et al., 1985*), et sur le bras court du chromosome 1 chez l'homme (*Francke et al., 1983*). La structure du gène est similaire entre les différentes espèces : il est constitué d'une séquence contenant 6 exons séparés par 4 introns (*Selby et al., 1987*). Seul le dernier exon localisé à l'extrémité 3' du gène possède un site ATG initiateur de la traduction protéique et code pour la protéine du NGF (*Hallbook et al., 1988*). Les premiers exons en position 5' sont courts (*D'Mello et Heinrich, 1991*). De plus, les exons 1 et 3 sont divisés en sous-introns 1A et 1B, et 3A et 3B, pouvant subir un épissage alternatif et donner différents transcrits (Figure 2) (*Carrier et al., 1992 ; Carrier et al., 1996*). Les exons sont séparés par de longs introns de plusieurs milliers de nucléotides : chez l'homme par exemple, l'intron situé entre les exons 1 et 2 est composé de 45,5kb, et celui situé entre les exons 2 et 3 de 6,8kb (*Carrier et al., 1996*). La taille du gène varie entre les espèces en fonction de la taille des différents introns : elle est de 20kb chez le poulet (*Carrier et al., 1992*), de 43kb chez la souris (*Selby et al., 1987*) et près de 60kb chez l'homme (*Carrier et al., 1996*). Il existe néanmoins une homologie de séquence entre les gènes des différentes espèces. On trouve par exemple une homologie de séquence de plus de 80% en comparant le gène du β -NGF chez l'homme et chez la souris. Cette homologie peut même dépasser les 90% dans la séquence du dernier exon (*Ullrich et al., 1983*).

1.3.1.2. Structure du promoteur du gène du β -NGF

Le promoteur du gène du β -NGF a été étudié en premier lieu chez la souris et présente 95% d'homologie avec le promoteur du NGF décrit chez le rat (*Zheng et Heinrich, 1988*). L'existence de deux boîtes TATA a été mise en évidence en positions -49 et -28, ainsi que la présence de deux boîtes CAAT en positions -546 et -379 (*Zheng et Heinrich, 1988*).

Ces promoteurs présentent une faible homologie de séquence avec le promoteur caractérisé chez l'homme. Chez l'homme comme chez la souris, une région promotrice de la transcription est décrite en positions -85 à -45, mais aucune séquence consensus de boîte TATA n'a pu être mise en évidence dans le promoteur du gène humain du β -NGF (*Cartwright et al., 1992*). Une séquence consensus pour le facteur de transcription AP-1 a été mise en évidence à l'extrémité 5' de l'exon 1 chez la souris, en position +36 (*D'Mello et Heinrich, 1991*). Cette séquence consensus est retrouvée dans le gène du β -NGF chez l'homme, où on trouve également un deuxième site consensus pour AP-1 en position -75, qui n'existe pas chez la souris (*Cartwright et al., 1992*). Un site consensus a également été identifié chez le rat entre les positions -90 et -59 et permet la fixation des facteurs de transcription de la famille C/EBP (« CCAAT/enhancer binding protein ») (*Colangelo et al., 1998 ; Colangelo et al., 2004 ; McCauslin et al., 2006*). Directement adjacent à cet élément de réponse, on trouve un site consensus CRE (« cAMP responsive element ») (*Colangelo et al., 1998 ; McCauslin et al., 2006*). Enfin, un site κ B de fixation du facteur de transcription NF κ B a été identifié dans le promoteur du NGF humain, à la position -669 (*Jehan et al., 1993 ; Friedman et al., 1996*). Cet élément de réponse κ B est également retrouvé dans le promoteur du NGF chez la souris (*Friedman et al., 1996*). Un deuxième promoteur a été mis en évidence dans le gène du β -NGF chez la souris et chez l'homme. Ce promoteur est situé dans le troisième intron et est associé à un site d'initiation de la transcription fonctionnel situé au début de l'exon 3 (*Racke et al., 1996*).

1.3.1.3. Les différents transcrits du β -NGF

La présence de 2 promoteurs ainsi que des mécanismes d'épissage alternatif conduisent à la synthèse de différents ARN messagers (ARNm) du NGF. Ces transcrits ont particulièrement été étudiés chez la souris (*Edwards et al., 1986 ; Selby et al., 1987*), révélant la présence de 4 ARNm différents, appelés A, B, C et D, dont deux sont majeurs (A et B) et deux mineurs (C et D) (Figure

2). Le transcrit A code pour un précurseur de 34kDa. Le transcrit B résulte de l'épissage alternatif de l'exon 2 et code pour un précurseur de 27kDa (*Edwards et al., 1986*). Le transcrit C mineur résulte de l'activation du 2^{ème} promoteur situé en amont de l'exon 3 (*Selby et al., 1987*). Enfin, le transcrit D, également mineur, résulte d'un épissage partiel des exons 1 et 3 (*Edwards et al., 1986*). Les mêmes transcrits ont été identifiés récemment chez le rat (*Yu et Fahnstock, 2002*), alors que le nombre de ces transcrits est beaucoup plus grand chez d'autres espèces comme chez le poulet (*Bertaux et al., 2004*). En effet, plus d'une vingtaine d'ARNm matures ont été identifiés chez le poulet, dus notamment à la présence d'exons auxiliaires supplémentaires dans le gène codant pour le NGF. Ces exons, encore appelés auxons, peuvent être considérés comme introns ou exons au moment de la transcription, augmentant ainsi le nombre d'ARNm synthétisés possibles (*Bertaux et al., 2004*). Les différents transcrits du NGF ont été peu étudiés chez l'homme, et seuls les transcrits majeurs A et B humains ont été caractérisés (*Edwards et al., 1986*).

Le rôle de ces différents transcrits n'est toujours pas connu à l'heure actuelle. Une différence d'expression des transcrits majeurs A et B a été décrite chez la souris et le rat. En effet, à part dans les glandes salivaires et le placenta où les proportions sont inversées, le transcrit B codant pour le précurseur court du NGF est majoritaire dans les autres organes étudiés, comme dans l'intestin, le rein, le cœur et différentes structures du cerveau (*Edwards et al., 1986 ; Selby et al., 1987*). Les transcrits mineurs C et D sont détectés uniquement dans le cœur et le cortex cérébral, où ils représentent environ 5 à 10% des ARNm totaux du NGF dans ces organes (*Fahnstock, 1991*). De plus, une régulation différentielle de l'expression de ces différents transcrits a été mise en évidence en fonction de l'espèce étudiée. L'activation par le TGF- β 1 (« *Transforming growth factor- β 1* ») induit chez la souris comme chez le rat une augmentation de l'expression de l'ARNm du NGF par les cellules gliales (*Yu et Fahnstock, 2002*). Cette augmentation est due chez le rat à une augmentation de l'expression du transcrit C. Au contraire, chez la souris, alors que l'expression du transcrit C n'est pas modifiée, ce sont celles des transcrits A et D qui augmentent (*Yu et Fahnstock, 2002*).

Néanmoins, en sachant que les niveaux des différents transcrits évoluent de manière parallèle au cours du développement, et que tous les transcrits contiennent l'exon 4 codant pour la séquence du NGF mature, la question de la fonction et du rôle de la prédominance d'un transcrit du NGF par rapport à l'autre n'est pas résolue.

1.3.1.4. Régulation de la transcription du β -NGF

La transcription du NGF peut-être modulée par différents facteurs, en particulier en conditions pro- et anti-inflammatoires, mais également suite à des lésions tissulaires, ou encore suite à l'activation des récepteurs β 2-adrénergiques et des récepteurs VDR de la vitamine D3.

1.3.1.4.1. Conditions pro- et anti-inflammatoires

Une augmentation de l'ARNm du NGF en conditions inflammatoires a été mise en évidence dans les cellules neuronales en culture, en particulier après traitement par les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (« *Tumor necrosis factor- α* ») et l'IL-1 β (« *Interleukin-1 β* ») (Gadient et al., 1990 ; Vige et al., 1991 ; Friedman et al., 1992 ; Hattori et al., 1993 ; Pshenichkin et al., 1994 ; Friedman et al., 1996 ; Dethleffsen et al., 2002), mais également dans des cellules structurales comme des fibroblastes de rat issus du tissu conjonctif entourant le nerf sciatique, des fibroblastes 3T3 de souris et des fibroblastes humains issus du prépuce (Lindholm et al., 1988 ; Hattori et al., 1993), ou des adipocytes de souris (Peeraully et al., 2004). Nous avons montré au laboratoire que l'IL-1 β induit également une augmentation de la synthèse de NGF dans les fibroblastes pulmonaires humains (Olgart et Frossard, 2001), les cellules épithéliales A549 (Pons et al., 2001) [Publication N°1] et les cellules musculaires lisses bronchiques humaines (Freund et al., 2002) [Publication N°2]. Cette augmentation est due d'une part à une augmentation de la stabilité de l'ARNm du NGF (Lindholm et al., 1988 ; Vige et al., 1991 ; Pshenichkin et al., 1994), et d'autre part à une activation de la transcription du gène du NGF (Lindholm et al., 1988 ; Vige et al., 1991 ; Friedman et al., 1992 ; Pshenichkin et al., 1994 ; Friedman et al., 1996 ; Galve-Roperh et al., 1997 ; Heese et al., 1998). Deux voies de signalisation sont impliquées dans l'activation de cette transcription : d'une part l'activation du facteur de transcription NF κ B (Friedman et al., 1996 ; Heese et al., 1998 ; Heese et al., 2006) et d'autre part l'induction de la synthèse de c-jun et c-fos, conduisant à la formation et l'activation du facteur de transcription AP-1 (Friedman et al., 1992 ; Pshenichkin et al., 1994).

Le traitement par un glucocorticoïde anti-inflammatoire, la dexaméthasone, diminue les taux de base d'ARNm du NGF et bloque l'augmentation des taux d'ARNm du NGF induite en conditions inflammatoires (Lindholm et al., 1990 ; Lindholm et al., 1992 ; Pshenichkin et al., 1994 ;

Noga et al., 2005). Des résultats comparables ont été observés au laboratoire dans les fibroblastes pulmonaires (*Olgart et Frossard, 2001*) et les cellules épithéliales A549 (*Pons et al., 2001*) [Publication N°1].

1.3.1.4.2. Lésions tissulaires

Des études ont montré qu'une lésion du nerf sciatique chez le rat (*Heumann et al., 1987*) et chez la souris (*Dethleffsen et al., 2002*) entraîne une augmentation rapide des taux d'ARNm du NGF à proximité de la lésion, le NGF participant à la régénération du nerf. Cette augmentation d'expression d'ARNm a lieu principalement dans les cellules non neuronales entourant la lésion (*Lindholm et al., 1990*) et implique l'augmentation de l'expression de c-fos et c-jun puis la formation et l'activation du facteur de transcription AP-1 (*Hengerer et al., 1990 ; Metsis, 2001*). Une augmentation des taux d'ARNm du NGF a été mise en évidence suite à d'autres lésions tissulaires chez le rat, comme au cours d'un infarctus (*Hiltunen et al., 2001*) ou au cours d'une ischémie cérébrale (*Chang et al., 2005 ; Yoshida et al., 2005*).

1.3.1.4.3. Activation des récepteurs de la vitamine D3 et β 2-adrénergiques

L'activation du récepteur de la vitamine D3 (VDR) et du récepteur β 2-adrénergique (β 2R) sont également à l'origine d'une augmentation de la transcription du NGF dans les astrocytes (*Mocchetti et al., 1989 ; Colangelo et al., 1996*) ou les ostéoblastes (*Veenstra et al., 1998*) de rat, de même que dans les fibroblastes 3T3 de souris (*Samina Riaz et Tomlinson, 2000*). Le récepteur VDR se fixe sur son élément de réponse situé dans le promoteur du NGF, et il semble également que le facteur de transcription AP-1 soit impliqué dans cette régulation VDR-dépendante (*Veenstra et al., 1998*). L'activation du récepteur β 2R conduit à la phosphorylation du facteur CREB et l'activation de la transcription du NGF par l'intermédiaire des protéines C/EBP dans le cortex cérébral de rat (*Colangelo et al., 1998*) ou dans des cellules gliales de rat en culture primaire (*Colangelo et al., 2004*).

1.3.1.4.4. Polymorphismes

Un polymorphisme a été récemment caractérisé dans le promoteur du β -NGF chez les sujets caucasiens avec la transition d'une base T en base C en position -198 (*Alam et al., 2005*). Le rôle exact de ce polymorphisme n'est pas connu, mais il intervient dans le site consensus de liaison du VDR et pourrait ainsi modifier la liaison du VDR à cet élément de réponse, mais ceci n'a pas encore été étudié pour l'instant (*Alam et al., 2005*). Il s'agit à l'heure actuelle du seul polymorphisme dans le promoteur du β -NGF décrit chez l'homme.

1.3.2. Traduction du β -NGF

La protéine du NGF est traduite à partir des deux transcrits majeurs A et B pour produire deux pré-pro-NGF de 34 et 27kDa, avec leur site d'initiation de la traduction situé respectivement en position -187 et -121 (Figure 3) (*Fahnestock et al., 2004a*). Le clivage de la séquence signal dans le réticulum endoplasmique conduit à des molécules de pro-NGF de 32 et 25 kDa (*Darling et al., 1983 ; Ullrich et al., 1983 ; Edwards et al., 1986 ; Selby et al., 1987 ; Edwards et al., 1988*). Le pro-NGF contient 3 sites potentiels de glycosylation, deux dans le pro-segment, et un dans la forme mature. Alors que la glycosylation de la forme mature existe très peu (*Seidah et al., 1996*), une N-glycosylation dans le pro-segment serait importante pour le ciblage du pro-NGF en dehors du réticulum endoplasmique (*Suter et al., 1991 ; Seidah et al., 1996*). Néanmoins, de nombreux tissus expriment la forme non glycosylée du pro-NGF (*Fahnestock, 1991 ; Chen et al., 1997*). Le pro-NGF subit ensuite d'autres modifications post-traductionnelles aux extrémités C- et N-terminales pour générer le NGF mature (*Darling et al., 1983*). Plusieurs autres formes de taille différente ont été identifiées chez la souris et le rat (*Fahnestock et al., 2004a*).

La maturation de l'extrémité C-terminale du pro-NGF a lieu entre deux paires de résidus arginine, alors que celle de l'extrémité N-terminale intervient sur différents sites contenant des résidus basiques. La furine, mais aussi d'autres convertases sont capables de réaliser la maturation du NGF sur son extrémité N-terminale (*Bresnahan et al., 1990 ; Seidah et al., 1996*). La sous-unité γ du NGF participe à la maturation de l'extrémité C-terminale de la sous-unité β (Voir chapitre 1.4.2). Plus récemment, des études ont montré que la plasmine et la métalloprotéinase de matrice 7

(MMP-7 pour « *Matrix metalloproteinase-7* ») peuvent aussi cliver le pro-NGF et participer à cette maturation (Lee et al., 2001).

Pendant de nombreuses années, la forme pro-NGF a simplement été considérée comme une forme intermédiaire dans la synthèse du β -NGF mature, sans rôle particulier : on supposait que son clivage était systématique et que le β -NGF mature était la forme majoritaire exprimée dans tous les tissus. De nombreuses études récentes montrent qu'en fait, le pro-NGF est la protéine sécrétée majoritairement par de nombreux tissus, comme par exemple par les cellules de la prostate, les follicules capillaires, les neurones sympathiques ou les astrocytes en culture primaire (Chen et al., 1997 ; Delsite et Djakiew, 1999 ; Yardley et al., 2000 ; Fahnestock et al., 2001 ; Smith et al., 2002 ; Fahnestock et al., 2004a ; Fahnestock et al., 2004b ; Bierl et al., 2005). De plus, des études récentes démontrent que le pro-NGF lui-même est capable d'induire des effets pro-apoptotiques (Lee et al., 2001 ; Beattie et al., 2002 ; Chao et Bothwell, 2002 ; Ibanez, 2002 ; Fahnestock et al., 2004b). Ainsi, le pro-NGF est non seulement une forme sécrétée en grandes quantités par les cellules, mais peut aussi de lui-même induire des effets différents de ceux induits par le β -NGF mature (Voir chapitre 2.2.4.3).

1.3.3. Structure protéique du β -NGF

La sous-unité β mature est constituée généralement d'une chaîne de 118 acides aminés. Mais il existe des fragments plus courts, résultant du clivage d'un octapeptide à l'extrémité N-terminale par des peptidases (Angeletti et al., 1973 ; Mobley et al., 1976), ou du clivage d'un résidu Arg à l'extrémité C-terminale par des carboxypeptidases (Moore et al., 1974 ; Silverman et Bradshaw, 1982). Le β -NGF est la sous-unité la plus basique du complexe 7S-NGF, avec un point isoélectrique à 9,4 (Fahnestock, 1991).

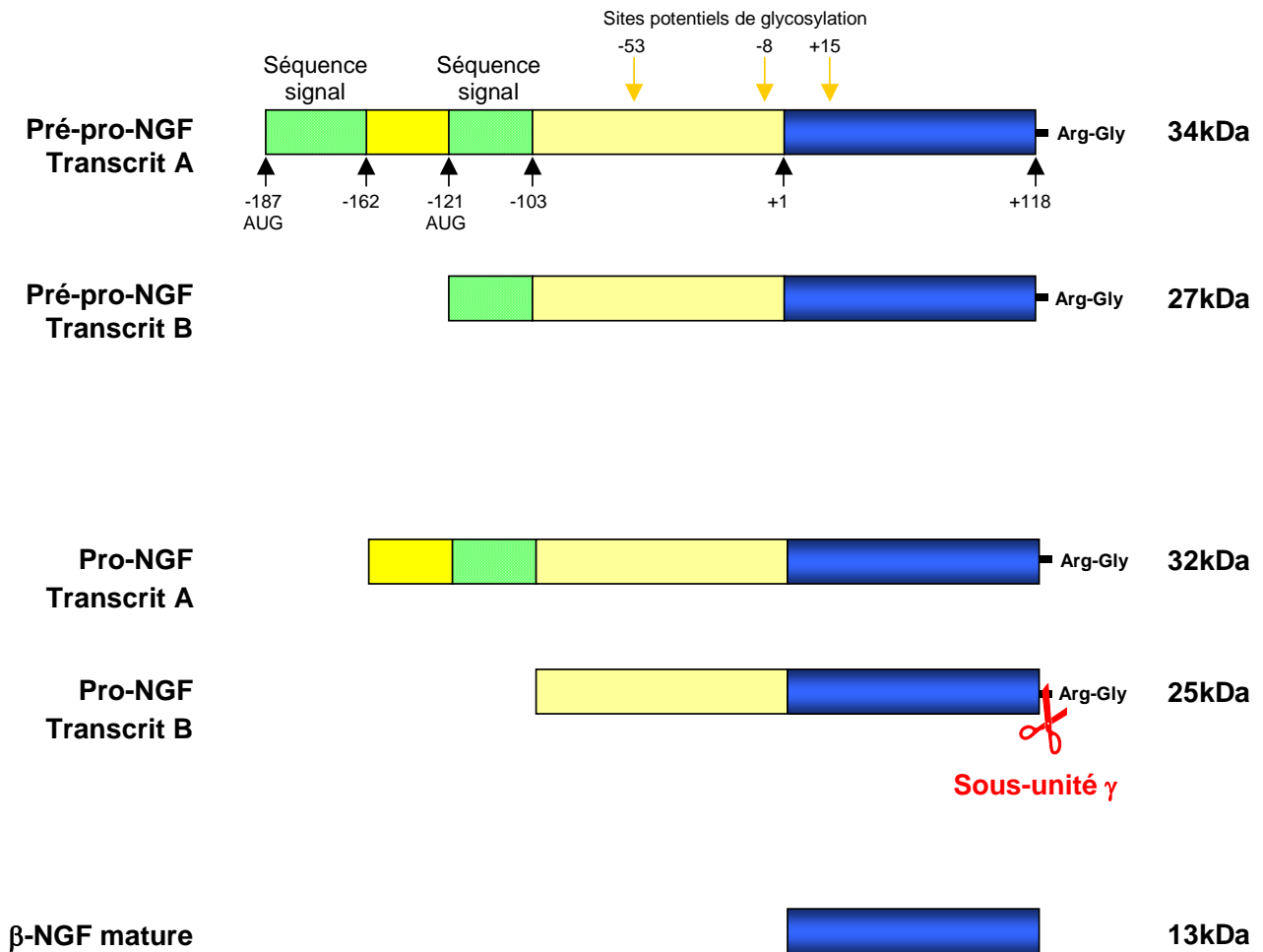


Figure 3. Biosynthèse du NGF

La traduction des transcrits A et B chez l'homme conduit à la synthèse de deux pré-pro-NGF de 34 et 27kDa. Le clivage de la séquence signal dans le réticulum endoplasmique conduit à la formation de deux pro-NGF de 32 et 25kDa. Ces précurseurs sont ensuite à nouveau clivés pour donner la même forme mature du β -NGF de 13kDa comportant une séquence de 118 acides aminés.

D'après Fahnestock et al., 2004a

Chaque monomère β a une forme allongée, avec une partie centrale constituée de 4 feuillets β arrangés de manière anti-parallèle (Figure 4A) (Wiesmann et de Vos, 2001). Une extrémité est composée de 3 boucles en épingle à cheveux et 3 feuillets β courts anti-parallèles, alors que l'autre extrémité comporte 3 ponts disulfure indispensables à l'activité biologique (Jongstra-Bilen et al., 1989). Deux de ces ponts disulfure sont formés entre les résidus Cys58 et Cys108 et entre les résidus Cys68 et Cys110, et forment une structure cyclique, dans laquelle passe le 3^{ème} pont disulfure formé entre les résidus Cys15 et Cys80 (McDonald et Chao, 1995). Cette structure est appelée un nœud à cystéine (« *cystine knot* »), et est retrouvé dans la structure d'autres protéines, comme par exemple dans celle du TGF- β ou du PDGF (Oefner et al., 1992 ; Schlunegger et Grutter, 1993).

Deux monomères de β -NGF s'associent de manière parallèle, grâce à des interactions entre les feuillets β (Edwards et al., 1988 ; McDonald et Chao, 1995). Ces interactions sont de type hydrophobe et résultent de l'interaction entre des résidus aromatiques, impliquant notamment le résidu Tyr52 et les résidus Trp21, Trp76 et Trp99 qui lorsqu'ils sont mutés, entraînent la déstabilisation du complexe et la perte de l'activité biologique (Bradshaw et al., 1994). Le reste des contacts est assuré par l'interaction entre des acides aminés aliphatiques, comportant des chaînes β ramifiées, et par la formation de nombreuses liaisons hydrogène, notamment entre les résidus Arg69, Arg100 et His75 et les résidus Asp16, Thr91 et Asp72 respectivement (Bradshaw et al., 1994). La constante de dissociation du dimère β -NGF est de 10^{-13} M, montrant la très grande stabilité de ce complexe (Server et Shooter, 1977). Le dimère de β -NGF a la forme d'un haltère (Figure 4B) avec les deux feuillets β formant la poignée, alors que les extrémités sont constituées d'une part par les nœuds à cystéine et les extrémités C- et N-terminales, et d'autre part par les boucles en épingle à cheveux et les feuillets β courts (Edwards et al., 1988).

Parmi les différentes formes de NGF isolées à partir des glandes salivaires de souris, 2% sont glycosylées sur la sous-unité β au niveau du résidu Asn45, mais le rôle exact de cette modification n'est pas connu. En effet, la mutation du résidu Asn45 empêchant cette glycosylation ne modifie pas son activité biologique (Murphy et al., 1989).

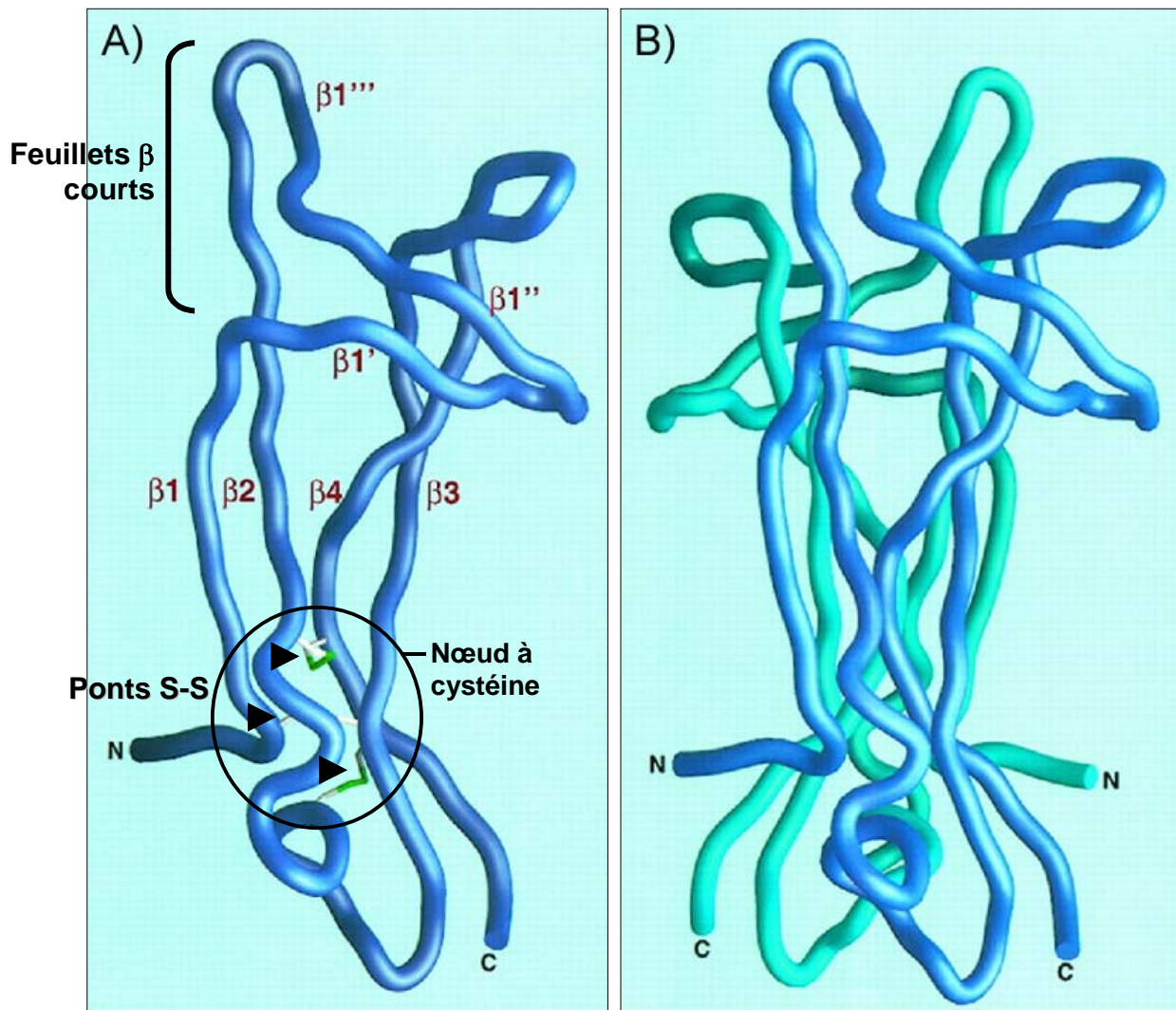


Figure 4. Structure du β -NGF

Chaque monomère de β -NGF est une chaîne de 118 acides aminés (A). La partie centrale est formée de 4 feuillets β anti-parallèles ($\beta 1$ à $\beta 4$). Une extrémité de la structure comporte 3 ponts disulfure représentés en vert et blanc, et indispensables à l'activité biologique du NGF, alors que l'autre extrémité est formée de 3 boucles en épingle à cheveux et de 3 feuillets courts anti-parallèles ($\beta 1'$ à $\beta 1'''$). 2 chaînes s'associent de manière non covalente selon un axe de symétrie vertical pour former un dimère (B). C'est ce dimère qui est présent à pH physiologique et qui porte l'activité biologique.

D'après Bradshaw et al., 1994 et McDonald et Chao, 1995

Curieusement, alors qu'aucune phosphorylation du β -NGF n'a été décrite sur des résidus Sérine ou Thréonine, une phosphorylation du β -NGF a récemment été mise en évidence sur d'autres résidus (*Klumpp et al., 2006*) : une N-phosphorylation a été mise en évidence sur des résidus Lysine, Histidine et Arginine, et une S-phosphorylation sur des résidus Cystéine (*Klumpp et al., 2006*). Ces phosphorylations sont nécessaires à l'activité biologique du NGF, mais le mécanisme de phosphorylation, de même que le rôle exact de ces phosphorylations dans l'activité du NGF ne sont pas encore connus. La nature des kinases responsables de ces phosphorylations est également à l'étude (*Klumpp et al., 2006*).

1.4. Les sous-unités α et γ

Les sous-unités α et γ appartiennent à la famille des kallicroïnes glandulaires, une sous-famille de sérine-protéinases de type chymotrypsine exprimées uniquement dans les glandes salivaires (*Bradshaw et al., 1994 ; Yarski et al., 2000*).

1.4.1. La sous-unité α

La sous-unité α du complexe 7S-NGF est codée par le gène *mGK-4*, localisé sur le chromosome 7 (*Evans et Richards, 1985*). Elle est d'abord synthétisée sous la forme d'une chaîne unique de 32kDa appelée pré-pro-sous-unité α , puis cette chaîne est clivée pour former la pro-sous-unité α de 30kDa, qui est glycosylée (*Darling et al., 1983*). La pro-sous-unité α est ensuite clivée pour former 2 chaînes de 10 et 16kDa reliées par des ponts disulfure (*Isackson et al., 1987*). La maturation finale de la sous-unité α nécessiterait normalement le clivage de l'extrémité N-terminale fixée à l'intérieur de son site catalytique et bloquant son activité enzymatique. Ce clivage nécessite la présence d'un résidu Arginine en position 15, présent normalement dans toutes les sérine-protéinases. Or dans la sous-unité α , ce résidu Arginine est substitué par un résidu Acide Glutamique. Cette substitution empêche le clivage nécessaire à sa maturation finale, et le site catalytique de la sous-unité α reste ainsi inactif (*Isackson et Bradshaw, 1984 ; Isackson et al., 1984 ; Yarski et al., 2000*).

Les fonctions exactes des sous-unités α dans le complexe 7S-NGF restent encore mal connues. Il existe de nombreuses interactions hydrophobes entre les boucles des sous-unités α et

des résidus hydrophobes des sous-unités β (Bax *et al.*, 1997). De plus, le point isoélectrique des sous-unités α varie de 4,1 à 4,6. Cette sous-unité est ainsi la plus acide du complexe 7S-NGF (Fahnestock, 1991), et interagit avec la partie centrale des sous-unités β basiques. L'ensemble des interactions formées entre les sous-unités α et β contribuent à stabiliser le complexe 7S-NGF (Fahnestock, 1991).

1.4.2. La sous-unité γ

La sous-unité γ du complexe 7S-NGF est codée par le gène *mGK-3*, localisé de manière contiguë au gène *mGK-4* sur le chromosome 7 (Evans *et Richards*, 1985). Cette sous-unité est d'abord synthétisée sous la forme d'une chaîne unique, qui est ensuite clivée pour former un arrangement de plusieurs chaînes reliées par des ponts disulfure. La nature des enzymes responsables de ces différents clivages n'est pas connue, mais la séquence en acides aminés des sites de clivage suggère des enzymes de type trypsine (Fahnestock, 1991).

Les sous-unités γ matures sont des protéines glycosylées ayant un poids moléculaire de 26kDa (Ullrich *et al.*, 1984). Six formes différentes ont été identifiées, qui varient en fonction de l'association de 2 ou 3 chaînes protéiques. Il n'existe aucune différence d'activité entre ces formes, mais la présence de sous-unités γ constituées de 3 chaînes polypeptidiques confère une plus grande stabilité au complexe 7S-NGF (Thomas *et al.*, 1981 ; Nichols *et Shooter*, 1983).

Les sous-unités γ participent à la maturation du NGF, grâce à une activité estérase (Greene *et al.*, 1968). L'extrémité C-terminale du β -NGF est constituée de 3 résidus Arg-Arg-Gly. La sous-unité γ induit un clivage entre les 2 résidus Arg, et reste lié par son site catalytique au résidu Arg118 de la nouvelle extrémité C-terminale du β -NGF (Berger *et Shooter*, 1977 ; Bothwell *et Shooter*, 1978). Le clivage du résidu Arg118 de l'extrémité C-terminale du β -NGF en cours de maturation par des carboxypeptidases (Voir paragraphe 1.3.3.) empêche la liaison à la sous-unité γ et la formation du complexe 7S-NGF, permettant ainsi la libération du β -NGF actif (Moore *et al.*, 1974). La liaison à la sous-unité β est renforcée par la formation de nombreuses liaisons hydrogène impliquant des résidus exprimés autour du site catalytique de la sous-unité γ (Bax *et al.*, 1997).

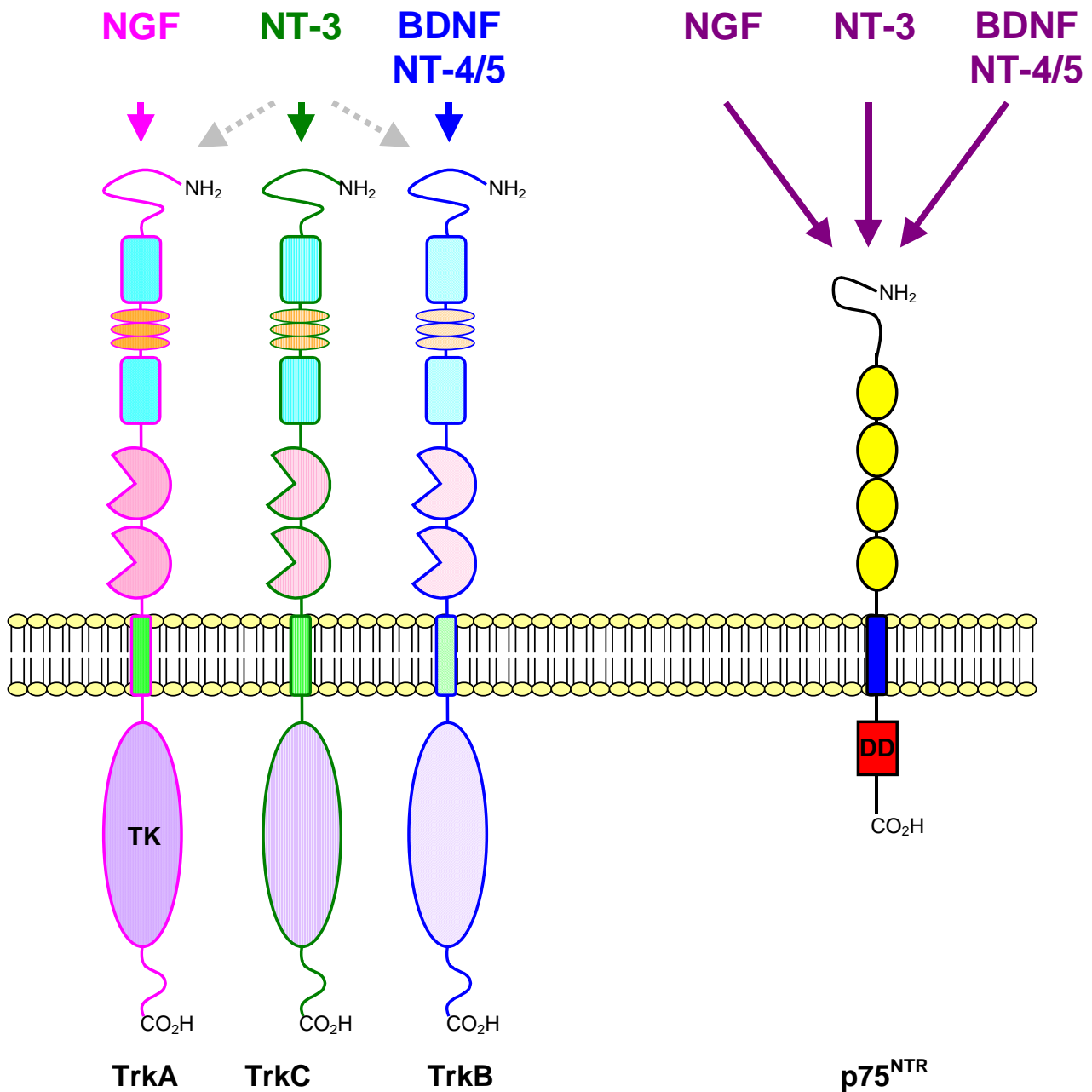


Figure 5. Les récepteurs des neurotrophines

Les neurotrophines se lient à deux types de récepteurs transmembranaires : A) les récepteurs de la famille Trk comportant une seule hélice transmembranaire et une activité tyrosine kinase intrinsèque (TK). Le récepteur TrkA lie le NGF, le récepteur TrkB le BDNF et la NT-4/5, et le récepteur TrkC la NT-3. Il existe des réactions croisées : la NT-3 est également capable de lier les récepteurs TrkA et TrkB, mais avec une plus faible affinité. B) le récepteur p75 des neurotrophines p75^{NTR} qui lie toutes les neurotrophines avec la même affinité de l'ordre du nanomolaire. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs de la mort (death receptors) et possède une séquence de domaine de mort (death domain DD) dans sa partie intracellulaire.

2. RECEPTEURS DU NGF ET VOIES DE SIGNALISATION

Les neurotrophines forment des homodimères qui activent deux types de récepteurs : les récepteurs de la famille Trk (« *Tropomyosin-related kinase* »), liant les neurotrophines avec une affinité de l'ordre du picomolaire et comportant une activité tyrosine kinase intrinsèque, et le récepteur p75^{NTR} ou récepteur p75 des neurotrophines, qui lie l'ensemble des neurotrophines avec la même affinité de l'ordre du nanomolaire, et lie également les pro-neurotrophines (Chao, 2003). Chaque récepteur Trk a un ligand privilégié : le NGF se lie au récepteur TrkA, le BDNF et la NT-4/5 au récepteur TrkB, et la NT-3 au récepteur TrkC. Il peut y avoir des réactions croisées : c'est le cas de la NT-3 qui peut également se lier aux récepteurs TrkA et TrkB (Figure 5) (Ryden et Ibanez, 1996).

2.1. Le récepteur TrkA

Le récepteur TrkA est exprimé à la membrane des cellules des systèmes nerveux central et périphérique chez l'homme (Muragaki et al., 1995), mais également sur des cellules non neuronales comme les cellules du système immunitaire ou les cellules structurales (Levi-Montalcini, 1987 ; Levi-Montalcini et al., 1995 ; Aloe et al., 1997). Dans les voies aériennes, le récepteur TrkA a été montré à la surface de cellules inflammatoires, en particulier les mastocytes purifiés issus du poumon humain (Tam et al., 1997) ainsi que les mastocytes *in situ* (Kassel et al., 2001). L'expression du récepteur TrkA a également été mise en évidence sur les cellules structurales des voies aériennes, comme sur les fibroblastes pulmonaires et les cellules musculaires lisses bronchiques *in vitro* sur cultures primaires (Ricci et al., 2004 ; Antonelli et al., 2005 ; Freund-Michel et al., 2006) [Publication n°3], et également *in vivo* par immunohistochimie sur des coupes bronchiques humaines (Ricci et al., 2004). La stimulation du récepteur TrkA par le NGF entraîne la survie cellulaire, une stimulation de la prolifération, la différenciation cellulaire, une inhibition de l'apoptose, et une augmentation de la libération des médiateurs à partir des différentes cellules portant à leur surface ce récepteur (Levi-Montalcini et al., 1995 ; Aloe et al., 1997 ; Kaplan et Miller, 1997 ; Freund-Michel et al., 2006) [Publication n°3].

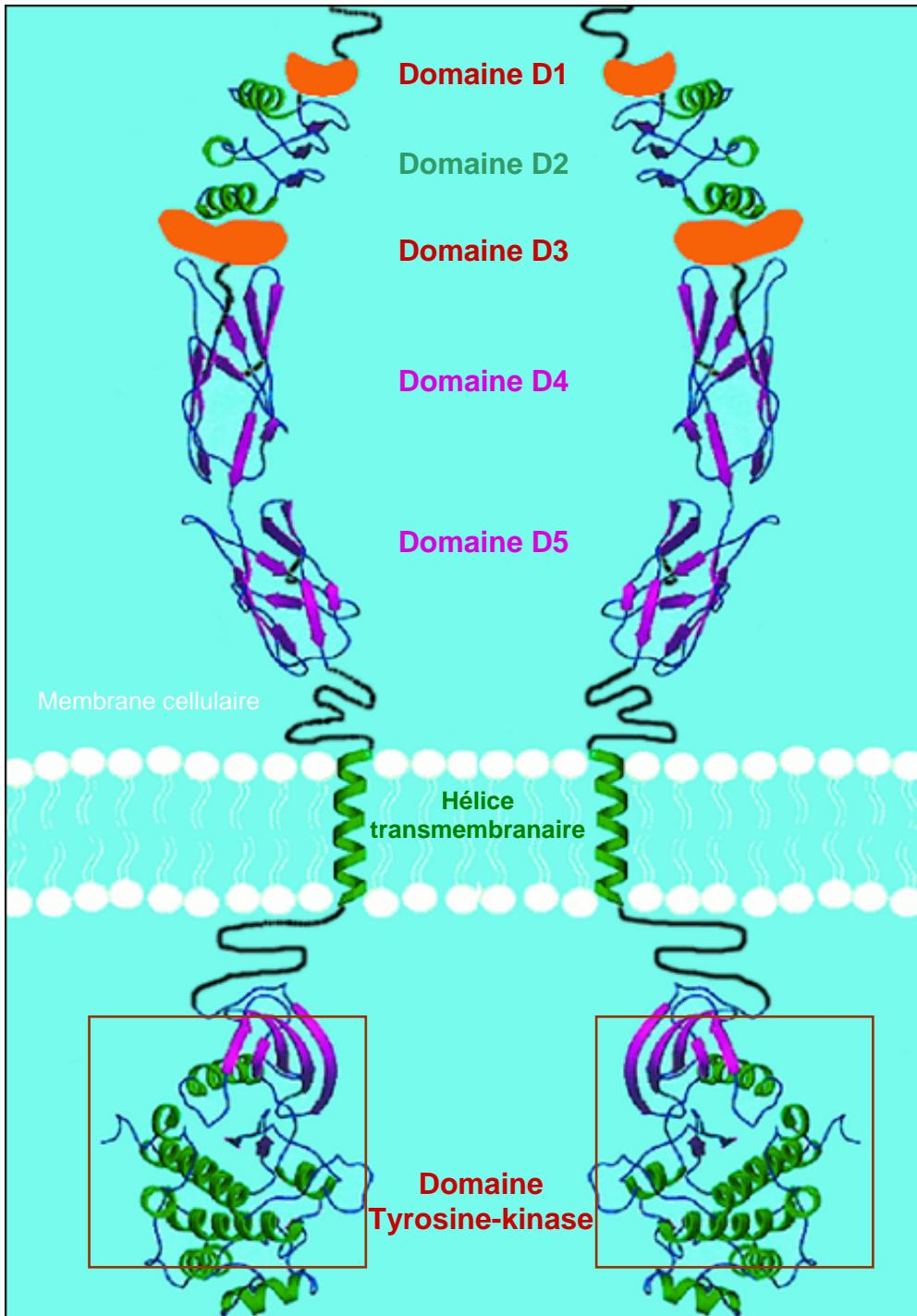


Figure 6. Structure du récepteur TrkA

Le NGF induit la dimérisation du récepteur TrkA représentée ci-dessus et conduit à son activation. L'analyse de séquence du domaine extracellulaire du récepteur TrkA a permis de mettre en évidence deux domaines D1 et D3 riches en cystéine entourant le domaine D2 contenant des séquences répétitives riches en leucine (« *Leucine-rich repeat* » ou LRR). On trouve ensuite deux domaines D4 et D5 de structure Ig-like. Après une courte hélice transmembranaire, le récepteur TrkA comporte un domaine intracytoplasmique de 304 acides aminés présentant un domaine à activité Tyrosine kinase intrinsèque.

D'après McDonald et Chao, 1995

2.1.1. Gène codant pour le récepteur TrkA

Un gène transformé ou proto-oncogène a été identifié en 1986 par Martin-Zanca et collaborateurs dans un carcinome humain du côlon (*Martin-Zanca et al., 1986*). Ce proto-oncogène est constitué de la séquence d'un gène codant pour un récepteur à tyrosine-kinase, alors encore non identifié, fusionnée à la séquence d'un gène codant pour une tropomyosine non musculaire. Ce proto-oncogène a été également caractérisé dans des carcinomes de la thyroïde (*Greco et al., 1997*), puis plus tard dans d'autres cancers comme dans des mélanomes, des cancers gastriques ou des cancers du sein. Le gène a été appelé *NTRK1* ou *trkA* pour « *tropomyosin-related kinase A* ». La protéine TrkA codée par ce gène a été identifiée plus tard comme le récepteur à haute affinité pour le NGF (*Kaplan et al., 1991 ; Klein et al., 1991 ; Meakin et Shooter, 1992*).

Le gène du récepteur TrkA comporte 23kb et est situé sur le chromosome 1, en région q21-q22 (*Weier et al., 1995*). Il est constitué de 17 exons de taille comprise entre 18 et 394pb, séparés par 16 introns de taille comprise entre 170pb et 3,3kb (*Indo et al., 1997*). Les 9 premiers exons codent pour la partie extracellulaire du récepteur TrkA (*Metsis, 2001*). Le promoteur du gène du récepteur TrkA a été étudié chez l'homme (*Chang et al., 1998*) et chez la souris (*Sacristan et al., 1999*). Une région commune entre les deux espèces a été identifiée dans la partie 5' en amont du site d'initiation de la transcription. Elle compte notamment une séquence riche en éléments GC en position -150 à -43 (*Sacristan et al., 1999*). Aucune boîte TATA ou CAAT n'a été identifiée chez l'homme ou chez la souris, mais de nombreux sites riches en GC ont été identifiés en particulier en positions -68 à -56, avec la présence de sites consensus pour les facteurs de transcription sp1, Egr-1 et AP-2 (*Chang et al., 1998 ; Sacristan et al., 1999*).

2.1.2. Structure du récepteur

Le récepteur TrkA appartient à la superfamille des récepteurs à tyrosine-kinase. Il s'agit d'une glycoprotéine constituée de 790 acides aminés pour un poids moléculaire de 140kDa (Figure 6) (*Meakin et Shooter, 1992*). Son domaine extracellulaire est relié au domaine intracellulaire de 304 acides aminés par une seule hélice transmembranaire. La partie intracellulaire contient un

domaine tyrosine kinase intrinsèque dont la séquence conservée entre les espèces présente plus de 75% d'homologie avec celle des autres récepteurs à tyrosine kinase (*Wiesmann et de Vos, 2001*).

La séquence et la structure du domaine extracellulaire du récepteur TrkA a été plus particulièrement étudiée. Cinq domaines particuliers appelés D1 à D5 ont été identifiés (*Wiesmann et de Vos, 2001*). Les domaines D1 et D3 contiennent des répétitions de domaines riches en cystéine, le domaine D2 contient une répétition de trois domaines riches en leucine, et les domaines D4 et D5 sont des domaines de structure Ig-like (Figure 6). Le domaine D5 est plus particulièrement impliqué dans la liaison du NGF au récepteur TrkA (Voir paragraphe 2.1.4.2 et Figure 7). Il est constitué de 2 feuillets β compacts arrangés en sandwich de manière anti-parallèle. Le premier feuillet β est constitué de 5 brins, appelés A, A', B, D et E, et le deuxième feuillet est constitué de 4 brins, appelés C, C', F et G. Les boucles AA', A'B, EF, CC' et C'D sont situées à l'extrémité C-terminale du domaine, alors que les boucles BC, DE et FG sont situées à l'autre extrémité. Ce domaine diffère légèrement de la structure habituelle des domaines Ig-like en deux points. Il possède deux résidus cystéine situés à la surface de la structure permettant la formation d'un pont disulfure entre les brins B et E. Ces résidus cystéine sont au contraire enfermés entre les deux feuillets dans la structure habituelle des domaines Ig-like. La conformation du brin A est également différente : alors qu'il appartient habituellement au 2^{ème} feuillet β , ce brin est relié au 1^{er} feuillet β dans la structure du récepteur TrkA. Le rôle de ces différences n'est pas encore élucidé, mais ces éléments sont tous impliqués dans la reconnaissance du NGF par le récepteur TrkA (*Urfer et al., 1998*). Le domaine D4 participe à l'expression et à la bonne conformation du récepteur TrkA, et en particulier la bonne conformation du domaine D5 (*Urfer et al., 1995 ; Holden et al., 1997 ; Ultsch et al., 1999*). Le rôle du domaine D2 riche en leucines reste lui pour l'instant controversé. Il participerait à la liaison du ligand au récepteur, mais seulement dans le cas d'une liaison de la NT-3, alors qu'il ne participerait pas à la liaison du NGF au récepteur TrkA (*MacDonald et Meakin, 1996*).

Enfin, la partie extracellulaire du récepteur est très fortement glycosylée (*Chao et Hempstead, 1995*). Ces glycosylations semblent essentielles à la signalisation, car des récepteurs non glycosylés peuvent former des homodimères, mais ne permettent pas d'induire une réponse cellulaire comme par exemple la différenciation des cellules neuronales (*Friedman et Greene, 1999*).

2.1.3. Les différentes isoformes du récepteur TrkA

Deux isoformes du récepteur TrkA ont été initialement identifiées et appelées formes TrkA I, de 790 acides aminés, et TrkA II, de 796 acides aminés (*Barker et al., 1993*). Ces isoformes résultent de l'épissage alternatif d'un micro-exon de 18 nucléotides, et conduit à l'expression ou non d'une séquence de 6 acides aminés (Val-Ser-Phe-Ser-Pro-Val ou VSFSPV) dans le domaine extracellulaire du récepteur, à proximité de la membrane plasmique (*Barker et al., 1993*). L'analyse de ces isoformes ne révèle pas de différence de liaison au NGF ou d'activité biologique, mais une expression différentielle a pu être mise en évidence : la forme TrkA II est exprimée principalement dans le système nerveux (*Clary et Reichardt, 1994*), alors que la forme TrkA I a une expression plus ubiquitaire, et plus particulièrement dans les cellules hématopoïétiques et les cellules immunitaires (*Barker et al., 1993*). De plus, la présence de la séquence des 6 acides aminés participerait à la sélectivité du récepteur TrkA pour la NT-3, puisque la NT-3 ne se lie pas à la forme TrkA I (*Clary et Reichardt, 1994*).

D'autres isoformes résultant d'un épissage alternatif ont été identifiées plus récemment. Deux variants appelés TrkA L1 et TrkA L0 présentent des modifications dans la séquence du domaine D2 extracellulaire : il manque un des trois domaines riches en leucine pour l'isoforme L1 et les trois pour l'isoforme L0 (*Dubus et al., 2000*). Ces isoformes sont exprimées dans le thymus, les testicules, le poumon et le rein chez le rat, mais pas dans le système nerveux, et sont toujours exprimées en même temps que l'isoforme TrkA I (*Dubus et al., 2000*). Les mêmes isoformes ont été mises en évidence pour le récepteur TrkB, qui ne peuvent alors plus lier le BDNF (*Ninkina et al., 1997*). Mais pour le récepteur TrkA, les caractéristiques de liaison du NGF à ces isoformes ne sont pas encore connues. Un autre variant résultant d'un épissage alternatif a été mis récemment en évidence dans les neuroblastomes au stade précoce, et appelé TrkA III (*Tacconelli et al., 2005*). La liaison du NGF à cette isoforme et son activation conduirait à bloquer les effets anti-oncogéniques de l'isoforme TrkA II, également exprimée dans ces cancers. L'utilisation de cette isoforme TrkA III comme marqueur de la phase précoce des neuroblastomes est actuellement à l'étude (*Tacconelli et al., 2005*).

Enfin, une forme soluble du récepteur TrkA a été mise en évidence dans les liquides biologiques et les surnageants de culture cellulaire. Cette forme résulte d'un clivage du récepteur, générant deux fragments : le fragment soluble constitué de la partie extracellulaire du récepteur, et

un fragment restant lié à la membrane cellulaire constitué du domaine transmembranaire et du domaine intracytoplasmique (Cabrera *et al.*, 1996). Plusieurs tailles de fragments clivés ont été identifiées, avec un fragment majoritaire de 41 kDa, et des fragments mineurs de 40 et 38 kDa (Diaz-Rodriguez *et al.*, 1999). Le clivage du récepteur TrkA serait sous la dépendance de métalloprotéinases attachées à la membrane cellulaire non identifiées à l'heure actuelle et clivant le récepteur à proximité de la membrane. Il a été montré que le clivage de la partie extracellulaire empêche l'activation du récepteur de manière ligand-dépendante, et pourrait ainsi constituer un mécanisme de régulation négative de l'activation de récepteur, comme cela a été montré pour d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase comme le récepteur CSF-1R du CSF-1 (« *Colony-stimulating factor-1* ») (Downing *et al.*, 1989), ou le récepteur c-Kit du SCF (« *Stem cell factor* ») (Yee *et al.*, 1994). Ce clivage est activé par le NGF lui-même, suggérant une régulation de la génération du fragment soluble du récepteur TrkA en fonction de la présence de NGF (Cabrera *et al.*, 1996). D'autre part, le clivage du récepteur TrkA conduit à l'activation de son domaine tyrosine-kinase intrinsèque et entraîne l'activation d'une signalisation intracellulaire NGF-indépendante (Cabrera *et al.*, 1996 ; Diaz-Rodriguez *et al.*, 1999).

2.1.4. Caractéristiques de liaison du NGF au récepteur TrkA

2.1.4.1. Affinité du NGF pour le récepteur TrkA

Les premières études de liaison du NGF réalisées sur des cultures de neurones sensitifs d'embryon de poulet ont mis en évidence la présence de deux sites de liaison pour le NGF présentant des affinités et des vitesses de dissociation différentes : un site de haute affinité avec un K_D (constante de dissociation) de l'ordre du picomolaire et une vitesse de dissociation lente ($T_{1/2} = 10$ minutes), et un site de plus faible affinité avec un K_D de l'ordre du nanomolaire et une vitesse de dissociation rapide ($T_{1/2} = 3$ secondes) (Sutter *et al.*, 1979). Des études de liaison réalisées au début des années 90 sur des neurones sensitifs et sympathiques ont permis d'identifier le site de très haute affinité comme le récepteur TrkA, et le deuxième site comme le récepteur p75^{NTR} (Meakin *et Shooter*, 1992). Les affinités du NGF pour le récepteur TrkA varient en fonction des cellules étudiées, de 10pM dans les neurones sensitifs à 350pM dans les cellules PC12 (Neet *et Campenot*,

2001). Des études ont néanmoins montré que le récepteur p75^{NTR} pouvait être impliqué dans la formation du site de liaison de haute affinité pour le NGF, remettant en cause la définition du TrkA comme récepteur à haute affinité pour le NGF et du p75^{NTR} comme récepteur de faible affinité pour le NGF (ceci sera développé dans le paragraphe 2.2.6.1).

2.1.4.2. Interactions entre le NGF et le récepteur TrkA

La liaison du NGF au récepteur TrkA se fait plus particulièrement par l'intermédiaire du domaine D5 situé dans la partie extracellulaire du récepteur (Wiesmann et de Vos, 2001). Deux régions majeures d'interaction ont été mises en évidence grâce à la cristallisation du NGF lié au domaine D5 (Figure 7) (Wiesmann et al., 1999).

Une première région appelée « *Specificity patch* » ou domaine de spécificité met en jeu les 10 derniers résidus de la partie N-terminale du NGF. Ces résidus adoptent une structure en hélice d'un tour et demi autour du feuillet AA'BED du récepteur TrkA, dont la conformation n'est elle pas modifiée (Figure 7). Le résidu Ile6 est un déterminant de la sélectivité du récepteur TrkA pour le NGF particulièrement important. Il s'insère dans une poche hydrophobe à la surface du feuillet ABED du récepteur TrkA. Le fond de cette poche est formé par le pont disulfure présent à la surface du récepteur TrkA, et ses côtés par les résidus hydrophobes Val294, Met296, Pro302 et Leu333 (Ultsch et al., 1999 ; Wiesmann et al., 1999). Les résidus Pro5 et Phe7 du NGF participent également à la formation de cette poche hydrophobe, et les résidus His4 et glu11 forment des liaisons hydrogènes avec respectivement les résidus Ser304 et Arg347 du TrkA. La mutation d'un de ces résidus en alanine entraîne une diminution de l'affinité du récepteur TrkA pour le NGF (Wiesmann et al., 1999). Alors que les cystéines permettant le pont disulfure sont conservées entre les différents récepteurs Trk, la structure de la poche ne l'est pas : une poche a été mise en évidence dans le récepteur TrkB mais présente un caractère hydrophile, et aucune poche n'a été mise en évidence dans le récepteur TrkC (Ultsch et al., 1999). Il existe d'ailleurs peu d'autres homologies de séquence entre les différentes neurotrophines et leur récepteur pour cette zone d'interaction (2 résidus conservés sur 10 entre les neurotrophines, et 4 sur 16 entre les Trk), ce qui explique que cette région soit impliquée dans la spécificité de liaison des différentes neurotrophines aux différents récepteurs Trk.

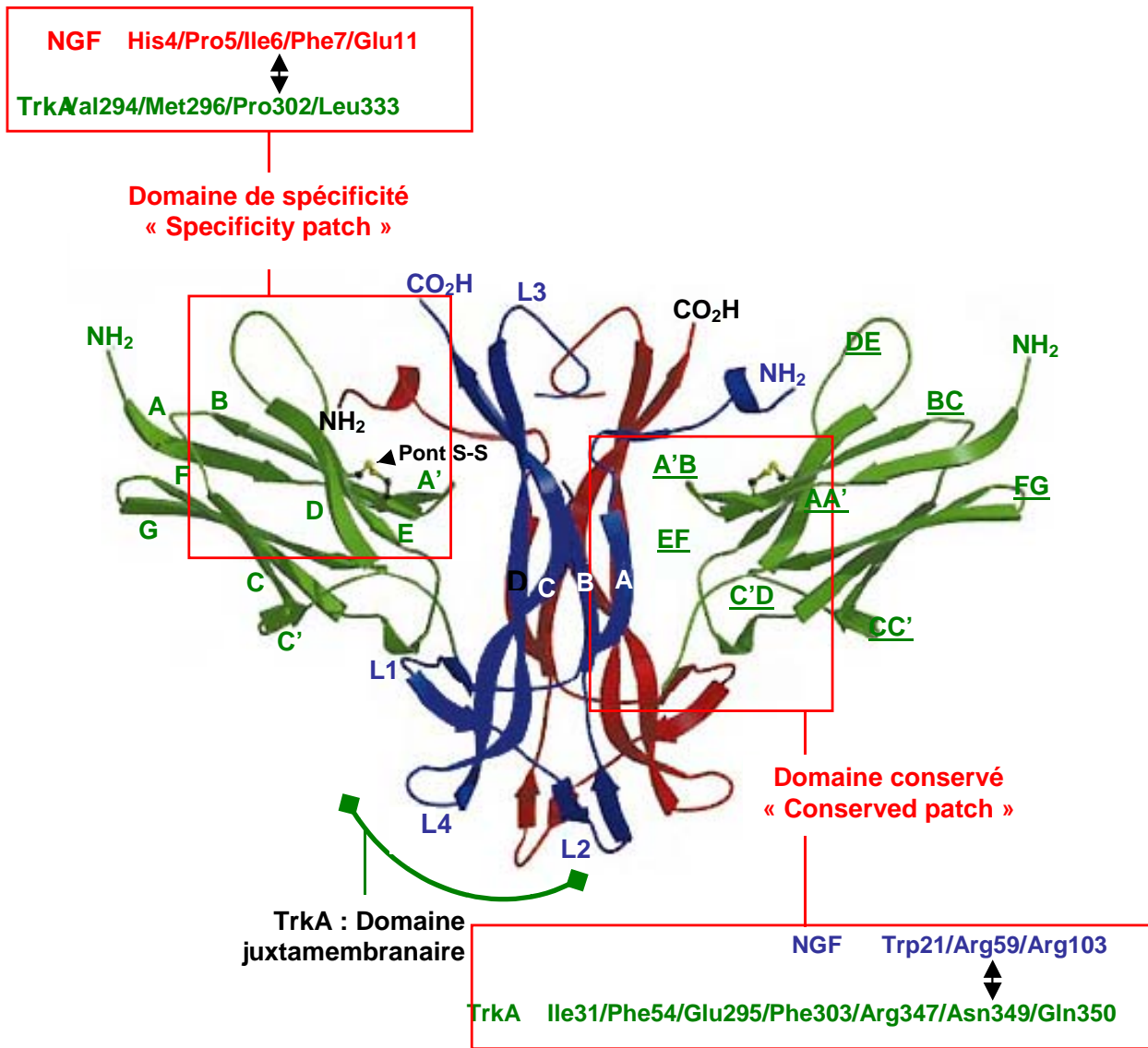


Figure 7. Structure du domaine TrkA D5 cristallisé avec le NGF

Les monomères de NGF sont représentés respectivement en bleu et rouge au centre de la figure : les 4 brins A, B, C et D formant un monomère de NGF sont numérotés en blanc et les 4 boucles entre ces brins L1 à L4 sont numérotés en bleu. Les monomères de NGF sont entourés par les domaines D5 de deux monomères de TrkA représentés en vert. Les brins A, A', B, C, C', D, E, F et G sont numérotés en vert sur la partie gauche du schéma. Les boucles AA', A'B, BC, CC', C'D, DE, EF et FG entre les différents brins sont soulignés et numérotés en vert sur la partie droite du schéma.

L'interaction entre le NGF et ce domaine met en jeu deux zones :

- La première zone est constituée de la partie N-terminale du NGF et du feuillet ABED du domaine D5, comprenant notamment le pont disulfure du récepteur. Les séquences en acides aminés du ligand et du récepteur impliquées dans cette zone ne sont pas conservées entre les différentes neurotrophines et les différents récepteurs Trk. Elles participent ainsi à la sélectivité des récepteurs Trk pour leur ligand, ce qui a donné à ce domaine le nom de domaine de spécificité (« *Specificity patch* »).
- La deuxième zone est constituée d'interactions hydrophobes entre la partie centrale du NGF et les boucles A'B, C'D et EF du récepteur TrkA. Les séquences de ces domaines sont conservées entre les différentes neurotrophines et les différents récepteurs Trk, ce qui a donné à ce domaine le nom de domaine conservé (« *Conserved patch* »).
- Une zone d'interaction supplémentaire a été proposée entre le domaine juxtamembranaire du récepteur TrkA et les boucles L2 et L4 du NGF.

D'après Wiesmann et al., 1999

La deuxième région appelée « *Conserved patch* » ou domaine conservé met en jeu la partie C-terminale du domaine D5 du récepteur TrkA avec la partie centrale du NGF comprenant les boucles A'B, C'D et EF du NGF (Figure 7). Cette région est large et parallèle à l'axe de symétrie du dimère NGF, et s'organise autour du résidu Arg103 du NGF (*McInnes et Sykes, 1997*). L'interaction entre le NGF et le récepteur TrkA dans cette zone met en jeu notamment des liaisons hydrophobes, grâce à la présence de résidus aromatiques ou à chaîne aliphatique (*Wiesmann et al., 1999*). Les résidus Ile31 et Phe54 semblent essentiels à la liaison avec le NGF, puisque leur mutation en alanine entraîne une perte d'affinité pour le NGF de respectivement 4 et 40 fois (*Wiesmann et de Vos, 2001*). Quatorze des 23 résidus impliqués dans ces liaisons sont conservés entre le NGF, le BDNF et la NT-3, et 8 des 15 résidus impliqués sont également conservés entre les différents récepteurs Trk. Cette interaction se retrouve ainsi dans la liaison de toutes les neurotrophines à leur récepteur Trk, d'où le nom de « zone d'interaction conservée » (*Wiesmann et al., 1999*).

Des interactions entre le brin A du NGF et la boucle EF du récepteur TrkA ont également été identifiées plus récemment, mettant en jeu les résidus Trp21, Arg59 et Arg103 du NGF avec les résidus Glu295, Phe303, Arg347, Asn349 et Gln350 du récepteur TrkA (*Settanni et al., 2003*). Ces interactions favorisent la stabilisation de la liaison du NGF au domaine D5 du récepteur TrkA, et une mutation de l'un de ces résidus entraîne une diminution d'affinité conséquente pour le NGF (*Settanni et al., 2003*).

Enfin, une zone d'interaction supplémentaire a été proposée entre le domaine juxtamembranaire du récepteur TrkA et les boucles L2 et L4 du NGF. En effet, la mutation en alanine de certains des résidus de cette région du récepteur conduit à une diminution de l'affinité pour le NGF (*Urfer et al., 1998 ; O'Connell et al., 2000*). Néanmoins, la cristallisation du NGF a été faite avec le domaine D5 du récepteur TrkA qui ne contient pas ce domaine de liaison, ces interactions n'ont ainsi pas encore été confirmées (*Wiesmann et al., 1999*). Cette zone contient très peu d'homologie de séquence entre les différents récepteurs Trk, et pourrait ainsi jouer un rôle dans la sélectivité du récepteur TrkA vis à vis des différentes neurotrophines (*Wiesmann et de Vos, 2001*).

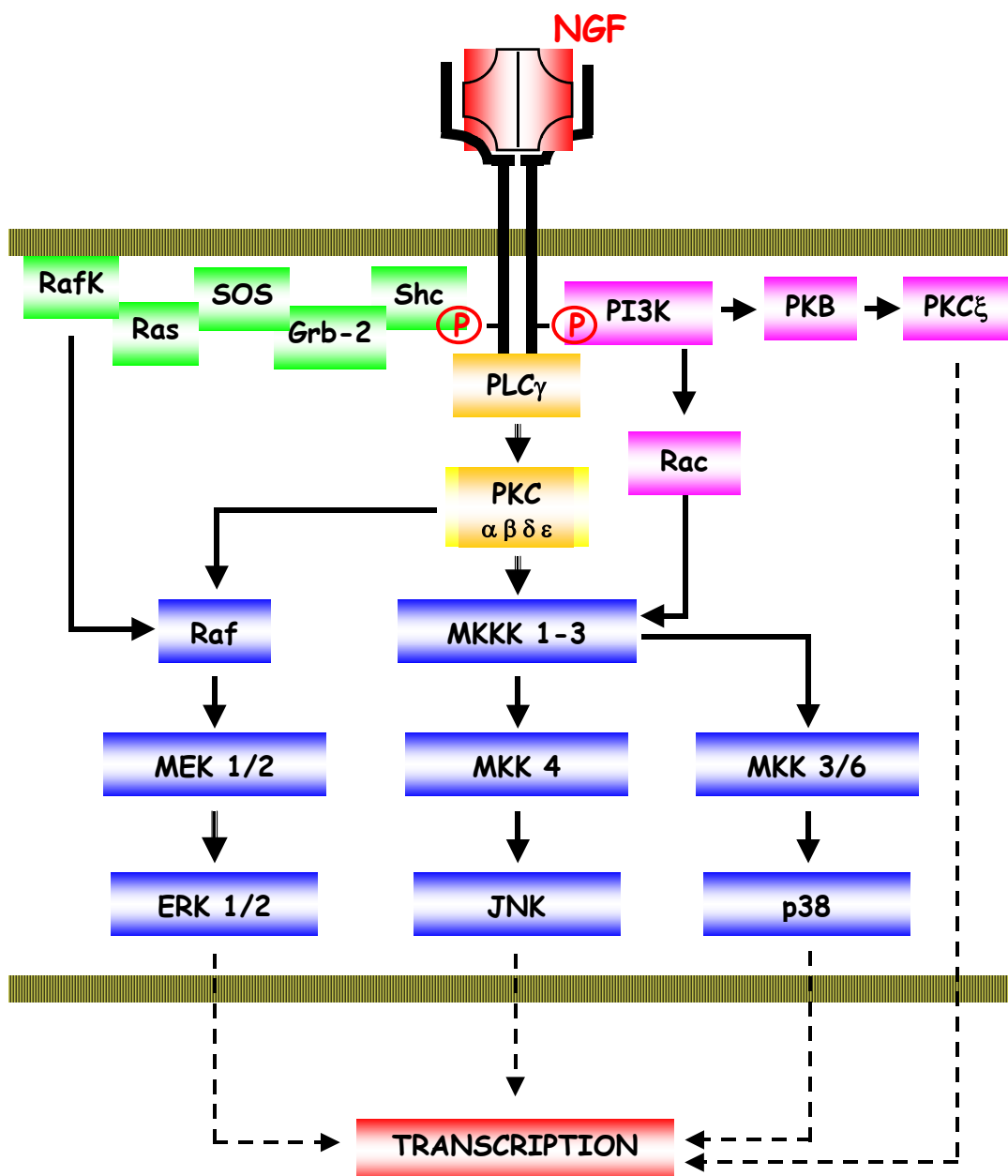


Figure 8. Voies de signalisation du récepteur TrkA

En liant le NGF, le récepteur TrkA va se dimériser, permettant ainsi son autophosphorylation et une activation de différentes voies de signalisation. L'activation de la phospholipase C γ (PLC γ), des différentes protéines kinases C (PKC α, β, δ et ϵ), ainsi que de la petite protéine G Ras entraînent l'activation des différentes MAP-kinases ERK (extracellular-regulated kinase), p38 et JNK (JUN-N-terminal kinase). Une autre voie met en jeu la PI3-kinase entraînant l'activation de la protéine kinase B (PKB ou Akt), conduisant d'une part à l'activation d'une voie MAP-kinase indépendante, avec activation de la protéine kinase C ξ (PKC ξ), et d'autre part à l'activation de la voie des MAP-kinases par l'intermédiaire de la petite protéine G Rac. Shc : Src homology-2 containing protein ; Grb-2 : growth factor receptor-bound protein ; SOS : son of sevenless ; RafK : Raf kinase ; MKKK : MAP-kinase kinase kinase ; MKK : MAP-kinase kinase ; MEK : MAP ERK kinase.

2.1.5. Voies de signalisation du récepteur TrkA

Comme cela a été classiquement décrit pour l'ensemble des récepteurs à activité tyrosine-kinase intrinsèque, la liaison du NGF au récepteur TrkA induit d'abord une dimérisation des récepteurs, initiant l'activation de la kinase et la transphosphorylation de tyrosines au niveau du domaine intracellulaire du récepteur. Les voies de signalisation du récepteur TrkA ont été particulièrement étudiées dans les cellules neuronales, et plus particulièrement les cellules de phéochromocytome de rat PC12, dans lesquelles trois voies principales de signalisation sont activées par le récepteur TrkA : la voie Ras/Raf, la voie PLC (phospholipase C) - PKC (protéines kinases C), et la voie PI3K (phosphatidyl inositol-3 kinase) (Figure 8).

Ces voies de signalisation étaient par contre peu connues dans les cellules structurales ; nous avons apporté des informations dans ce domaine en décrivant les voies de signalisation activées par le récepteur TrkA dans les cellules musculaires lisses bronchiques humaines et induisant la prolifération de ces cellules (*Freund-Michel et al., 2006*) [Publication N°3].

2.1.5.1. Transphosphorylation du récepteur TrkA

L'activation du récepteur TrkA par le NGF entraîne sa dimérisation et sa transphosphorylation (*Kaplan et al., 1991 ; Jing et al., 1992*). Chaque domaine kinase d'un monomère induit la phosphorylation de l'autre monomère. Les phosphorylations ont lieu sur six résidus tyrosine : les résidus Tyr670, Tyr674 et Tyr675 sont situés à l'intérieur même du domaine kinase, et les résidus Tyr490, Tyr751 et Tyr785 en dehors (*Stephens et al., 1994*). Les résidus Tyr670, Tyr674 et Tyr675 à l'intérieur du domaine kinase sont phosphorylés en premier et augmentent l'activité catalytique de la tyrosine kinase (*Mitra, 1991*) qui phosphoryle ensuite les résidus Tyr490, Tyr751 et Tyr785 à l'extérieur du domaine kinase. La propagation du signal dans la cellule se fait par la reconnaissance des tyrosines phosphorylées par des molécules effectrices possédant un motif spécifique appelé domaine 2 d'homologie à Src (domaine SH2) (*Segal et Greenberg, 1996*). Ces domaines sont constitués d'une centaine d'acides aminés et sont présents dans une grande variété de protéines de signalisation (*Schlessinger, 1994*). Les principales protéines possédant un domaine SH2 interagissant avec le récepteur TrkA sont la phospholipase C γ (PLC γ), interagissant avec le résidu phosphorylé Tyr785 (*Vetter et al., 1991 ; Obermeier et al., 1993a ;*

Stephens et al., 1994), la PI3K, interagissant avec le résidu phosphorylé Tyr751 (*Ohmichi et al., 1992 ; Obermeier et al., 1993b*), et la protéine adaptatrice Shc (« *Src homology-2 containing protein* »), interagissant avec le résidu phosphorylé Tyr490 (*Obermeier et al., 1993b ; Stephens et al., 1994*).

2.1.5.2. Voie Ras/Raf

La liaison de la protéine adaptatrice Shc au résidu Tyr490 phosphorylé du récepteur TrkA conduit à sa phosphorylation lui permettant alors de s'associer à une autre protéine adaptatrice contenant un domaine SH2, la protéine Grb2 (« *Growth factor receptor bound protein-2* ») (*Rozakis-Adcock et al., 1992*). Grb2 possède un autre type de domaine, le domaine 3 d'homologie à Src (domaine SH3) (*Lowenstein et al., 1992*). Les deux domaines SH3 présents sur Grb2 permettent son interaction avec le facteur Sos (« *Son of sevenless* »), un facteur d'échange de GTP pour la petite protéine G Ras. Cette interaction conduit au recrutement de ces protéines à la membrane cellulaire et induit l'activation de Ras (*Segal et Greenberg, 1996*).

Ras est une petite protéine G associée à la membrane de la cellule grâce à une de ses extrémités lipidiques (*Casey, 1995*). Elle est inactive quand elle est liée à une molécule de GDP, et devient active après liaison à une molécule de GTP. La protéine Sos active Ras en induisant un échange entre le GDP et le GTP (*McCormick, 1995*). Ras active alors la kinase de Raf (RafK) qui phosphoryle Raf (*Fabian et al., 1993*). Raf phosphoryle ensuite une cascade de kinases, en particulier MEK, la kinase de la MAPK (« *Mitogen-activated protein kinase* ») ERK1/2 (« *Extracellular-regulated protein kinase* »), sur les sérines 217 et 221 (*Alessi et al., 1994*). MEK active ensuite ERK1/2 par phosphorylation d'un résidu thréonine et d'un résidu tyrosine (*Payne et al., 1991*). L'activation de ERK1/2 conduit à l'activation et la translocation dans le noyau de facteurs de transcription comme Elk-1 (*Treisman et al., 1992 ; Janknecht et al., 1993 ; Marais et al., 1993*). Une autre petite protéine G, Rap1, localisée dans des endosomes (*Wu et al., 2001*) peut complexer Raf et potentialiser son activation, entraînant une activation soutenue de la voie ERK1/2 (*York et al., 1998*).

Un autre facteur de transcription, le facteur CREB (« *cAMP response element binding protein* »), est activé par Ras, via la MAPK ERK. En effet, ERK1/2 induit l'activation de la kinase RSK (« *p90 ribosomal S6 kinase* ») qui phosphoryle CREB et l'active (*Bonni et al., 1999 ; Riccio et*

al., 1999 ; *Shimamura et al.*, 2000). Cette voie de signalisation est impliquée dans la survie cellulaire, notamment via l'activation de la transcription de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (*Bonni et al.*, 1995 ; *Liu et al.*, 1999 ; *Riccio et al.*, 1999).

2.1.5.3. Voie PLC/PKC

La PLC γ est recrutée au niveau du résidu Tyr785 phosphorylé du récepteur TrkA (*Obermeier et al.*, 1993a ; *Stephens et al.*, 1994), et devient active après phosphorylation par la kinase du récepteur TrkA (*Vetter et al.*, 1991 ; *Obermeier et al.*, 1993a). L'enzyme active clive alors le phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate pour former deux messagers secondaires, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP₃). L'IP₃ se lie à son récepteur exprimé sur le réticulum endoplasmique et induit une libération de calcium dans le cytoplasme de la cellule (*Berninger et al.*, 1993). Le DAG active les protéines kinases C (PKC) en synergie avec le calcium libéré dans le cytoplasme (*Berninger et al.*, 1993). Ces voies conduisent à l'activation des MAPK p38 et JNK (« *c-jun N-terminal kinase* ») par l'intermédiaire des MAPK kinases kinases MKKK-1 et -3, et de la MAPK ERK1/2 par l'intermédiaire de la phosphorylation de Raf (*Patapoutian et Reichardt*, 2000).

2.1.5.4. Voie PI3K

L'activation du récepteur TrkA par le NGF conduit à son interaction avec la PI3K, par l'intermédiaire du résidu Tyr751 phosphorylé (*Ohmichi et al.*, 1992). La PI3K est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique de 110kDa et d'une sous-unité régulatrice de 85kDa comportant un site SH2. La PI3K induit la formation de phosphatidyl inositol 3,4-bisphosphate qui permet le recrutement à la membrane de la kinase PDK1 (« *3-phosphoinositide-dependent kinase I* ») et l'activation de son substrat, la protéine Akt, encore appelée protéine kinase B (PKB) (*Dudek et al.*, 1997 ; *Andjelkovic et al.*, 1998 ; *Ashcroft et al.*, 1999). La PKB conduit à l'activation de la transcription de gènes de manière MAPK-indépendante, via la PKC ξ atypique (*Coleman et Wooten*, 1994 ; *Wooten et al.*, 1994), ou de manière MAPK-dépendante par l'intermédiaire de la petite protéine G Rac (*Kita et al.*, 1998 ; *Yasui et al.*, 2001).

L'activation de la PI3K est impliquée dans la survie cellulaire des neurones induite par le NGF (Yao et Cooper, 1995 ; Crowder et Freeman, 1998 ; Vaillant et al., 1999). En effet, elle peut inhiber l'activité pro-apoptotique de facteurs comme la protéine Bad, qui inhibe normalement l'activité anti-apoptotique de la protéine Bcl-2 (Datta et al., 1997) ou comme le facteur de transcription forkhead qui induit l'apoptose en induisant la transcription du ligand Fas (FasL) (Brunet et al., 1999). Les autres cibles de la PKB dans les neurones sont les protéines appartenant à la famille des inhibiteurs d'apoptose IAP (« *Inhibitor of apoptosis* »), comprenant XIAP (« *X-linked inhibitor of apoptosis* »), NAIP (« *Neuronal apoptosis-inhibitory protein* ») et HIAP (« *Human inhibitor of T-cell apoptosis* ») (LaCasse et al., 1998). Ces protéines sont activées par le NGF via la PKB dans les neurones sensitifs et sympathiques et participent à leur survie cellulaire (Wiese et al., 1999).

Une activation Ras-dépendante de la PI3K a été mise en évidence dans les neurones. Ras peut interagir directement avec la PI3K (Rodriguez-Viciano et al., 1994 ; Klesse et Parada, 1998 ; Mazzoni et al., 1999). Cette activation Ras-dépendante est due à la formation d'un complexe d'activation comprenant la PI3K, Ras et la protéine adaptatrice Gab-1 (« *Grb2-associated binder-1* »), suite au recrutement de Shc et Grb2 (Holgado-Madruga et al., 1997 ; Korhonen et al., 1999).

2.1.6. Transactivation du récepteur TrkA par les récepteurs couplés aux protéines G

Une activation des récepteurs Trk, en particulier du récepteur TrkA, a été mise en évidence en absence des neurotrophines après traitement des cellules PC12 par l'adénosine (Lee et Chao, 2001). La cinétique d'activation du récepteur TrkA par cette voie est plus lente que l'activation directe par le NGF : la phosphorylation du récepteur TrkA est observée au plus tôt 90 min après traitement par l'adénosine. L'inhibition de cet effet par les inhibiteurs de transcription et de traduction actinomycine D et cycloheximide suggèrent la nécessité de la synthèse d'une nouvelle protéine dans cet effet (Lee et Chao, 2001). Aucune liaison directe de l'adénosine sur le récepteur TrkA n'a été mise en évidence, et cette transactivation n'implique pas la néo-synthèse de NGF stimulée par l'adénosine. Cet effet est en fait dû à l'activation par l'adénosine de son récepteur A_{2A}

couplé à une protéine G_s , qui conduit à l'activation d'une kinase appartenant à la famille des tyrosine kinases Src. Cette kinase phosphoryle le récepteur TrkA et induit l'activation en particulier de la voie PI3K/PKB (*Lee et Chao, 2001*). Cet effet serait également dépendant du calcium, puisque le pré-traitement des cellules par des chélateurs de calcium bloque cette transactivation (*Lee et Chao, 2001*). Ce mécanisme de transactivation a été mis en évidence pour d'autres récepteurs à tyrosine-kinase, en particulier le récepteur de l'EGF (EGFR), mais les différents RCPG transactivant le récepteur EGFR, comme les récepteurs activés par la bradykinine, le carbachol ou l'angiotensine II, n'induisent pas l'activation du récepteur TrkA dans les cellules PC12 (*Lee et Chao, 2001 ; Lee et al., 2002a*). De plus, l'activation du récepteur EGFR conduit principalement à l'activation de la voie des MAPK dans des cellules neuronales et structurales (*Leserer et al., 2000*), et la voie PI3K/PKB semble spécifique de la transactivation du récepteur TrkA (*Lee et Chao, 2001*). Le pré-traitement des cellules par des inhibiteurs de la PI3K entraîne une inhibition de la phosphorylation de la protéine PKB, mais pas du récepteur TrkA, montrant que l'activation de la voie PI3K ne participe pas directement à la transactivation du récepteur TrkA, mais en est bien une conséquence (*Lee et Chao, 2001 ; Lee et al., 2002a*). Un autre agoniste de RCPG, le peptide PACAP (« *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide* ») est également capable d'induire l'activation du récepteur TrkA dans les cellules PC12, avec la même cinétique d'activation, et l'induction de la voie PI3K/PKB (*Lee et al., 2002b*). L'adénosine et le peptide PACAP ont des effets neuroprotecteurs, notamment en cas d'hypoxie ou d'ischémie, dont les mécanismes n'étaient pas connus jusqu'à présent. La découverte de ce phénomène de transactivation suggère que l'activation des récepteurs Trk, en particulier du récepteur TrkA en absence de neurotrophines par ces petits peptides pourrait participer à cet effet neuroprotecteur, via l'activation de la voie de signalisation PI3K/PKB (*Lee et al., 2002a*).

Un traitement des cellules PC12 par la forskoline, un activateur de l'adénylyl cyclase entraînant une augmentation intracellulaire d'AMP cyclique (AMPC), conduit également à une phosphorylation du récepteur TrkA et une activation de la voie PI3K (*Piiper et al., 2002*). Cette étude démontre que l'activation de l'adénylyl cyclase par les RCPG couplés à des protéines G de type G_s , comme le récepteur A_{2A} de l'adénosine et les récepteurs du peptide PACAP, participent à la transactivation du récepteur TrkA.

Enfin, une étude récente montre que la transactivation du récepteur TrkA intervient au niveau intracellulaire sur des récepteurs TrkA néo-formés, avant leur expression à la membrane

cellulaire (*Rajagopal et al., 2004*). De plus, cette étude démontre que les mécanismes de transactivation des récepteurs Trk sont un moyen d'induire des signaux intracellulaires participant à la survie neuronale de manière neurotrophine-indépendante.

2.1.7. Internalisation et transport rétrograde du récepteur TrkA

Le NGF qui active son récepteur TrkA exprimé sur les terminaisons nerveuses et le long des axones des neurones peut induire un signal au niveau du corps cellulaire du neurone, situé parfois jusqu'à un mètre en amont de l'initiation du signal. Il s'avère en fait que le NGF se lie à son récepteur TrkA, active les voies de signalisation nécessaires aux effets locaux, puis est internalisé avec le récepteur dans un endosome, qui migre le long de l'axone jusqu'au corps cellulaire, où il active d'autres voies de signalisation à proximité du noyau du neurone. Ce mécanisme est appelé transport rétrograde (« *Retrograde transport* ») (*Heerssen et Segal, 2002*).

2.1.7.1. Mécanismes d'internalisation du récepteur TrkA

Des études dans des cellules PC12 ont tout d'abord montré que le NGF lié à un site de haute affinité est internalisé dans les cellules (*Bernd et Greene, 1984 ; Hosang et Shooter, 1987 ; Eveleth et Bradshaw, 1988 ; Kasaian et Neet, 1988*). Puis il a été montré que le NGF est internalisé avec le récepteur TrkA (*Eveleth et Bradshaw, 1992 ; Loeb et Greene, 1993 ; Gargano et al., 1997 ; Zapf-Colby et Olefsky, 1998*). Trois mécanismes contribuant à cette internalisation ont été décrits jusqu'à présent : la voie de la clathrine, la voie des cavéoles et la macropinocytose (Figure 9) (*Zweifel et al., 2005*). La variété des mécanismes permettant l'internalisation du récepteur TrkA suggère que ces mécanismes pourraient dépendre du type de récepteur ciblé, du contexte cellulaire dans lequel le NGF active le récepteur TrkA, ou de l'amplitude du signal généré par l'activation du récepteur (*Zweifel et al., 2005*). La concentration en ligand pourrait également entrer en jeu : il a été montré pour le récepteur EGFR que l'EGF à faibles concentrations favorise son internalisation via la voie clathrine-dépendante, alors que l'EGF à des concentrations plus fortes induit préférentiellement l'internalisation via la voie cavéole-dépendante (*Aguilar et Wendland, 2005 ; Sigismund et al., 2005*).

Récepteurs du NGF et voies de signalisation

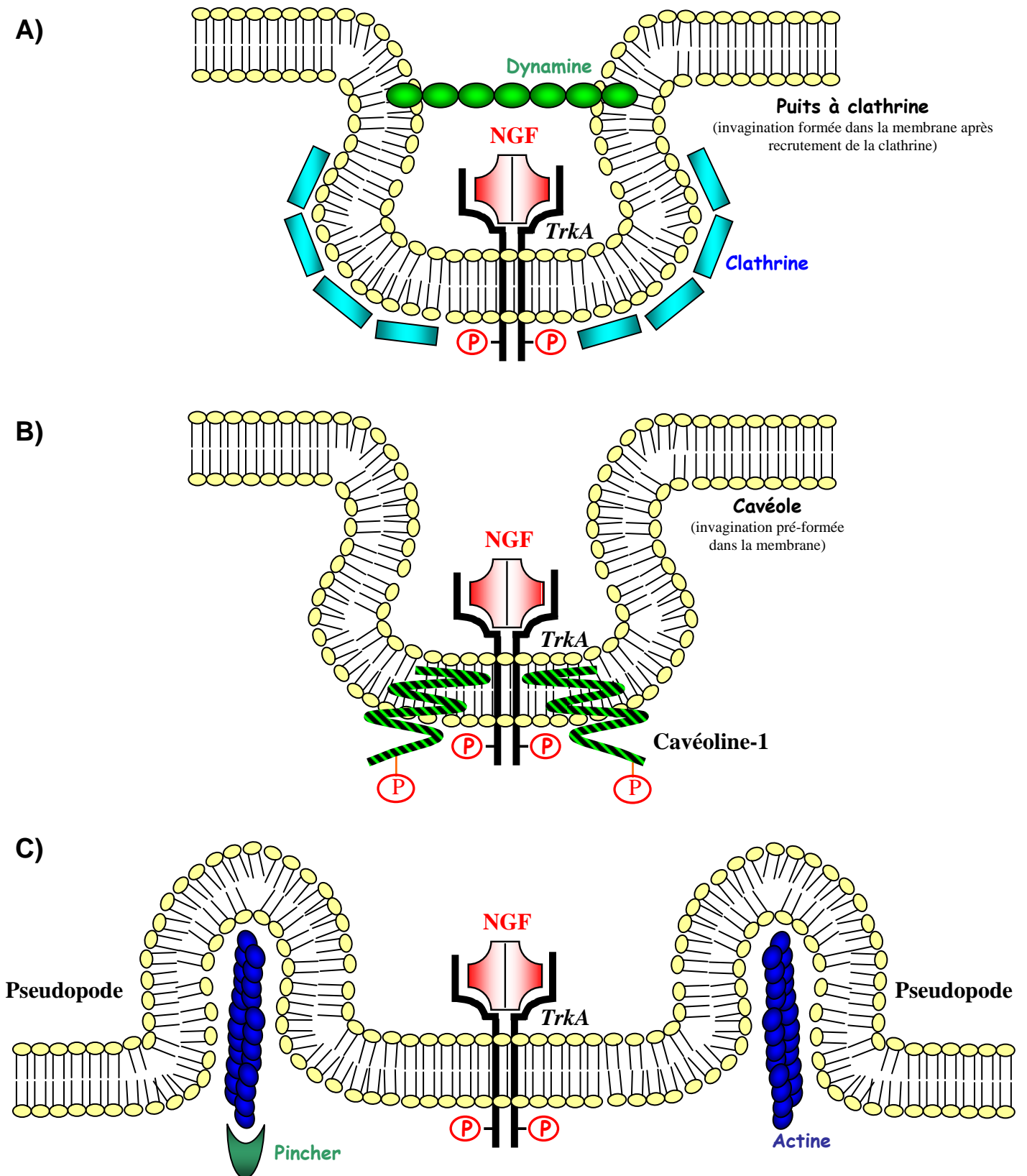


Figure 9. Mécanismes d'internalisation du récepteur TrkA

L'internalisation du récepteur TrkA peut avoir lieu au niveau de puits à clathrine à la surface de la cellule, avec formation des endosomes par séparation de la membrane cellulaire grâce à la dynamine (A). Le 2^{ème} mécanisme met en jeu une internalisation des récepteurs TrkA au niveau des cavéoles pré-formées via la phosphorylation de la cavéoline-1 (B). Le 3^{ème} mécanisme met en jeu la macropinocytose (C), mettant en jeu la formation de pseudopodes membranaires grâce à la polymérisation de l'actine, permettant d'englober les récepteurs et de les internaliser. Ce mécanisme est sous la dépendance d'une protéine chaperonne appelée pincher.

D'après Zweifel et al., 2005

2.1.7.1.1. Internalisation par la voie de la clathrine

La dimérisation et l'activation de récepteur TrkA conduit au recrutement de la clathrine sous la membrane cellulaire, au niveau de zones particulières préformées appelées puits à clathrine (Figure 9A). La membrane s'invagine à cet endroit, puis des vésicules intracellulaires se détachent de la membrane pour former des endosomes (Wiley et Burke, 2001). Le NGF induit le recrutement de la clathrine sous la membrane cellulaire dans les cellules PC12 et dans les neurones sensitifs de rat, en induisant la formation de complexes contenant le récepteur TrkA activé, la chaîne lourde de la clathrine et la protéine adaptatrice de la clathrine AP-2 (Beattie et al., 2000 ; Howe et al., 2001). Les complexes formés contiennent également des effecteurs activés de la voie des MAPK, en particulier MEK et ERK1/2 phosphorylés (Howe et al., 2001). De plus, l'internalisation du récepteur TrkA dépend également de la dynamine, une protéine GTPase qui permet la scission et la séparation des vésicules d'internalisation de la membrane cellulaire (Zhang et al., 2000 ; Ye et al., 2003).

2.1.7.1.2. Internalisation par la voie des cavéoles

Le récepteur TrkA est également exprimé dans des invaginations de membranes appelées cavéoles. Ces cavéoles sont des domaines riches en cholestérol et présents de manière constitutive sur la membrane des cellules (Stan, 2005). Des protéines spécifiques de ces invaginations, appelées cavéolines, sont insérées dans la membrane au niveau des cavéoles. Leur association au récepteur à tyrosine-kinase activé induit leur phosphorylation, et recrute des protéines comme Csk (« C-terminal Src kinase ») ou Grb7 (« Growth factor receptor binding protein 7 ») pour le récepteur de l'EGF, ou IRS-1 (« Insulin receptor substrate-1 ») pour le récepteur de l'insuline, participant à l'internalisation de ces récepteurs de manière clathrine-indépendante (Pike, 2005). Les mécanismes exacts d'internalisation du récepteur TrkA par les cavéoles ne sont pas connus, mais devraient ressembler à ceux déjà décrits pour les autres récepteurs à tyrosine kinase (Figure 9B). Les cavéolines exprimées dans la membrane des cavéoles interagissent directement avec le récepteur TrkA phosphorylé, en particulier la cavéoline-1 (Bilderback et al., 1999 ; Huang et al., 1999) et celle-ci semble jouer un rôle dans la régulation de cette phosphorylation (Huang et al., 1999), ainsi

que dans l'activation des voies de signalisation du récepteur TrkA, en particulier dans l'activation des MAPK (*Peiro et al., 2000*).

2.1.7.1.3. Internalisation par macropinocytose

Une étude réalisée sur les neurones sympathiques innervant l'iris a montré que l'internalisation du NGF pouvait être en partie bloquée par un agent dépolymérisant l'actine (*Reynolds et al., 1999*). Une autre étude réalisée plus récemment dans les cellules PC12 a suggéré l'implication d'un mécanisme de macropinocytose dans l'internalisation du récepteur TrkA (*Jullien et al., 2003*). Une protéine nommée Pincher et découverte récemment par Shao et collaborateurs est impliquée dans ce phénomène de macropinocytose (Figure 9C) (*Shao et al., 2002*). En effet, la surexpression de cette protéine entraîne une augmentation de l'internalisation du récepteur TrkA au niveau de sites de macropinocytose, de manière totalement clathrine-indépendante (*Shao et al., 2002*).

2.1.7.1.4. Rôle de la kinase du récepteur TrkA dans son internalisation

Le rôle de l'activité kinase du récepteur TrkA dans son internalisation reste controversé pour l'instant. L'inhibition de cette activité par des inhibiteurs pharmacologiques ou par expression de mutants ne possédant pas de domaine tyrosine-kinase intrinsèque dans les cellules neuronales peut conduire dans certaines études à une inhibition de l'internalisation du récepteur TrkA (*Reynolds et al., 1998 ; Ye et al., 2003 ; Heerssen et al., 2004*), mais dans d'autres études réalisées dans les mêmes cellules, ne bloque pas cette internalisation (*Kahle et al., 1994 ; Jullien et al., 2003*). Une étude récente suggère que l'activité kinase du récepteur TrkA pourrait être impliquée dans le ciblage vers les endosomes tardifs puis les lysosomes, puisqu'un mutant du récepteur TrkA ne possédant pas de domaine tyrosine-kinase intrinsèque est plutôt dirigé vers des endosomes de recyclage après internalisation (*Saxena et al., 2005*). Des résultats comparables ont été observés pour un récepteur TrkB tronqué de son domaine kinase intrinsèque qui suit alors préférentiellement la voie des endosomes de recyclage (*Alderson et al., 2000*). Ainsi, l'activité kinase du récepteur TrkA ne serait pas impliqué dans les mécanismes mêmes d'internalisation du récepteur, mais

contribuerait à diriger le récepteur vers la voie des endosomes précoces puis tardifs, favorisant ainsi le transport rétrograde (*Saxena et al., 2005*).

2.1.7.2. Mécanismes du transport rétrograde

Il a été montré qu'une faible quantité seulement du NGF internalisé dans les terminaisons nerveuses des neurones sympathiques suit la voie du transport rétrograde, alors que la majorité va être plutôt dégradée, généralement dans les lysosomes, ou recyclée grâce à des endosomes de recyclage (voir paragraphe 2.1.8.) (*Ure et Campenot, 1997 ; Tsui-Pierchala et Ginty, 1999*). Il a été montré que le NGF suivant le transport rétrograde est exprimé dans des vésicules contenant des marqueurs caractéristiques des endosomes précoces, comme la petite protéine G Rab5 et son effecteur EEA1 (« *Early endosome antigen 1* ») (*Delcroix et al., 2003*). Ces endosomes précoces jouent ainsi le rôle de navette pour transporter le NGF lié au récepteur TrkA le long de l'axone. Les mécanismes moléculaires contrôlant ce transport pourraient mettre en jeu la PI3K : des constituants de cette voie sont associés à l'endosome précoce en cours de migration, et l'inhibition de la PI3K inhibe l'internalisation du NGF et le transport rétrograde (*Kuruvilla et al., 2000 ; York et al., 2000 ; Delcroix et al., 2003*). Néanmoins, les cibles exactes de la voie PI3K restent encore inconnues pour l'instant. Des sites de fixation aux phosphoinositides ont été mis en évidence sur de nombreuses protéines impliquées dans l'endocytose (*Cullen et al., 2001*). C'est le cas de la protéine EEA1, colocalisée avec le récepteur TrkA dans les endosomes précoces, qui lie le phosphatidyl inositol 3-phosphate par un domaine particulier de son extrémité C-terminale (*Simonsen et al., 1998*). Il sera intéressant de comprendre si le lien entre ces protéines et la voie PI3K est directement relié aux mécanismes impliqués dans l'internalisation et le transport rétrograde du récepteur TrkA.

Au cours de sa migration le long de l'axone, l'endosome doit également éviter la dégradation protéolytique, notamment par fusion avec des lysosomes. Très peu de dégradation a pu être mise en évidence au cours du transport rétrograde du récepteur TrkA dans les neurones sympathiques (*Ure et Campenot, 1997*). Des plus, des études de liaison spécifique réalisées à l'aide de NGF marqué à l'iode¹²⁵ montrent que le NGF présent dans les endosomes précoces est très peu dirigé vers les lysosomes et reste étroitement lié au récepteur TrkA, même à des pH relativement bas (*Zapf-Colby et Olefsky, 1998*). Ceci suggère que les endosomes impliqués dans le transport rétrograde sont des vésicules spécialisées qui ont évolué de manière à propager un signal sur de

longues distances dans les axones, en évitant la dégradation protéolytique. Il a été montré récemment que la voie mettant en jeu la protéine Pincher participe à cet évitement en empêchant le ciblage des endosomes vers les lysosomes, mais le mécanisme exact mis en jeu reste à élucider (Valdez *et al.*, 2005).

Enfin, le mécanisme propre du transport de ces vésicules le long de l'axone a été étudié. De nombreuses études montrent l'implication d'un système basé sur les microtubules, mettant notamment en jeu la protéine dynéine. En effet, le récepteur TrkA est colocalisé avec la dynéine, et une interaction directe a été mise en évidence entre la région juxtamembranaire du récepteur TrkA et la chaîne légère de la dynéine (Yano *et al.*, 2001 ; Bhattacharyya *et al.*, 2002). De plus, l'inhibition mécanique ou chimique du réseau des microtubules (Thoenen et Stockel, 1975 ; Claude *et al.*, 1982a ; Claude *et al.*, 1982b), ou l'inhibition du complexe dynéine-dynactine (Heerssen *et al.*, 2004) diminue le transport rétrograde des neurotrophines *in vitro* et *in vivo*. Enfin, le transport dépendant de la dynéine est essentiel à la survie des neurones sensitifs issus du système nerveux périphérique *in vitro* (Hafezparast *et al.*, 2003) et *in vivo* (Heerssen *et al.*, 2004). L'ensemble de ces résultats suggère ainsi que les interactions entre le récepteur TrkA et les composants de la voie de la dynéine et des microtubules sont impliqués dans le transport rétrograde des endosomes le long de l'axone des nerfs.

2.1.7.3. Notion d'endosome de signalisation (« Signalling endosome »)

Comment les messages de signalisation générés dans les endosomes sont-ils délivrés au niveau du corps cellulaire ? En fait, les endosomes servent de plate-forme à partir de laquelle les signaux sont initiés (Figure 10) (Grimes *et al.*, 1996 ; Wang et Mukhtar, 2002 ; Delcroix *et al.*, 2003). En effet, l'endosome précoce permet à de très nombreuses protéines non exprimées à la membrane cellulaire d'accéder au récepteur TrkA. Une activation maintenue dans le temps de la voie des MAPK semble par exemple possible uniquement à partir d'une localisation endosomale du récepteur TrkA (York *et al.*, 1998). En effet, le NGF induit l'activation de la petite protéine G Rap1 exprimée sur les membranes endosomales, qui elle-même induit l'activation de Raf, induisant l'activation de la voie de ERK1/2 (York *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2001). Ainsi, les composants de la voie des MAPK Rap 1, Raf, ERK1 et ERK2 sont associés à l'endosome précoce et migrent avec lui au cours du transport rétrograde (Delcroix *et al.*, 2003).

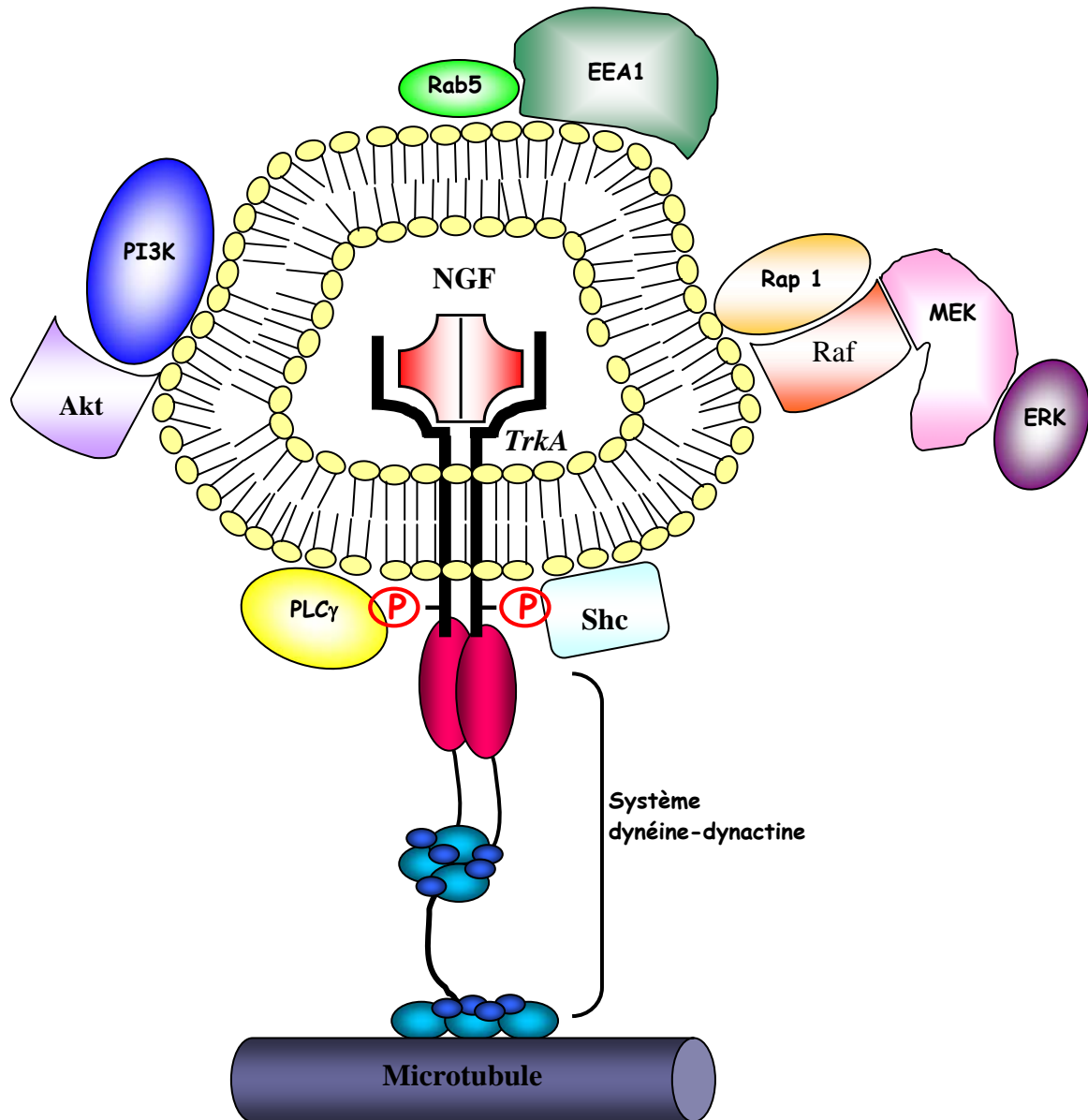


Figure 10. Endosome de signalisation

L'internalisation du récepteur TrkA conduit à la formation d'endosomes précoces qui servent de plate-forme de signalisation, grâce à l'interaction avec de nombreux effecteurs. Cet ensemble est appelé endosome de signalisation. Les effecteurs recrutés incluent la protéine adaptatrice Shc (« *Src homology 2 domain-containing protein* »), la petite protéine G Rap1, la petite protéine G Rab5 et son effecteur EEA1 (« *Early endosome antigen 1* »), la phospholipase C γ (PLC γ), des constituants de la voie des MAP-kinases (« *Mitogen-activated protein kinases* », ou MAPK) notamment Raf, MEK (« *MAP ERK kinase* ») et ERK (« *Extracellular-regulated protein kinase* »), et des constituants de la voie PI3K (« *Phosphatidyl-inositol-3-kinase* »), la PI3K elle-même et Akt (ou protéine kinase B, PKB). Le récepteur TrkA interagit également avec le complexe dynéine-dynactine, qui le relie au réseau des microtubules et permet le transport rétrograde le long des axones des nerfs.

D'après Zweifel et al., 2005

2.1.7.4. Voies de signalisation activées

Au cours de son internalisation, le récepteur TrkA active d'abord des voies de signalisation conduisant à des effets locaux dans les terminaisons nerveuses, puis le récepteur subit le transport rétrograde et active d'autres voies de signalisation une fois arrivé à proximité du corps cellulaire du neurone (Figure 11).

2.1.7.4.1. Signalisation locale dans la terminaison nerveuse

Le NGF participe à la croissance des axones en activant des voies de signalisation dans les terminaisons nerveuses (Figure 11) (*Campenot, 1977*). Le BDNF induit les mêmes effets et Atwal et collaborateurs ont montré que ces voies de signalisation mettent en jeu l'activation de la voie Ras/Raf et conduit à l'activation de la MAPK ERK1/2 (*Atwal et al., 2000*). Les voies de signalisation activées par le récepteur TrkA sont les mêmes dans les terminaisons nerveuses : l'activation de la MAPK ERK1/2 induit un effet local et ne contribue pas au transport rétrograde du récepteur TrkA (*Watson et al., 2001*). Le blocage pharmacologique de l'internalisation du récepteur TrkA bloque cette voie de signalisation, suggérant que cette activation se passe à partir de l'endosome de signalisation, après internalisation du récepteur TrkA (*York et al., 2000 ; Zhang et al., 2000*). La voie de la PI3K participe également à cette croissance axonale (*Atwal et al., 2000 ; Kuruvilla et al., 2000*), mais la persistance de ce signal après inhibition de l'internalisation du récepteur suggère que cette voie est activée avant l'internalisation du récepteur TrkA (*York et al., 2000 ; Zhang et al., 2000*), et contribuerait à la formation de l'endosome de signalisation et au trafic intracellulaire (*Heerssen et Segal, 2002*).

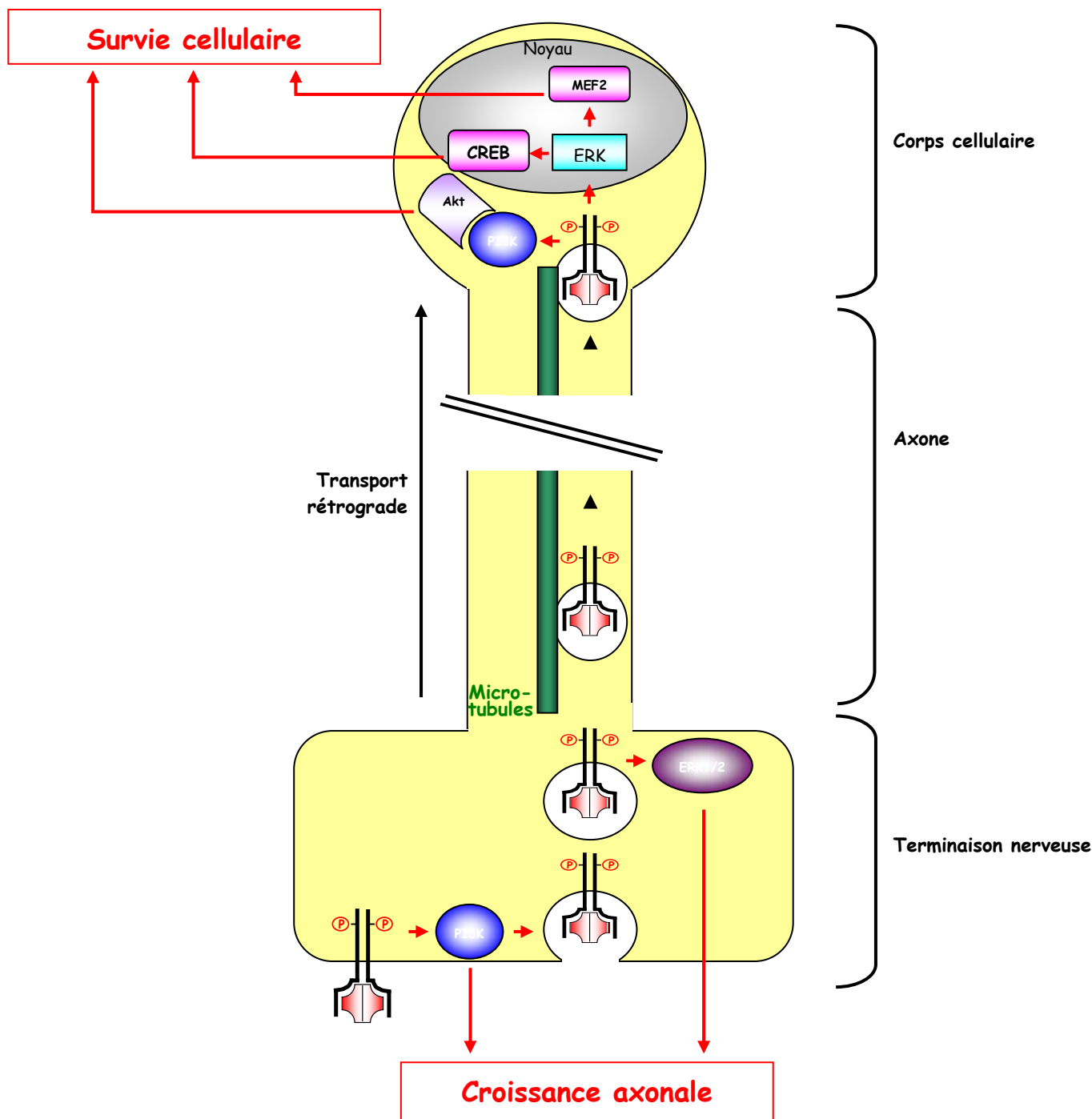


Figure 11. Voies de signalisation activées par le récepteur TrkA endocyté

Dans la terminaison nerveuse, la PI3K (« *Phosphatidyl-inositol-3-kinase* ») est activée avant l'internalisation du récepteur et participe à la croissance axonale de même qu'aux mécanismes d'endocytose du récepteur TrkA. Celui-ci une fois internalisé active la voie de la MAPK (« *Mitogen-activated protein kinase* ») ERK1/2 (« *Extracellular-regulated protein kinase* ») qui contribue également à la croissance des axones. Le récepteur TrkA internalisé suit le transport rétrograde le long de l'axone des nerfs, et arrive à proximité du corps cellulaire. Il induit alors à nouveau l'activation de la PI3K à proximité du noyau, qui via l'activation de la PKB (« *Protein kinase B* ») ou Akt) participe à la survie cellulaire. Le récepteur TrkA induit également l'activation de la MAPK ERK5 qui active les facteurs de transcription CREB (« *Cyclic-AMP Response element binding protein* ») et MEF2 (« *Myocyte-specific enhancer factor 2* »). Ces facteurs de transcription participent également à la survie cellulaire.

D'après Heerssen et Segal, 2002

2.1.7.4.2. Signalisation au niveau du corps cellulaire

Les voies de signalisation activées par l'endosome de signalisation à proximité du corps cellulaire du neurone implique la MAPK ERK5 (Figure 11) (*Watson et al., 2001*). L'expression d'un dominant négatif de la kinase de ERK5, MEK5, bloque la phosphorylation du facteur de transcription CREB, qui est également bloquée en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de la voie ERK5 (*Watson et al., 2001*). ERK5 active également un autre facteur de transcription, MEF2 (« *Myocyte-specific enhancer 2* ») (*Kato et al., 1997*). L'activation de ces deux facteurs de transcription est impliquée dans la survie cellulaire des neurones (*Bonini et al., 1999 ; Mao et al., 1999 ; Riccio et al., 1999 ; Walton et al., 1999*).

2.1.8. Mécanismes de dégradation et de recyclage du récepteur TrkA après internalisation

Avant la découverte du transport rétrograde des neurotrophines, l'endocytose des récepteurs après leur activation a été considérée pendant longtemps comme un mécanisme de désensibilisation. C'est le cas par exemple pour le récepteur EGFR, qui après endocytose est dirigé soit vers des lysosomes pour y être dégradé, soit vers des endosomes de recyclage pour être réexprimé à la surface de la cellule (*Vieira et al., 1996*). Des mécanismes identiques ont été mis en évidence récemment pour le récepteur TrkA. En effet, seule un très faible pourcentage du NGF internalisé est dirigé vers les endosomes précoces pour suivre le transport rétrograde (*Ure et Campenot, 1997 ; Tsui-Pierchala et Ginty, 1999*). Il a d'abord été montré dans les cellules PC12 qu'après activation, le récepteur TrkA est dégradé, et que cette dégradation est en partie inhibée par des inhibiteurs pharmacologiques de la voie des lysosomes (*Jullien et al., 2002*). Puis le récepteur TrkA a été colocalisé avec l'acide lysobisphosphatidique, un marqueur des endosomes tardifs, et il a été montré qu'une grande partie des récepteurs TrkA internalisés est dirigée vers des endosomes tardifs, avant d'être dégradés dans les lysosomes (*Saxena et al., 2005*). Enfin, il a été montré très récemment que le récepteur TrkA, une fois internalisé, peut être dirigé vers des endosomes de recyclage, avant d'être réexprimé à la surface de la cellule, et que ce recyclage est dépendant d'une séquence en acides aminés spécifique contenue dans la partie juxtamembranaire intracellulaire du récepteur TrkA (*Chen et al., 2005*).

2.2. Le récepteur p75^{NTR}

Le récepteur p75 des neurotrophines ou p75^{NTR} appartient à la superfamille des récepteurs de mort caractérisée par la présence d'un domaine intracellulaire appelé domaine de mort (« *Death domain* ») qui induit les voies de l'apoptose ou mort cellulaire programmée (*Chapman, 1995*). Cette superfamille contient également entre autres le récepteur Fas, les récepteurs spécifiques des cellules lymphoïdes CD40 et CD27, et les récepteurs du TNF, avec lesquels le récepteur p75^{NTR} présente une très forte homologie (*Chapman et Kuntz, 1995*).

Il a été montré que l'activation du récepteur p75^{NTR} conduit à la stimulation de l'apoptose dans les cellules neuronales, mais également dans les cellules structurales sur lesquelles ce récepteur est exprimé (*Miller et Kaplan, 2001*). Mais toutes les cellules exprimant le récepteur p75^{NTR} ne déclenchent pas forcément d'apoptose en réponse aux neurotrophines (*Mamidipudi et Wooten, 2002*). En fait, le récepteur p75^{NTR} peut induire des voies de signalisation conduisant soit à l'apoptose, soit au contraire à la survie cellulaire, et le choix de ces voies de signalisation peut dépendre de plusieurs paramètres, en particulier de la nature du ligand, des co-récepteurs impliqués, de même que des protéines adaptatrices recrutées par le récepteur dans le cytoplasme des cellules (*Atwal et al., 2000 ; Chao, 2003*). De plus, en dehors de la balance apoptose-survie cellulaire, l'activation du récepteur p75^{NTR} participe également à d'autres effets (*Dechant et Barde, 2002*), comme la myélinisation (*Chan et al., 2004 ; Saxena et al., 2005 ; Du et al., 2006*) ou la croissance des neurites (*Wang et Mukhtar, 2002 ; Wong et al., 2002*).

2.1.1. Gène codant pour le récepteur p75^{NTR}

Le gène *p75ntr* humain du récepteur p75^{NTR} est situé sur le chromosome 17, en région q12-q22 (*Huebner et al., 1986*). Il est constitué de 6 exons, et comporte environ 23kb (*Tsui-Pierchala et al., 2002*). Ce gène code pour un ARNm de 3,8kb contenant une courte région non codante d'environ 300 nucléotides à l'extrémité 5', et une région non codante plus longue d'environ 2000 nucléotides à l'extrémité 3' qui contient une séquence consensus de signal de polyadénylation (*Tsui-Pierchala et al., 2002*).

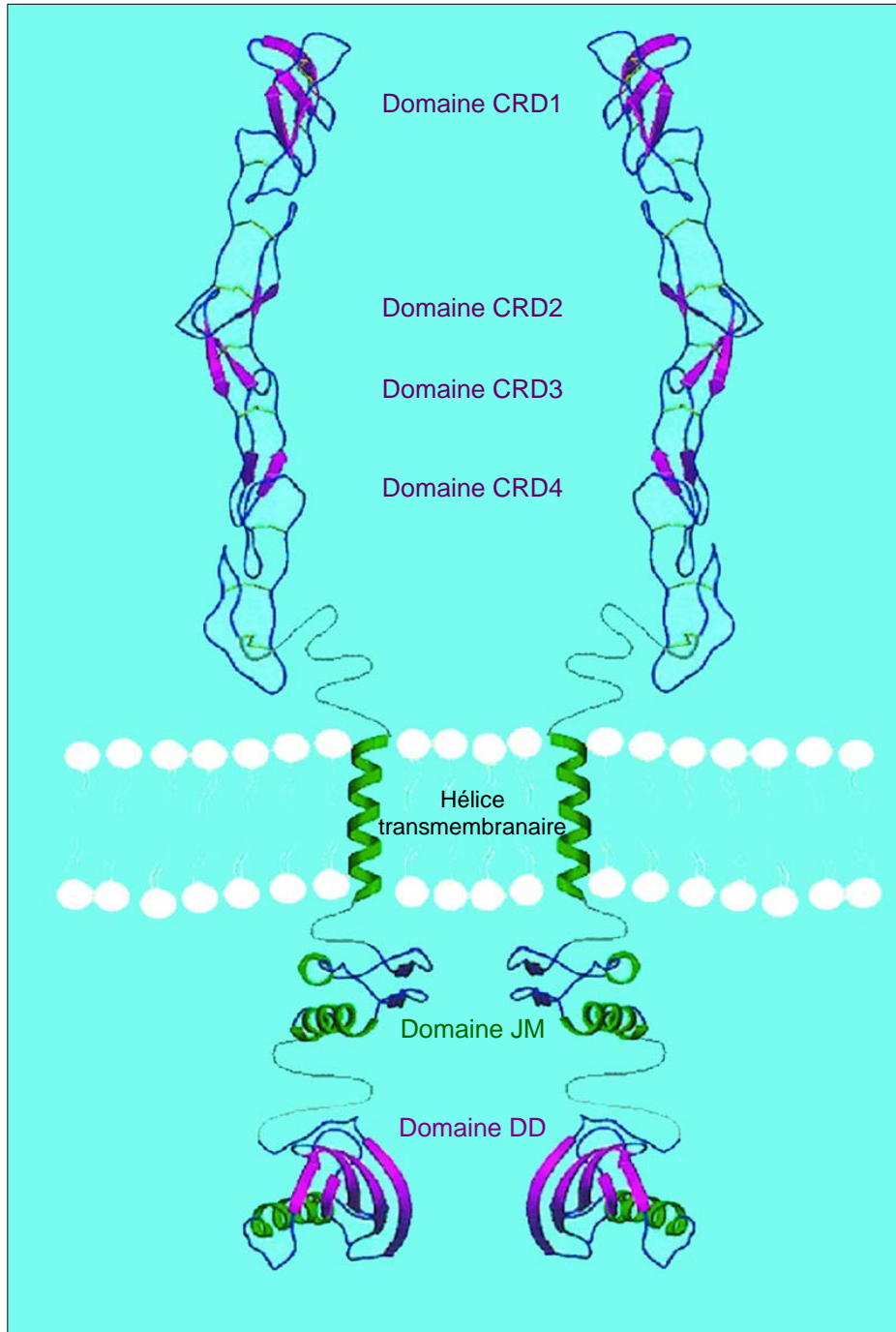


Figure 12. Structure du récepteur p75^{NTR}

L'analyse de séquence du domaine extracellulaire du récepteur p75^{NTR} a permis de mettre en évidence quatre domaines riches en cystéine (CRD) caractéristiques de la superfamille des récepteurs du TNF. Ces domaines sont chargés négativement et participent à la liaison aux neurotrophines. Après une seule hélice transmembranaire, le récepteur p75^{NTR} comporte un domaine intracytoplasmique présentant des domaines d'interaction avec des protéines adaptatrices : un domaine juxtamembranaire ou domaine chopper (JM) et un domaine de mort (DD) caractéristique des récepteurs de la mort.

D'après McDonald et Chao, 1995

Le promoteur du gène codant pour le récepteur p75^{NTR} comporte 1,8kb en amont du codon d'initiation de la transcription. Sa séquence est fortement conservée entre l'homme, le rat et la souris (*Metsis, 2001*). Aucune séquence de boîte TATA ou CAAT n'a été identifiée (*Sehgal et al., 1988*). Une séquence riche en GC a par contre été identifiée à proximité du site ATG initiateur de la traduction, et pourrait être un élément de réponse pour le facteur de transcription Sp1 (*Chiaramello et al., 1995*). Plusieurs éléments de réponse pour des facteurs de transcription de la famille bHLH (« *Basic-helix-loop-helix* »), appelés E-box, ont été identifiés dans le promoteur du récepteur p75^{NTR}, fixant en particulier le facteur ME1 qui réprime l'activité du promoteur (*Chiaramello et al., 1995*), et le facteur NeuroD qui active la transcription du récepteur p75^{NTR} (*Metsis, 2001*). D'autres régions du promoteur ont été identifiées comme éléments de réponse à l'acide rétinoïque, à la vitamine D3 et à la testostérone (*Naveilhan et al., 1996 ; Metsis, 2001*).

Une induction de la transcription du gène codant pour le récepteur p75^{NTR} a été mise en évidence en cas de lésion dans un grand nombre de types cellulaires. Les taux d'ARNm et de protéine du récepteur p75^{NTR} sont augmentées chez le rat après lésion du nerf sciatique dans les motoneurons de la moelle épinière du côté de la lésion (*Ernfors et al., 1989 ; Armstrong et al., 1991 ; Stark et al., 2001*), dans les oligodendrocytes après lésion de la moelle épinière (*Casha et al., 2001*), dans les neurones de l'hippocampe après ischémie cérébrale (*Kokaia et al., 1998 ; Andsberg et al., 2001*), et dans les neurones du cortex et de l'hippocampe après un accident vasculaire cérébral (*Roux et al., 1999*).

2.2.2. Structure du récepteur p75^{NTR}

La structure du récepteur p75^{NTR} est bien conservée entre les espèces (*Roux et Barker, 2002*). Après le clivage du peptide signal de 28 acides aminés et les maturations post-traductionnelles, le récepteur p75^{NTR} humain est une protéine glycosylée de 399 acides aminés comprenant une seule hélice transmembranaire (Figure 12).

2.2.2.1. Domaines extracellulaire et transmembranaire

Le domaine extracellulaire comprend 222 acides aminés et contient 4 domaines présentant une répétition de six cystéines, une caractéristique des récepteurs appartenant à la superfamille des

récepteurs du TNF (*Yan et Chao, 1991 ; Baldwin et al., 1992*). Ces domaines riches en cystéine sont appelés CRD (« *Cystein-rich domain* ») et numérotés de 1 à 4 à partir de l'extrémité N-terminale. Chacun contient trois ponts disulfure intra-chaînes, entraînant une conformation spécifique à chaque domaine CRD (*Banner et al., 1993*). Ces ponts disulfure sont également responsables de l'allure allongée de la partie extracellulaire du récepteur (*Holden et al., 1997*). Le domaine transmembranaire du récepteur p75^{NTR} est constitué d'une hélice transmembranaire unique et sa séquence en acides aminés est hautement conservée quelle que soit l'espèce animale considérée (*Chao et Hempstead, 1995*).

2.2.2.2. Domaine intracellulaire

Le domaine intracellulaire du récepteur p75^{NTR} comporte 155 acides aminés (*Tsui-Pierchala et al., 2002*). Il est palmitoylé sur la cystéine 279 (*Kahle et al., 1994*) et phosphorylé sur des résidus sérine et thréonine (*Grob et al., 1985 ; Taniuchi et al., 1986*). Le rôle de ces modifications post-traductionnelles ne sont pas connues, mais elles pourraient participer à des interactions de type protéine-protéine, à la bonne maturation intracellulaire du récepteur ou à la localisation intracellulaire du récepteur. La phosphorylation du récepteur p75^{NTR} pourrait également participer à la multimérisation du récepteur (*Grob et al., 1985*).

Les membres de la superfamille des récepteurs du TNF n'ont pas d'activité intracellulaire propre, et la signalisation se fait grâce à l'association à des protéines adaptatrices cytoplasmiques. Cette interaction se fait grâce à deux domaines : le domaine juxtamembranaire (JM) ou « *Chopper domain* » et le domaine de mort (DD) ou « *Death domain* ».

Le domaine de mort DD est constitué d'une séquence d'environ 80 acides aminés qui permet l'interaction avec des protéines adaptatrices, entraînant l'activation de la voie des caspases et l'induction de l'apoptose (*Roux et Barker, 2002*). Ce domaine est constitué d'une structure compacte globulaire formée de deux modules contenant chacun 3 hélices α numérotées hélices 1 à 3 dans le premier module et 2 à 6 dans le deuxième. Les hélices 2 à 6 ont une structure et une orientation identique aux autres membres de la superfamille des récepteurs du TNF. L'hélice 1 a par contre une orientation différente, ce qui lui permet de recruter des protéines adaptatrices spécifiques comme NADE ou RhoA (Voir paragraphes 2.2.5.1.1.1. et 2.2.5.3.) (*Roux et Barker, 2002 ; Wang et Mukhtar, 2002*).

Le domaine juxtamembranaire JM (également appelé « *Chopper domain* ») a été identifié plus récemment, lorsqu'il a été montré que l'expression de ce seul domaine du récepteur p75^{NTR} est capable d'induire l'apoptose dans des neurones sensitifs en culture primaire, mais également dans des cellules non neuronales (Coulson *et al.*, 1999 ; Coulson *et al.*, 2000). Il s'agit d'une séquence d'environ 150 acides aminés situés dans le domaine intracytoplasmique du récepteur, à proximité de la membrane, qui permet le recrutement de protéines adaptatrices conduisant à l'activation de voies de signalisation impliquées dans l'apoptose, mais aussi dans la survie cellulaire (Coulson *et al.*, 2004).

Le tripeptide Ser-Pro-Val à l'extrémité C-terminale intracellulaire du récepteur p75^{NTR} est conservé chez les différentes espèces, et est un site consensus de liaison à des domaines PDZ (« *Post-synaptic disc-large zona* »). Un domaine PDZ est constitué de 90 acides aminés organisés en 2 hélices α et 4 feuillets β et interagit avec une forte affinité avec des motifs Thr/Ser-X-Val/Leu le plus souvent situés sur la partie C-terminale des protéines (Doyle *et al.*, 1996). Les protéines contenant des domaines PDZ sont des molécules adaptatrices permettant la formation de complexes protéiques de signalisation intracellulaire (Sheng *et Sala*, 2001). Le récepteur p75^{NTR} lie par exemple la protéine FAP-1 (« *Fas-associated phosphatase-1* »), une protéine tyrosine phosphatase contenant un domaine PDZ, qui en interagissant avec le récepteur p75^{NTR} bloque l'activité pro-apoptotique du récepteur p75^{NTR} en déphosphorylant notamment les kinases d'activation de la MAPK JNK, et contribue ainsi à favoriser l'activation de la voie NF- κ B induisant la survie cellulaire (Irie *et al.*, 1999).

Enfin, une structure en forme d'hélice α a été identifiée dans la partie C-terminale du récepteur p75^{NTR} dans laquelle on trouve une séquence analogue au mastoparan, un peptide identifié dans le venin d'abeille et activateur de protéines G. Ceci suggère que le récepteur p75^{NTR} pourrait avoir la capacité de lier des protéines G, même si cela n'a pas été formellement démontré jusqu'à présent (Feinstein *et Larhammar*, 1990).

2.2.3. Les différentes formes du récepteur p75^{NTR}

Le gène *p75ntr* subit un épissage alternatif pour former un récepteur p75^{NTR} ne contenant pas l'exon 3, qui code pour la partie extracellulaire contenant les domaines CRD1 à 3 (Figure 13).

Cet épissage empêche la liaison aux neurotrophines (*Dechant et Barde, 1997*). Ce variant contient des domaines transmembranaire et intracytoplasmique intacts, mais son rôle n'est pas connu (*Roux et Barker, 2002*).

Le récepteur p75^{NTR} « complet » peut subir un clivage du domaine extracellulaire grâce à une métalloprotéinase non encore identifiée et génère un domaine extracellulaire soluble qui peut lier les neurotrophines, alors que le reste du récepteur comprenant le domaine transmembranaire et intracellulaire reste lié à la membrane et (*Zupan et al., 1989 ; Barker et al., 1991 ; Alderson et al., 2000*).

Un clivage dans le domaine transmembranaire a également été mis en évidence récemment, selon un processus appelé RIP (« *Regulated intramembrane proteolysis* ») (*Brown et al., 2000*). Un premier clivage a lieu au niveau extracellulaire par l'intermédiaire d'une métalloprotéinase de la famille ADAM, qui conduit ensuite à un deuxième clivage dans le domaine transmembranaire. Ce clivage conduit à la libération dans le cytoplasme de la partie intracellulaire du récepteur et à la révélation d'une séquence signal de translocation dans le noyau. Ce fragment est alors dirigé vers le noyau de la cellule, où il se comporte comme un facteur de transcription, pouvant se lier au promoteur de gènes et induire leur transcription (*Brown et al., 2000*). Dans le cas du récepteur p75^{NTR}, le premier clivage semble assuré par les protéinases ADAM10 et ADAM17, alors que la protéinase responsable du second clivage n'a pas encore été identifiée (*Chao, 2003 ; Kanning et al., 2003*). Le fragment intracellulaire généré a été identifié dans le noyau des cellules, suggérant un rôle direct de facteur de transcription sur ses gènes cibles (*Kanning et al., 2003*). Mais ce fragment est également capable de réguler la transcription de gènes de manière indirecte : il peut lier grâce à son domaine de mort DD la protéine TRAF6 et conduire à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Voir paragraphe 2.2.5.2.1.) (*Kanning et al., 2003*).

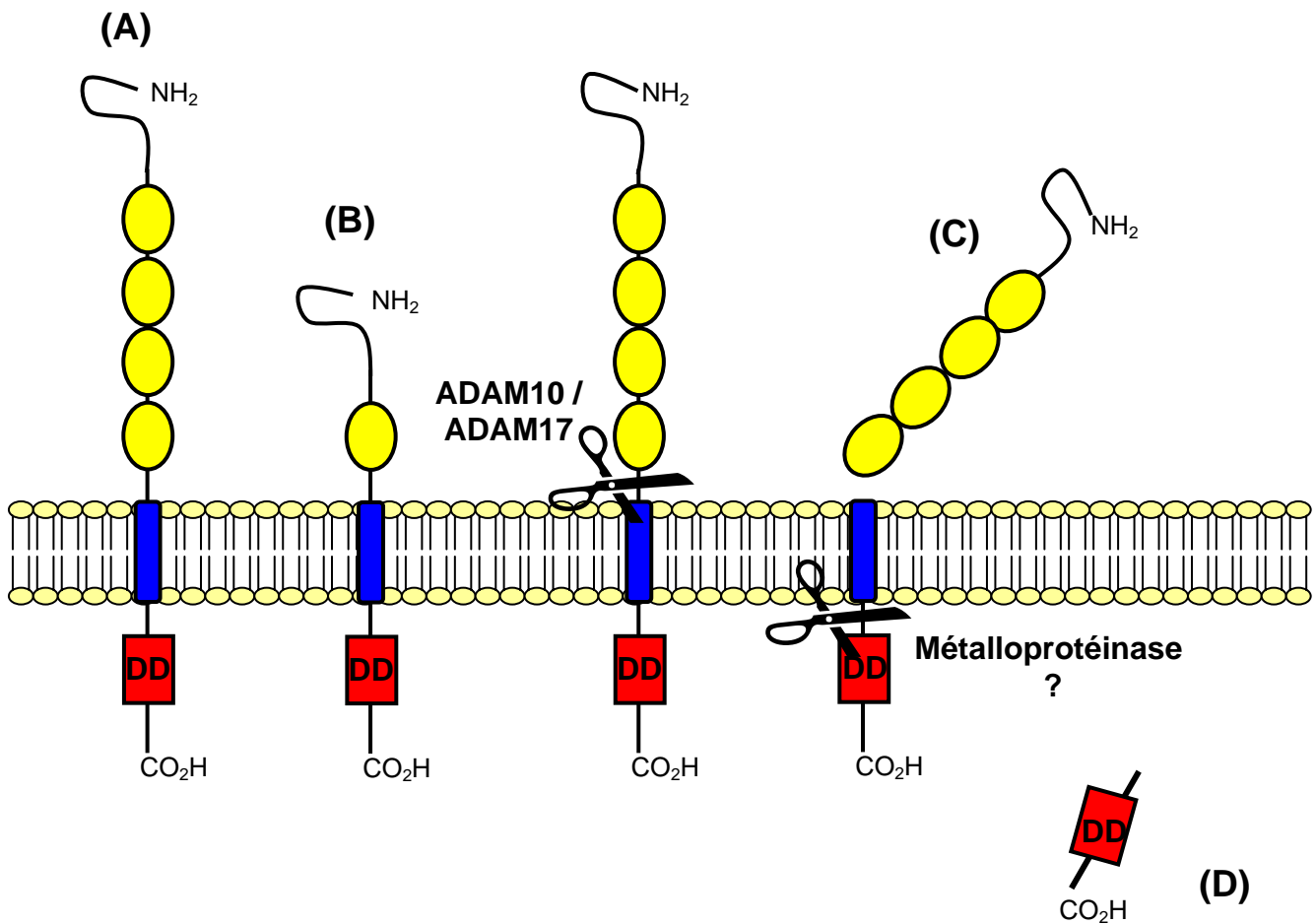


Figure 13. Les différentes formes du récepteur p75^{NTR}

La transcription du gène *p75ntr* conduit à la forme complète du récepteur (A), ainsi qu'une forme tronquée résultant de l'épissage alternatif de l'exon 3 (B). Cet épissage conduit à une forme possédant un domaine extracellulaire très court constitué d'un seul domaine riche en cystéine et ne pouvant plus lier les neurotrophines. Des clivages protéolytiques interviennent également et libèrent différents fragments du récepteur. Une métalloprotéinase, comme ADAM10 ou ADAM17, conduit au clivage du domaine extracellulaire (C), libérant d'une part une forme soluble du domaine extracellulaire complet, pouvant toujours lier les neurotrophines, et d'autre part un fragment du récepteur constitué des domaines transmembranaire et intracellulaire intact qui peut toujours recruter des protéines adaptatrices. Enfin, une métalloprotéinase non encore identifiée peut également conduire à un deuxième clivage et libérer dans le cytoplasme une forme soluble du récepteur contenant uniquement le domaine intracellulaire (D). Cette forme peut réguler la transcription de gènes de manière directe, en migrant dans les noyaux des cellules et en jouant le rôle de facteur de transcription, ou de manière indirecte en recrutant des protéines adaptatrices grâce au domaine de mort DD conduisant à l'activation de facteurs de transcription comme le facteur NF κ B.

D'après Roux et Barker, 2002 et Chao, 2003

2.2.4. Caractéristiques de liaison avec le NGF

2.2.4.1. Affinité du NGF pour le récepteur p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} lie le NGF avec une plus faible affinité que le récepteur TrkA (*Radeke et al., 1987 ; Tsui-Pierchala et al., 2002*), avec un K_D de l'ordre du nanomolaire et une vitesse de dissociation rapide ($T_{1/2} = 3$ secondes) (*Sutter et al., 1979*), ce qui lui a valu au départ le nom de récepteur à faible affinité pour le NGF (LNGFR ou « Low-affinity NGF Receptor ») (*Meakin et Shooter, 1992*). Le récepteur p75^{NTR} lie l'ensemble des neurotrophines avec la même affinité : son K_D dans des neurones sensitifs d'embryons de poulet est par exemple de $1,7 \cdot 10^{-9} M$ pour le NGF, $1,3 \cdot 10^{-9} M$ pour le BDNF et $0,8 \cdot 10^{-9} M$ pour la NT-3 (*Meakin et Shooter, 1992*). L'association des différentes neurotrophines entraîne un léger changement de conformation du récepteur différent d'un ligand à l'autre, entraînant une vitesse d'association et de dissociation légèrement différente d'une neurotrophine à l'autre (*Ernfors et al., 1990 ; Rodriguez-Tebar et al., 1992*). Le récepteur p75^{NTR} est communément considéré comme le récepteur de faible affinité pour le NGF, mais des études montrent également qu'il peut participer au site de haute affinité pour le NGF en interagissant avec le récepteur TrkA (Voir paragraphe 2.2.6.1). Il peut de plus lier les pro-neurotrophines avec une plus grande affinité que les neurotrophines matures (Voir paragraphe 2.2.4.3.)

2.2.4.2. Interactions entre le NGF et le récepteur p75^{NTR}

La modélisation moléculaire de la liaison du NGF (*Shamovsky et al., 1999*) puis la cristallisation du NGF avec le domaine extracellulaire du récepteur p75^{NTR} (*He et Garcia, 2004*) ont permis de comprendre quelles parties du domaine extracellulaire du récepteur étaient précisément impliquées dans la liaison avec le NGF.

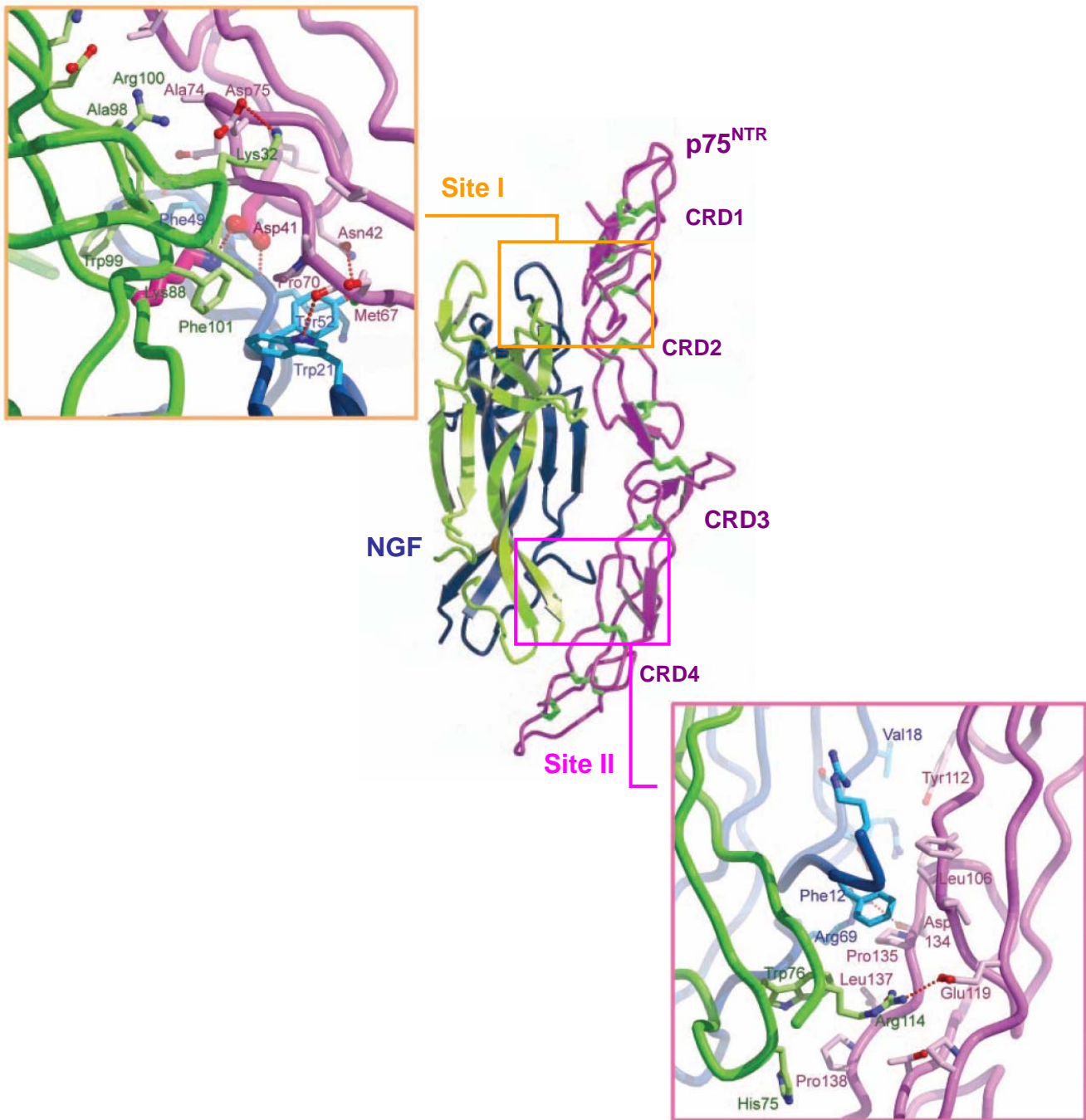


Figure 14. Interactions entre le NGF et le récepteur p75^{NTR}

Un monomère du récepteur p75^{NTR} (en violet) vient interagir avec le dimère de NGF représenté en bleu et vert. Les deux zones d'interactions principales entre le NGF et le récepteur (Sites I et II) sont agrandies et montrent les principaux acides aminés impliqués dans ces interactions. Le site I met en jeu des interactions hydrophobes entre le NGF et le domaine CRD1 et la jonction CRD1-CRD2 du récepteur p75^{NTR}, alors que le site II met en jeu la jonction CRD3-CRD4 du récepteur p75^{NTR}. Ces interactions hydrophobes sont renforcées par des liaisons ioniques et des liaisons hydrogène stabilisant l'ensemble du complexe.

D'après He et Garcia, 2004

2.2.4.2.1. Sites d'interactions avec le NGF

Les études de modélisation ont d'abord mis en évidence une séquence de 58 acides aminés dans le domaine CRD3 (du résidu Cys39 au résidu Ala96) jouant le rôle de site de liaison pour le NGF (*Shamovsky et al., 1999*). La liaison avec le NGF se fait principalement par des interactions électrostatiques entre les résidus chargés positivement des domaines de liaison des neurotrophines et des acides aminés chargés négativement sur le récepteur p75^{NTR}.

La cristallisation récente du NGF avec le domaine extracellulaire du récepteur p75^{NTR} a confirmé et permis de mieux préciser ces interactions (Figure 14). L'interaction entre le NGF et le domaine CRD3 du récepteur se fait grâce à deux sites appelés sites I et II et mettent en jeu des interactions hydrophobes, ioniques et hydrogène, en plus des interactions électrostatiques entre les charges positives sur le NGF et les charges négatives du récepteur p75^{NTR} (*He et Garcia, 2004*). Le site I est formé de deux zones. La première zone appelée Patch 1 comprend les résidus Phe101, Ile31, Trp21 et Tyr52 d'un monomère de NGF qui forment une poche dans laquelle va s'insérer la chaîne contenant les résidus Met67, Ala69 et Pro70 du domaine CRD2 du récepteur p75^{NTR}. Ces interactions hydrophobes sont renforcées par la formation de liaisons hydrogène entre les résidus Asn42 et Ser68 du récepteur p75^{NTR} et les résidus Tyr52 et Trp21 du NGF. La deuxième zone appelée patch 2 comprend la jonction CRD1-CRD2, qui forme une liaison ionique entre le résidu Asp41 du récepteur p75^{NTR} et le résidu Lys88 du NGF. Cette liaison se trouve elle-même au fond d'une poche hydrophobe formée par les résidus Trp99, Phe49, Phe101 et Tyr52 du NGF (*He et Garcia, 2004*).

Le site II est constitué de la jonction CRD3-CRD4 qui interagit avec les boucles terminales du NGF. On y trouve une complémentarité de type leucine-zipper, avec de haut en bas la formation d'interactions entre les résidus Phe12, Trp76 et His75/Trp76 du NGF et les résidus Leu106, Pro135, Leu137/Pro138 et Pro138 du récepteur p75^{NTR}. Cette interaction est renforcée par la formation de deux liaisons ioniques entre les résidus Arg114 et Arg69 du NGF et les résidus Glu119 et Asp 134 du récepteur p75^{NTR}.

En comparant la séquence en acides aminés de ces deux sites de liaison entre les différentes neurotrophines, on trouve une très grande homologie de séquence : ces régions de contact sont extrêmement bien conservées entre les différentes neurotrophines, ce qui explique leur liaison possible avec la même affinité au récepteur p75^{NTR} (*He et Garcia, 2004*).

2.2.4.2.2.2. Stœchiométrie du complexe NGF-p75^{NTR}

La structure cristallographique du NGF lié au domaine extracellulaire a révélé une stœchiométrie de complexe 2:1, soit la formation d'un complexe asymétrique avec la liaison d'un dimère de NGF à un seul monomère de p75^{NTR} (*He et Garcia, 2004*). La comparaison de la liaison réalisée entre le NGF et le récepteur p75^{NTR} et celle réalisée entre le TNF- α et le récepteur TNFR1 montre que le p75^{NTR} utilise sa face convexe pour lier le NGF alors que le TNFR1 utilise sa face concave. De plus, il n'y a qu'un seul point de contact entre le TNF- α et le récepteur TNFR1 par rapport aux deux sites décrits précédemment pour le récepteur p75^{NTR}.

La comparaison entre les sites du NGF liant le récepteur p75^{NTR} et les pseudo-sites restant libres a montré que la liaison au récepteur p75^{NTR} entraîne des modifications conformationnelles sur le NGF : alors que la conformation des feuillets β centraux reste non modifiée, on observe une rotation de 10° pour le pseudo-site I et de 6° pour le pseudo-site II, ce qui au final éloigne de 15 à 20 Å les pseudo-sites de leur position initiale (*He et Garcia, 2004*). Le récepteur p75^{NTR} a une structure rigide, et ne peut pas changer l'orientation de ses sites de liaison : des essais manuels de docking dans cette conformation montrent que la liaison entre le récepteur p75^{NTR} et le NGF est hautement improbable. La liaison d'un deuxième monomère de récepteur p75^{NTR} semble donc compromise, mais on peut envisager la liaison d'un monomère de récepteur TrkA. En effet, ce récepteur se lie notamment via des interactions mettant en jeu le feuillet β central dont la conformation n'est pas modifiée après liaison du récepteur p75^{NTR} (*He et Garcia, 2004*). On peut ainsi, grâce à ces études de cristallographie, envisager la formation d'un complexe constitué au centre d'un dimère de NGF qui lie d'un côté un monomère de récepteur p75^{NTR} et de l'autre un monomère de récepteur TrkA.

Néanmoins, une étude plus récente semble contredire ces résultats. En effet, He et Garcia avaient utilisé pour leurs études de cristallisation une forme non glycosylée du récepteur p75^{NTR}. Aurikko et collaborateurs ont étudié le domaine extracellulaire du récepteur p75^{NTR} contenant les domaines de liaison au NGF et possédant la N-glycosylation sur le résidu 60 (*Aurikko et al., 2005*). Ils ont ainsi montré que ce domaine extracellulaire glycosylé du récepteur p75^{NTR} possédait les mêmes caractéristiques de liaison au NGF que le récepteur natif, mais contrairement à lui reste uniquement sous forme de monomère en solution. Ceci suggère que les domaines d'interaction permettant la formation des dimères de récepteur p75^{NTR} sont situés en dehors des domaines de

liaison au NGF (Aurikko *et al.*, 2005). De plus, la stœchiométrie mise en évidence dans cette étude est une stœchiométrie de type 2:2, soit la liaison de 2 monomères de récepteur p75^{NTR} sur le dimère de NGF. Les différences observées entre ces études suggèrent un rôle important de la glycosylation du récepteur p75^{NTR} dans la liaison au NGF. De plus, l'existence de ces deux stœchiométries *in vivo* pourrait suggérer différents rôles de ces formes, conduisant par exemple au recrutement de différentes protéines adaptatrices et l'activation de différentes voies de signalisation (Aurikko *et al.*, 2005).

2.2.4.3. Liaison des pro-neurotrophines au récepteur p75^{NTR}

Il a été montré récemment que les pro-neurotrophines, et en particulier le pro-NGF est un ligand plus sélectif du récepteur p75^{NTR} que les neurotrophines matures (Lee *et al.*, 2001), et que le pro-NGF induit de manière plus efficace une apoptose p75^{NTR}-dépendante (Lee *et al.*, 2001 ; Beattie *et al.*, 2002). Le rôle proposé des pro-domaines des neurotrophines immatures avait été jusqu'à présent le contrôle de la bonne maturation des protéines finales, ainsi que la régulation de leur sécrétion (Rattenholl *et al.*, 2001a ; Rattenholl *et al.*, 2001b). Lee et collaborateurs ont tout d'abord montré que les pro-neurotrophines, en particulier le pro-NGF et le pro-BDNF, sont présentes en grandes quantités dans de nombreux tissus, et que leur clivage par diverses protéinases comme la plasmine ou des métalloprotéinases de matrice entraîne la libération des formes matures (Lee *et al.*, 2001). Un modèle a été proposé pour expliquer la sélectivité des pro-neurotrophines pour le récepteur p75^{NTR} : la liaison du NGF au TrkA implique l'extrémité N-terminale du NGF qui doit changer de conformation et former une hélice autour de l'extrémité du récepteur TrkA (Voir paragraphe 2.1.4.2). Cette extrémité N-terminale est séquestrée par le pro-domaine présent dans le pro-NGF et empêche ainsi cette interaction, entraînant une affinité plus faible du pro-NGF pour le récepteur TrkA (Ryden *et Ibanez*, 1996). L'extrémité N-terminale du NGF mature n'est pas importante dans les interactions formées avec le récepteur p75^{NTR}, ce qui explique une liaison possible. La plus grande affinité du pro-NGF pour ce récepteur par rapport au NGF mature suggère également la présence de sites d'interactions entre le pro-domaine du pro-NGF et le récepteur, qui augmentent l'affinité du ligand pour le récepteur p75^{NTR} (Ryden *et Ibanez*, 1996).

Ces résultats suggèrent que l'activité biologique des neurotrophines et du NGF en particulier peut être régulée par clivage protéolytique, avec les formes pro-neurotrophines activant

préférentiellement le récepteur p75^{NTR} et induisant l'apoptose, et les formes matures activant préférentiellement les récepteurs Trk pour induire la survie cellulaire (*Chao, 2003*).

2.2.5. Voies de signalisation du récepteur p75^{NTR}

L'activation du récepteur p75^{NTR} par les neurotrophines induit l'activation de voies de signalisation aboutissant à deux effets majeurs : l'induction de l'apoptose, principalement via l'intermédiaire de la MAPK JNK, ou au contraire l'induction de la survie cellulaire, principalement par l'activation du facteur de transcription NFκB. D'autres effets induits par l'activation du récepteur p75^{NTR} ont été mis récemment en évidence, notamment dans la régulation de la myélinisation et la croissance des neurites, et mettent en jeu le recrutement d'autres protéines adaptatrices et d'autres co-récepteurs particuliers eux aussi découverts récemment (voir aussi paragraphe 2.2.6.).

2.2.5.1. Voies de signalisation conduisant à l'apoptose

Les voies de signalisation activées par le récepteur p75^{NTR} et conduisant à l'apoptose mettent quasiment toutes en jeu l'activation de la MAPK JNK, qui conduit à l'activation de la voie des caspases (*Casaccia-Bonnet et al., 1996 ; Deshmukh et Johnson, 1998 ; Bruckner et al., 2001 ; Harding et al., 2001 ; Lee et al., 2001 ; Beattie et al., 2002*). L'activation de la MAPK JNK peut être induite par trois voies d'activation distinctes : le recrutement de protéines adaptatrices spécifiques, la synthèse de céramides, ou l'activation de la petite protéine G Rac1 (Figure 15A).

Récepteurs du NGF et voies de signalisation

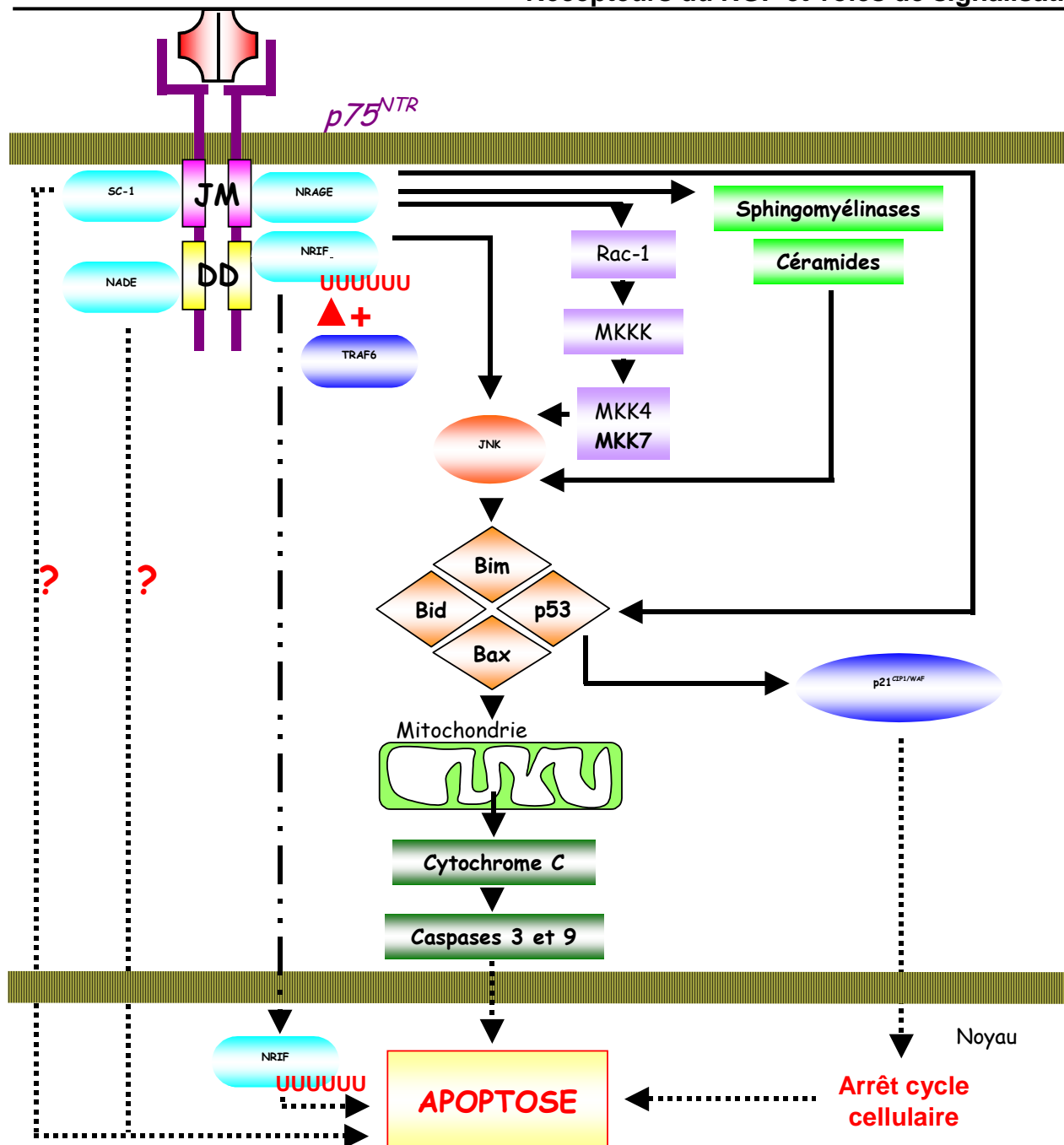


Figure 15A. Voies de signalisation du récepteur p75^{NTR} induisant l'apoptose

La MAPK JNK joue un rôle central dans l'apoptose induite par le récepteur p75^{NTR}. Elle est activée par i) les protéines adaptatrices NRIF et NRAGE, recrutées par l'intermédiaire des domaines de mort (DD) et juxtamembranaire (JM) du récepteur p75^{NTR}, ii) après activation des sphingomyélinases et synthèse des céramides ou iii) par l'intermédiaire de la petite protéine G Rac qui active MKKK, activant elle-même MKK4 et 7, les kinases spécifiques de JNK. JNK activée induit l'activation par phosphorylation des facteurs pro-apoptotiques Bim, Bid, Bax et p53, qui stimulent la libération de cytochrome C à partir des mitochondries. La voie des caspases est activée, en particulier les caspases 3 et 9, induisant l'apoptose. p53 peut aussi recruter le facteur p21^{CIP1/WAF} conduisant à un arrêt du cycle cellulaire. Le récepteur p75^{NTR} recrute également les protéines adaptatrices NADE et SC-1, qui participent à l'apoptose, mais par un mécanisme inconnu pour l'instant. La protéine NRIF peut également recruter TRAF6 qui induit sa polyubiquitinylation, entraînant sa migration dans le noyau. MAPK : Mitogen activated protein kinase ; MKKK : MAP Kinase Kinase Kinase ; MKK : MAP Kinase Kinase ; JNK : c-jun N-terminal kinase ; NRIF : neurotrophin-receptor interacting factor ; NADE : neurotrophin-associated cell death executor ; NRAGE : neurotrophin-receptor-interacting MAGE homologue ; SC-1 : Schwann cell factor-1 ; TRAF6 : TNF receptor-associated factor 6.

2.2.5.1.1. Voies de signalisation conduisant à l'activation de JNK

2.2.5.1.1.1. Recrutement de protéines adaptatrices

Contrairement au récepteur TrkA, le récepteur p75^{NTR} ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque et son activation conduit souvent dans un premier temps au recrutement de protéines adaptatrices, qui induiront ensuite la transmission du signal intracellulaire (*Roux et Barker, 2002*). Un grand nombre de ces protéines adaptatrices a été découvert récemment, et leur fonction reste souvent encore peu connue. Ces protéines adaptatrices interagissent avec deux domaines majeurs sur le récepteur p75^{NTR} : le domaine de mort DD et le domaine juxtamembranaire (JM ou Chopper domain) (*Roux et Barker, 2002*).

2.2.5.1.1.1.1. NRIF (« Neurotrophin Receptor Interacting Factor »)

La protéine adaptatrice NRIF est une protéine de poids moléculaire de 94kDa et de structure en doigt de zinc, qui interagit avec les résidus 244 à 396 du récepteur p75^{NTR}, comprenant les deux domaines DD et JM (*Casademunt et al., 1999 ; Benzel et al., 2001*). Il a été montré récemment que cette protéine adaptatrice est essentielle pour permettre l'activation de la MAPK JNK et induire une apoptose des neurones p75^{NTR}-dépendante. En effet, Linggi et collaborateurs ont utilisé des neurones sympathiques et des fibroblastes embryonnaires issus de souris dont le gène de la protéine NRIF a été invalidée, et ont montré que l'activation du récepteur p75^{NTR} dans ces cellules n'induisait plus d'apoptose ; ce défaut d'apoptose est dû à un défaut d'activation de la MAPK JNK, suggérant que la protéine NRIF est en amont de l'apoptose JNK-dépendante (*Linggi et al., 2005*). D'autre part, une fois recrutée au niveau du domaine intracellulaire du récepteur p75^{NTR}, la protéine NRIF interagit avec une autre protéine adaptatrice, TRAF6 (« *TNF receptor associated factor 6* »), conduisant à la polyubiquitinylation de NRIF. L'ubiquitinylation des protéines a été caractérisée à l'origine comme un mécanisme permettant de cibler les protéines vers le protéasome et d'entraîner leur dégradation. Mais il a été montré récemment que cette modification était de manière surprenante impliquée dans d'autres mécanismes, notamment dans les mécanismes d'internalisation de protéines, et en particulier de récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque (*Marmor et Yarden, 2004*), dans la régulation de l'activité de facteurs de transcription en induisant le

recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs (*Muratani et Tansey, 2003 ; Shcherbik et Haines, 2004*), et dans la translocation de protéines dans le noyau (*Plafker et al., 2004 ; Shcherbik et Haines, 2004*). Geetha et collaborateurs ont montré que la polyubiquitinylation de la protéine NRIF par la protéine TRAF6 induit la translocation de NRIF dans le noyau. Cette protéine y joue alors le rôle de répresseur de la transcription et conduit à un arrêt du cycle cellulaire (*Gentry et al., 2004 ; Geetha et al., 2005*). Ainsi, la protéine NRIF, en participant à l'activation de la MAPK JNK, de même qu'en jouant le rôle de répresseur de la transcription et en bloquant le cycle cellulaire, participe à l'apoptose p75^{NTR}-dépendante.

2.2.5.1.1.1.2. NRAGE (« Neurotrophin receptor-interacting MAGE »)

La protéine adaptatrice NRAGE est une protéine de poids moléculaire de 86kDa qui appartient à la famille des protéines MAGE (« Melanoma-associated antigens ») (*Barker et Salehi, 2002*), contenant toutes un domaine appelé domaine MAGE d'environ 200 acides aminés. Ce domaine MAGE est responsable de l'interaction entre la protéine NRAGE et le récepteur p75^{NTR}, en interagissant avec les résidus 250 à 330 du récepteur p75^{NTR}, une séquence appartenant au domaine JM (*Salehi et al., 2000*). La protéine NRAGE participe à l'apoptose p75^{NTR}-dépendante (*Frade et Barde, 1999 ; Kendall et al., 2002*). En effet, la transfection de cette protéine dans des cellules ne l'exprimant pas de manière constitutive induit une augmentation de l'apoptose p75^{NTR}-dépendante (*Salehi et al., 2000*). Cette augmentation est due à une augmentation de l'activation de la MAPK JNK, conduisant à une augmentation de l'activation de la voie des caspases (*Salehi et al., 2002*). De plus, après activation par le récepteur p75^{NTR}, NRAGE induit une augmentation de l'expression et de l'activation de la protéine p53 dans les cellules PC12, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire, par l'intermédiaire de l'activation de la protéine inhibitrice du cycle cellulaire p21^{CIP1/WAF} (*Salehi et al., 2000 ; Wen et al., 2004*). Cette voie JNK-indépendante, en bloquant le cycle cellulaire, contribue aussi aux effets apoptotiques induits par l'activation du récepteur p75^{NTR}.

2.2.5.1.1.1.3. NADE (« p75^{NTR}-associated cell death executor »)

La protéine NADE est une protéine adaptatrice de 14,5kDa caractérisée chez la souris (*Mukai et al., 2000*), mais qui présente plus de 92% d'homologie avec une protéine humaine jusque

là non identifiée, codée par le gène HGR74 (*Alessi et al., 1994*). Cette protéine est très certainement l'homologue humain de la protéine NADE. La protéine NADE interagit avec les résidus 338 à 396 du domaine DD du récepteur p75^{NTR} (*Mukai et al., 2000 ; Mukai et al., 2002 ; Mukai et al., 2003*). L'activation p75^{NTR}-dépendante de NADE induit une apoptose *in vitro* dans les neurones corticaux de souris en culture primaire, en activant la voie des caspases, et *in vivo* chez la souris après ischémie cérébrale, en particulier dans les neurones de l'hippocampe (*Park et al., 2000*), ou chez le rat à la suite d'un accident vasculaire cérébral (*Yi et al., 2003*). Pour l'instant, la MAPK JNK n'a pas été identifiée comme intermédiaire entre NADE et l'activation de la voie des caspases.

2.2.5.1.1.1.4. SC-1 (« Schwann cell factor-1 »)

La protéine SC-1 est une protéine adaptatrice contenant notamment un domaine à structure en doigt de zinc et un domaine de régulation positive (domaine PR pour « *Positive regulation* ») (*Chittka et Chao, 1999*). Ce domaine PR est retrouvé dans plusieurs autres facteurs de transcription qui agissent comme des répresseurs de la transcription. Localisé dans le cytoplasme à l'état basal, la protéine SC-1 est recrutée par le récepteur p75^{NTR} et interagit avec les résidus 250 à 322 du domaine JM du récepteur (*Chittka et Chao, 1999*). SC-1 migre ensuite dans le noyau, induisant ainsi un arrêt du cycle cellulaire, mais les mécanismes impliqués dans cet effet ne sont pas connus pour l'instant (*Chittka et Chao, 1999 ; Kendall et al., 2003*).

2.2.5.1.1.2. Synthèse des céramides

La liaison du NGF au récepteur p75^{NTR} induit l'activation des sphingomyélinases (*Bilderback et al., 1999*). Les sphingomyélinases neutres associées à la membrane clivent la sphingomyéline en céramides et phosphatidylcholine. Les mécanismes intracellulaires activés par les céramides conduisant à l'apoptose ne sont pas encore clairement identifiés à l'heure actuelle (*Verheij et al., 1996 ; Brann et al., 1999 ; Hirata et al., 2001*). Les céramides induisent l'apoptose en induisant la phosphorylation de la MAPK JNK dans des neurones hippocampaux de rat en culture primaire, mais les mécanismes précis de cette activation ne sont pas connus (*Brann et al., 2002*). D'autre part, les céramides pourraient contribuer à l'effet apoptotique p75^{NTR}-dépendant en inhibant des protéines impliquées dans l'induction de la survie cellulaire. La PKC atypique zeta

(PKC ζ) pourrait être l'une de ces cibles : les céramides bloquent l'activation de la PKC ζ dans les cellules PC12 et conduisent à l'apoptose (Wang et Mukhtar, 2002). Cependant, à des concentrations plus faibles, les céramides conduisent à l'activation de la PKC ζ et induisent la survie cellulaire dans ces mêmes cellules (Wang et Mukhtar, 2002). Ces résultats suggèrent une activité différente des céramides en fonction de leur concentration, pouvant conduire à des effets opposés. Les mécanismes impliqués dans ces régulations concentration-dépendantes ne sont pas connus pour l'instant.

2.2.5.1.1.3. Activation de la protéine Rac1

La protéine Rac1 est une protéine à activité GTPase appartenant à la famille des petites protéines G de type Rho (Burrige et Wennerberg, 2004). L'activation du récepteur p75^{NTR} conduit à l'activation de la petite protéine G Rac1 (Bazenet et al., 1998), qui se lie sur le motif CRIB (« *cdc-42/Rac1 interactive binding motif* ») présent sur les MAPK kinases kinases (MAPKKK). Cette interaction favorise l'auto-phosphorylation des MAPKKK, induisant ainsi leur activation (Hirai et al., 1996 ; Tibbles et al., 1996 ; Alderson et al., 2000). Les MAPKKK activées induisent la phosphorylation des MAPK kinases MKK4 et MKK7 qui phosphorylent spécifiquement la MAPK JNK (Walton et al., 1999). L'activation directe de JNK a été mise en évidence récemment dans des oligodendrocytes en culture primaire de rat et de souris : l'expression d'un dominant négatif de la protéine Rac1 bloque l'apoptose induite par l'activation du récepteur p75^{NTR} dans ces cellules, et ceci en bloquant l'activation de la MAPK JNK (Harrington et al., 2002). De plus, en transfectant le récepteur TrkA dans ces oligodendrocytes qui ne l'expriment pas de manière constitutive, l'activation de la MAPK JNK est supprimée : il existe ainsi dans ces cellules des interactions entre les voies de signalisation activées par les récepteurs TrkA et les récepteurs p75^{NTR} (Harrington et al., 2002).

2.2.5.1.2. Activation de la MAPK JNK et induction de l'apoptose

De nombreuses études montrent que les voies apoptotiques activées par le récepteur p75^{NTR} ne sont pas comparables à celles activées par les récepteurs du TNF. En effet, l'apoptose induite par le TNF met en jeu la formation d'un complexe de signalisation appelé DISC (« *Death-inducing*

signaling complex »). Ce complexe DISC est formé par les protéines adaptatrices FADD (« *Fas associated death domain* ») et TRADD (« *TNF receptor 1-associated death domain* ») recrutées par le domaine de mort du récepteur TNFR, et conduit à l'activation de la caspase-8 puis des autres caspases (Aggarwal, 2000 ; Baud et Karin, 2001). Après activation du récepteur p75^{NTR} par le NGF ou le pro-NGF, ces protéines adaptatrices ne sont pas recrutées, mais l'activation de la voie des caspases se fait par l'intermédiaire de la MAPK JNK (Casaccia-Bonnet et al., 1996 ; Deshmukh et Johnson, 1998 ; Bruckner et al., 2001 ; Harding et al., 2001 ; Lee et al., 2001 ; Beattie et al., 2002). La MAPK JNK activée peut phosphoryler des facteurs pro-apoptotiques, en particulier les protéines Bad, p53 et Bax, induisant ainsi leur activation : ces protéines stimulent la libération du cytochrome c à partir des mitochondries, entraînant l'activation des caspases, et en particulier des caspases 3 et 9 (Casaccia-Bonnet et al., 1996 ; Deshmukh et Johnson, 1998 ; Atwal et al., 2000 ; Bruckner et al., 2001 ; Harding et al., 2001 ; Lee et al., 2001 ; Beattie et al., 2002). D'autre part, JNK peut conduire à l'activation de c-jun, et à la formation du facteur de transcription AP-1 qui va induire la transcription de gènes cibles. Ces gènes cibles sont à l'étude actuellement, et deux d'entre eux ont été identifiés récemment : il s'agit des protéines Bim et Dp5 ; ces protéines possèdent un domaine BH3 (« *Bcl-2 Homology Domain 3* »), c'est à dire qu'elles appartiennent au groupe de protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 dont Bax et Bad par exemple font également partie. Ces protéines, comme les autres membres de cette famille, ont une activité pro-apoptotique : leur activation NGF- et c-jun-dépendante conduit à l'apoptose dans les neurones sympathiques (Sutter et al., 1979 ; Whitfield et al., 2001).

2.2.5.2. Voies de signalisation conduisant à la survie cellulaire

La survie cellulaire induite par l'activation du récepteur p75^{NTR} par les neurotrophines et le NGF en particulier met en jeu l'activation du facteur de transcription NFκB. Ce facteur est activé dans les cellules neuronales par trois voies connues actuellement : i) par le recrutement de protéines adaptatrices de la famille TRAF (« *TNF receptor-associated factor* »), en particulier TRAF6, qui active la kinase IRAK et la PKC atypique iota (ou PKC_ι), ii) par le recrutement d'une autre protéine adaptatrice, la protéine RIP-2 (« *Receptor interacting-protein 2* »), et iii) par l'activation de la PI3K, conduisant à l'activation de la kinase PKB (ou Akt) (Figure 15B).

2.2.5.2.1. Voies de signalisation activant le facteur de transcription NFκB

2.2.5.2.1.1. Recrutement des protéines adaptatrices TRAF et activation des kinases IRAK et PKC ι

Les protéines de la famille TRAF ont été identifiées à l'origine comme des protéines adaptatrices recrutées par les récepteurs du TNF α et de l'IL-1, et conduisent à l'activation du facteur de transcription NFκB et de la MAPK JNK (Wajant *et al.*, 2001). Six isoformes différentes ont été identifiées pour l'instant, mais seuls TRAF2, TRAF4 et TRAF6 peuvent interagir avec le récepteur p75^{NTR} (Krajewska *et al.*, 1998 ; Khursigara *et al.*, 1999 ; Ye *et al.*, 1999), via une interaction avec le domaine juxtamembranaire JM du récepteur (Gentry *et al.*, 2004). L'interaction de la protéine TRAF6 avec le récepteur p75^{NTR} induit son activation, et conduit au recrutement de la kinase IRAK (« *IL-1 receptor associated kinase* »). Cette kinase recrute et active la PKC ι (Wooten, 1999 ; Wooten *et al.*, 2000 ; Wooten *et al.*, 2001), qui va permettre la phosphorylation de l'inhibiteur IκB (Cosgaya et Shooter, 2001), libérant ainsi le facteur de transcription NFκB actif (Ye *et al.*, 1999 ; Khursigara *et al.*, 2001 ; Mamidipudi *et al.*, 2002). Une association des protéines TRAF2 et TRAF4 avec le récepteur p75^{NTR} a également été mise en évidence par co-immunoprécipitation. Mais alors que TRAF2 active NFκB comme TRAF6, TRAF4 bloque au contraire cette activation (Ye *et al.*, 1999).

Un autre groupe de protéines possédant un domaine d'interaction similaire aux protéines TRAF a été mis en évidence : il s'agit de la famille de protéines TEF (« *TRAF domain-encompassing factor* »), et en particulier la protéine MUL codée par le gène *Mul* responsable du nanisme de Mulibrey (pour « Muscle-Liver-Brain-Eye nanism ») (Zapata *et al.*, 2001). Cette protéine peut se lier au récepteur p75^{NTR} et à l'ensemble des protéines TRAF, régulant leur activité et entraînant l'inhibition de l'activation de NFκB (Zapata *et al.*, 2001).

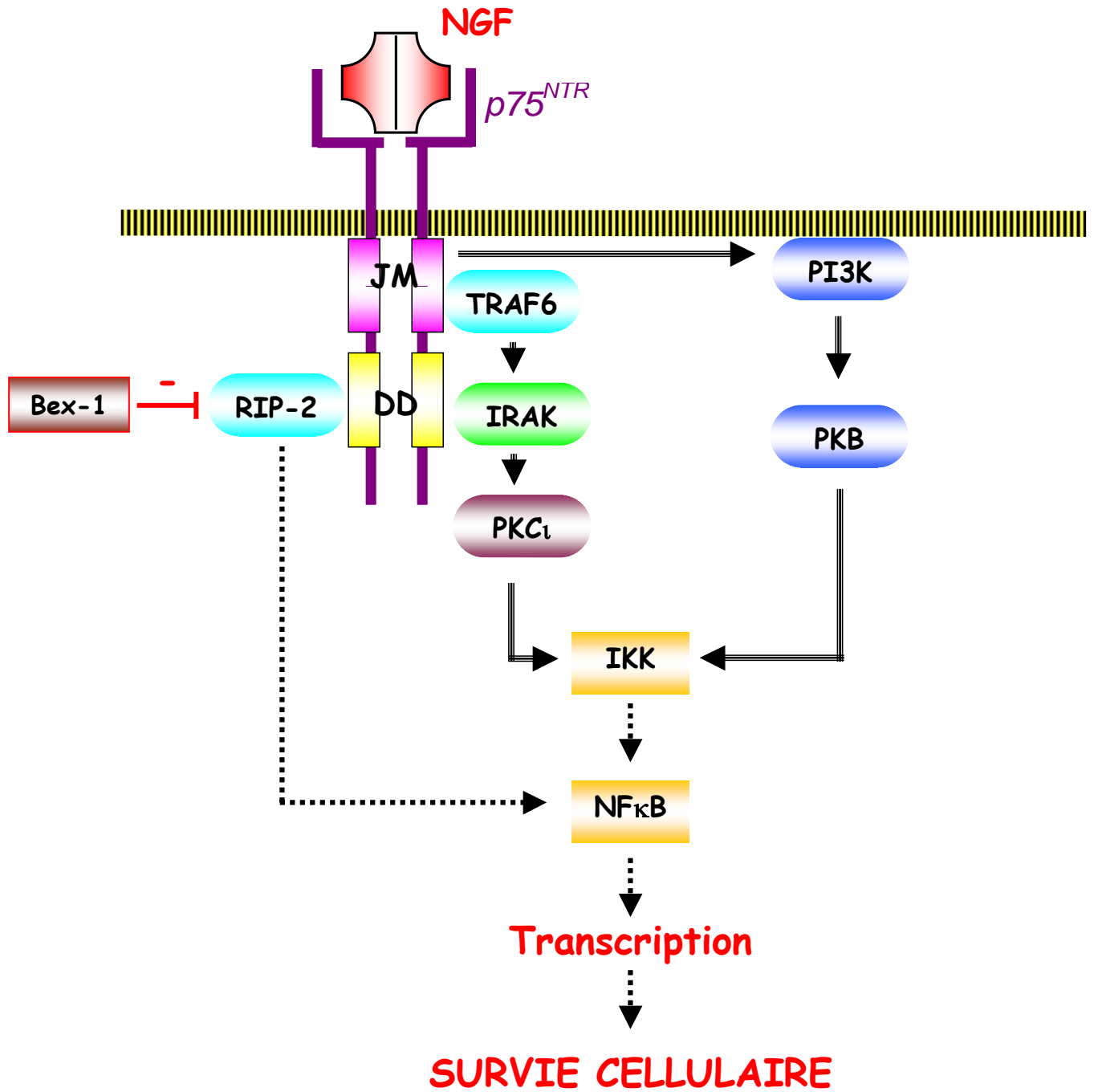


Figure 15B. Voies de signalisation du récepteur p75^{NTR} induisant la survie cellulaire

Le facteur de transcription NFκB joue un rôle central dans les voies de signalisation induites par le récepteur p75^{NTR} impliqués dans la survie cellulaire : il est activé par i) la protéine adaptatrice TRAF6, recrutée au niveau du domaine JM du récepteur p75^{NTR}, qui recrute à son tour la kinase IRAK et conduit à l'activation de la PKC atypique PKC_ι, elle-même induisant la phosphorylation de la kinase IKK ; ii) la protéine adaptatrice RIP-2 recrutée au niveau du domaine DD du récepteur p75^{NTR} ou iii) l'activation de la PI3K et de la kinase PKB, conduisant également à la phosphorylation de la kinase IKK. Le facteur NFκB activé migre dans le noyau des cellules et induit la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire. La protéine Bex-1 entre en compétition avec la protéine RIP-2 et bloque la survie cellulaire RIP-2 dépendante. TRAF6 : TNF receptor-associated factor 6 ; IKK : Kinase de IκB ; NF-κB : nuclear factor-κB ; IRAK : Interleukin-1 receptor associated kinase ; PKC_ι : protéine kinase C atypique _ι ; RIP2 : receptor-interacting protein-2 ; PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase ; PKB : protéine kinase B (appelée aussi Akt).

2.2.5.2.1.2. Recrutement de la protéine adaptatrice RIP-2

La protéine RIP-2 est une protéine adaptatrice contenant un domaine Ser/Thr kinase, ainsi qu'un domaine de recrutement des caspases (domaine CARD ou « *CAspase Recruiting Domain* »). RIP-2 se lie au domaine intracellulaire du récepteur p75^{NTR} après activation par le NGF grâce à l'interaction entre ce domaine CARD et le domaine DD du récepteur (Khursigara et al., 2001). Cette protéine activée va induire la survie cellulaire, via l'activation du facteur de transcription NFκB (McCarthy et al., 1998 ; Khursigara et al., 2001).

Une nouvelle protéine adaptatrice, Bex1, a été identifiée très récemment et semble entrer en compétition avec RIP-2 sur le domaine DD du récepteur p75^{NTR} (Vilar et al., 2006). Une surexpression de Bex1 conduit à l'inhibition de l'activation de NFκB et à l'arrêt du cycle cellulaire, et cet effet est inhibé par la surexpression concomitante de RIP-2. Les effets des protéines RIP-2 et Bex1 semblent ainsi se contrebalancer et l'équilibre entre l'activation de ces deux protéines participe à la régulation de la survie cellulaire et de l'apoptose induites par le NGF de manière p75^{NTR}-dépendante (Vilar et al., 2006).

2.2.5.2.1.3. Activation des protéines PI3K et PKB

L'activation du récepteur p75^{NTR} par le NGF peut conduire à l'activation de la voie de la PI3K, qui participe également à la survie cellulaire (Atwal et al., 2000 ; Brunet et al., 2001). Cette activation se fait de manière TrkA indépendante (Roux et al., 2001). L'activation du récepteur p75^{NTR} conduit dans les cellules PC12 à la phosphorylation de la kinase PKB sur le résidu Ser473, et cette phosphorylation nécessite la PI3K, elle-même phosphorylée sur le résidu Ser473 (Roux et al., 2001). L'activation du récepteur p75^{NTR} conduit à l'activation de la PKB dans des neurones issus de l'hippocampe de rat en culture primaire, conduisant à l'activation de NFκB et induisant la survie cellulaire, via la phosphorylation de la kinase IKK1 de IκB (« *Inhibitory κB* ») (Bui et al., 2002). L'utilisation d'inhibiteurs de la PI3K ou l'expression d'un dominant négatif de la PKB stoppe l'activation de NFκB, de même que l'utilisation d'anticorps bloquant le récepteur p75^{NTR} (Bui et al., 2002). N'ayant pas d'activité kinase intrinsèque, il a été suggéré que le récepteur p75^{NTR} pourrait recruter des kinases, ou au contraire bloquer des mécanismes de déphosphorylation, conduisant ainsi à une phosphorylation plus importante de la PI3K et en conséquence l'activation de

la PKB. En effet, l'activation du récepteur p75^{NTR} conduit à une diminution de l'activité protéine-tyrosine phosphatase dans le cytoplasme des cellules PC12 étudiées, suggérant ainsi que l'activation du récepteur p75^{NTR} régule l'activité de certaines phosphatases encore non identifiées (*Roux et al., 2001*).

D'autre part, la PI3K peut également conduire à un signal de survie cellulaire de manière NFκB-indépendante, en induisant la phosphorylation de la caspase-9, de la protéine pro-apoptotique Bad et des facteurs de transcription de la famille Forkhead, induisant ainsi leur inactivation (*del Peso et al., 1997 ; Cardone et al., 1998 ; Brunet et al., 1999*).

2.2.5.2.2. Activation du facteur de transcription NFκB

Le complexe NFκB (formé généralement d'un dimère de type p50/p65) est séquestré sous forme inactive dans le cytoplasme des cellules, lié à la sous-unité inhibitrice IκB. L'activation de ce facteur de transcription résulte de l'activation du complexe de kinases IKK (« *IκB kinase* »), constitué de deux sous-unités actives IKKα et IKKβ, associées à une sous-unité régulatrice IKKγ encore appelée NEMO. La phosphorylation de IκB par le complexe IKK induit sa dissociation de NFκB, et IκB est dirigé vers le protéasome où il va être dégradé. La dissociation de IκB met à jour une séquence signal de translocation nucléaire, permettant au dimère NFκB de migrer dans le noyau et de se lier à ses éléments de réponse κB présents dans le promoteur de ses gènes cibles (*Shishodia et Aggarwal, 2002 ; Hayden et Ghosh, 2004 ; Mattson, 2005*).

L'activation du facteur de transcription NFκB par le récepteur p75^{NTR} a été décrite à l'origine dans les cellules de Schwann de rat en culture primaire, où le traitement des cellules par le NGF entraîne la translocation de p65 dans le noyau et l'augmentation de la liaison de NFκB à l'ADN (*Carter et al., 1996*). Depuis, cette activation a été mise en évidence dans de nombreux autres types cellulaires (*Ladiwala et al., 1998 ; Maggirwar et al., 1998 ; Yoon et al., 1998 ; Bhakar et al., 1999 ; Hamanoue et al., 1999 ; Gentry et al., 2000 ; Wiley et Burke, 2001*). Mais le niveau d'activation de NFκB reste modeste en comparaison de celui provoqué par les autres membres de la superfamille des récepteurs du TNF (*Carter et al., 1996 ; Bhakar et al., 1999 ; Hughes et al., 2001*). Par contre, les neurotrophines comme le NGF ou le BDNF peuvent agir en synergie avec le TNF-α pour augmenter l'activation de NFκB dans les cellules PC12, les oligodendrocytes ou les cellules de Schwann de rat (*Bhakar et al., 1999 ; Furuno et Nakanishi, 2006*).

L'induction de la survie cellulaire par l'activation du facteur de transcription NFκB résulte de deux effets majeurs. En effet, NFκB active la transcription de molécules à activité anti-apoptotique, en particulier les protéines de la famille des inhibiteurs cellulaires de l'apoptose cIAP-1 et cIAP-2, et certains membres de la famille de Bcl-2 comme Bcl-XL et Bcl-2 lui-même. D'autre part, NFκB peut également induire la transcription de gènes conduisant à la synthèse de protéines qui vont bloquer la voie JNK induisant l'apoptose (*Papa et al., 2004b*). Ceci se fait par exemple par l'intermédiaire de la synthèse de la protéine Gadd45β qui forme un complexe avec MKK7 et bloque son activation, réduisant ainsi l'activation de JNK (*Papa et al., 2004a*).

2.2.5.3. Autres voies de signalisation

RhoA est une protéine possédant une activité GTPase, impliquée dans la morphogenèse du système nerveux, en particulier la migration et la croissance des axones ou encore la formation des synapses (*Nikolic, 2002*). RhoA est recrutée au niveau du domaine intracellulaire du récepteur p75^{NTR} après activation par le NGF (*Yamashita et al., 1999*). Ce recrutement p75^{NTR}-dépendant participe à la croissance axonale (*Yamashita et al., 1999 ; Yamashita et al., 2002 ; Yamashita et Tohyama, 2003*), à la mobilité des récepteurs de la rétine (*Gehler et al., 2004*), et régule la migration des cellules de Schwann (*Yamauchi et al., 2004*). Il a été montré récemment que RhoA est également impliqué dans l'inhibition de la croissance des neurites induite par le récepteur p75^{NTR} associé aux récepteurs NogoR et Lingo-1 (voir Figure 16 et paragraphe 2.2.6.2) (*Barker, 2004 ; Ricci et al., 2004 ; Lu et al., 2005 ; Yamashita et al., 2005*).

2.2.6. Les co-récepteurs du récepteur p75^{NTR}

Les effets induits par l'activation du récepteur p75^{NTR} sont très divers, notamment à cause du recrutement de multiples protéines adaptatrices qui conduisent à l'activation de différentes voies de signalisation et parfois à des effets opposés. Le recrutement de co-récepteurs par le récepteur

p75^{NTR} a récemment été mis en évidence et pourrait contribuer à cette diversité, voire l'élargir encore plus (Figure 16) (*Barker, 2004 ; Lu et al., 2005*).

2.2.6.1. Interactions avec le récepteur TrkA

Les récepteurs Trk ont été appelés à l'origine récepteurs de haute affinité pour le NGF, et le récepteur p75^{NTR} récepteur de faible affinité pour le NGF. Mais en fait, quand ces récepteurs sont co-exprimés, le récepteur p75^{NTR} augmente l'affinité des récepteurs Trk pour les neurotrophines (*Hempstead et al., 1991 ; Kaplan et al., 1991a ; Kaplan et al., 1991b ; Battleman et al., 1993 ; Benedetti et al., 1993 ; Mahadeo et al., 1994*). L'association des récepteurs p75^{NTR} et Trk favorise la discrimination des différents récepteurs Trk pour leur ligand privilégié : c'est le cas du récepteur TrkA dont l'affinité en présence du récepteur p75^{NTR} augmente pour le NGF et diminue pour la NT-3 (*Dechant, 2001*). Les tissus périphériques produisent peu de neurotrophines, et le récepteur p75^{NTR} pourrait ainsi se comporter dans ce cas comme un co-récepteur pour faciliter la réponse des récepteurs Trk à de faibles quantités de neurotrophines (*Barker, 2004*).

L'interaction directe entre les récepteurs p75^{NTR} et TrkA a été mise en évidence par des techniques de co-immunoprécipitation et de colocalisation (*Huber et Chao, 1995 ; Ross et al., 1996 ; Ross et al., 1998 ; Wolf et al., 1998 ; Bibel et al., 1999*). La formation de ces hétérodimères met en jeu des interactions entre les domaines extracellulaire et intracellulaire des récepteurs p75^{NTR} et TrkA. La présence du domaine kinase du récepteur TrkA est également nécessaire à ces interactions, mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore élucidés (*Gargano et al., 1997 ; Bibel et al., 1999*). Cette hypothèse semble se confirmer grâce à des travaux plus récents, montrant l'association également nécessaire des domaines transmembranaires des deux types de récepteurs pour former ce site de haute affinité pour le NGF (*Esposito et al., 2001*). De plus, des études de cristallisation récentes du NGF avec le domaine extracellulaire du récepteur p75^{NTR} suggère la formation de ces hétérodimères comme possible (*He et Garcia, 2004*).

Récepteurs du NGF et voies de signalisation

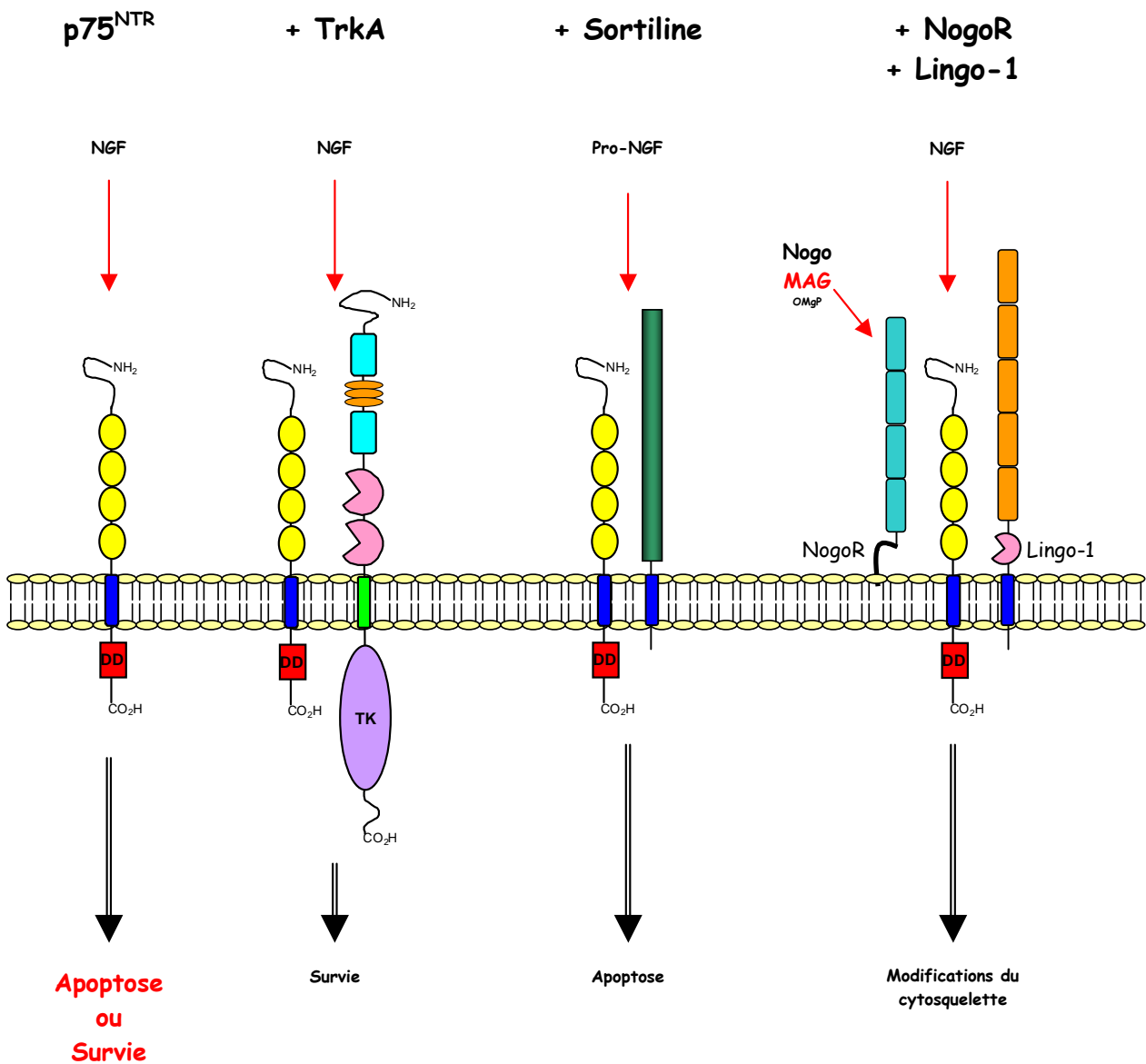


Figure 16. Co-récepteurs du récepteur p75^{NTR}

L'activation par le NGF du récepteur p75^{NTR} seul induit l'apoptose ou la survie cellulaire en fonctions des voies de signalisation activées. En présence du récepteur TrkA, le récepteur p75^{NTR} participe à la formation d'un site de haute affinité pour le NGF et contribue à activer ou potentialiser des voies de signalisation induisant la survie cellulaire. En association avec la sortiline, le récepteur p75^{NTR} a une grande affinité pour les pro-neurotrophines, en particulier le pro-NGF, et induit l'apoptose. Enfin, en association avec les récepteurs NogoR et Lingo-1, le récepteur p75^{NTR} activé par le NGF régule la croissance des neurites par l'intermédiaire de modifications du cytosquelette. DD : domaine de mort ; TK : tyrosine-kinase intrinsèque ; MAG : myelin-associated glycoprotein ; OMgP : Oligodendrocyte myelin glycoprotein ; NogoR : Nogo receptor.

D'après Barker, 2004

La formation d'hétérodimères p75^{NTR}-TrkA impliquerait d'autres protéines associées. La protéine ARMS (« *Ankyrin repeat-rich membrane spanning* ») a été isolée par co-immunoprécipitation avec le récepteur p75^{NTR} (Yano et al., 2001). Cette protéine possède 4 domaines transmembranaires et ses extrémités C- et N-terminales sont intracellulaires. Elle pourrait servir d'intermédiaire dans la formation d'hétérodimères avec le récepteur TrkA (Yano et al., 2001). La formation d'un complexe ternaire comprenant les récepteurs TrkA, p75^{NTR} et la protéine ARMS, a été identifiée plus récemment, avec l'interaction entre les récepteurs p75^{NTR} et TrkA assurée par leurs domaines transmembranaires, et la liaison avec la protéine ARMS assurée par le domaine juxtamembranaire JM du récepteur p75^{NTR} (Chang et al., 2004). De plus, la protéine ARMS est un substrat de la kinase du récepteur TrkA, suggérant que cette protéine participe à la signalisation intracellulaire activée par la formation des hétérodimères TrkA-p75^{NTR} (Yano et al., 2001 ; Chang et al., 2004). Une autre protéine adaptatrice recrutée par le récepteur p75^{NTR} a été identifiée : il s'agit de la protéine adaptatrice p62, induisant l'activation d'une PKC atypique encore non identifiée en réponse au NGF (Samuels et al., 2001). Cette PKC est dite atypique, car contrairement aux autres PKC, son activation ne nécessite pas de diacylglycérol (DAG) ou d'augmentation intracellulaire de calcium pour induire l'activation de NFκB (Diaz-Meco et al., 1994). Dans les cellules PC12, la protéine p62 forme un complexe avec les récepteurs p75^{NTR}, TrkA et la protéine TRAF6, et favorise l'activation de NFκB par le NGF (Wooten et al., 2001). La protéine p62 est d'autre part également impliquée dans l'internalisation du récepteur TrkA dans les endosomes (Geetha et Wooten, 2003).

Une troisième protéine adaptatrice impliquée dans les interactions entre les récepteurs p75^{NTR} et TrkA a été identifiée plus récemment : il s'agit de la protéine NRH-2 (« *Neurotrophin receptor homolog-2* ») (Murray et al., 2004). Cette protéine ne lie pas directement le NGF, mais lorsqu'elle est recrutée par le récepteur p75^{NTR}, peut interagir avec le récepteur TrkA et contribuer à la formation d'un site de haute affinité pour le NGF (Murray et al., 2004).

L'interaction entre les voies de signalisation des récepteurs p75^{NTR} et TrkA a également été mise en évidence. Le récepteur p75^{NTR} exprimé seul induit l'apoptose, mais une co-expression du récepteur TrkA peut bloquer cet effet, conduisant au contraire à la survie neuronale (Kahle et al., 1994 ; Verdi et al., 1994 ; Ninkina et al., 1997 ; Yoon et al., 1998). L'inhibition des voies de l'apoptose par l'activation du récepteur TrkA est réalisée notamment par l'activation de Ras et de la

voie de la PI3K, conduisant à une inhibition de l'activation de la MAPK JNK (Yoon et al., 1998 ; Mazzoni et al., 1999 ; Atwal et al., 2000) et au blocage de la voie des céramides, en particulier via l'activation des PKC (Bilderback et al., 1999 ; Plo et al., 2004). La présence du récepteur p75^{NTR} peut également augmenter l'activation des voies de signalisation induites par le récepteur TrkA en particulier les voies des MAPK ERK1/2 et p38 et de la PI3K (Rozakis-Adcock et al., 1992). Après traitement des cellules PC12 par le NGF à des concentrations nanomolaires, une interaction physique directe entre le récepteur p75^{NTR} et la protéine Shc a été mise en évidence par co-immunoprécipitation, et la phosphorylation TrkA-dépendante de la protéine Shc augmente en présence du récepteur p75^{NTR} (Epa et al., 2004). D'autre part, l'activation du facteur de transcription NFκB par le récepteur p75^{NTR} peut agir en synergie avec les voies PI3K et MAPK activées par le récepteur TrkA pour induire la survie cellulaire (Maggirwar et al., 1998 ; Hamanoue et al., 1999 ; Culmsee et al., 2002 ; Ivanisevic et al., 2003 ; Lachyankar et al., 2003). De plus, l'activation du récepteur p75^{NTR} retarde l'internalisation et la dégradation du récepteur TrkA, ce qui pourrait ainsi permettre son activation prolongée (Makkerh et al., 2005). Enfin, d'autres rôles ont également été proposés pour le récepteur p75^{NTR}, en particulier dans le recrutement du NGF et sa présentation au récepteur TrkA (Kahle et al., 1994 ; Ross et al., 1998) ou le maintien des molécules de NGF à proximité des membranes cellulaires, et donc à proximité des récepteurs TrkA (Dechant, 2001).

2.2.6.2. Interactions avec le récepteur NogoR

Un rôle du récepteur p75^{NTR} a été montré dans la régulation de la croissance neuronale, notamment par l'activation de la protéine GTPase RhoA (Yamashita et al., 1999). L'activation de RhoA permet les effets de protéines appelées MBGI (« *derived Myelin-Based Growth Inhibitors* ») incluant les protéines Nogo, les glycoprotéines MAG (« *Myelin-Associated Glycoprotein* ») et OmGP (« *Oligodendrocyte myelin GlycoProtein* »). Ces protéines bloquent la croissance neuronale via l'activation d'un récepteur appelé NogoR, et l'activation des voies de signalisation de ce récepteur sont atténuées dans des neurones sensitifs issus d'une souris dont le gène du récepteur p75^{NTR} a été invalidé (Yamashita et al., 2002). En fait, le récepteur p75^{NTR} est un co-récepteur du récepteur NogoR (Wang et Mukhtar, 2002 ; Wong et al., 2002), et l'interaction des protéines MGBI à ce complexe permet le recrutement de RhoA au niveau du domaine DD du récepteur p75^{NTR}

(*Yamashita et Tohyama, 2003*). Un troisième récepteur appelé LINGO-1 (ou LERN1) a récemment été colocalisé avec le complexe p75^{NTR}-NogoR et semble nécessaire à l'activation de ce complexe par les protéines MBGI (*Mi et al., 2004*).

2.2.6.4. Interactions avec la sortiline

Les pro-neurotrophines ont été identifiées récemment comme des ligands du récepteur p75^{NTR}, avec une plus grande affinité que les neurotrophines matures (Voir paragraphe 2.2.4.3). Un co-récepteur a été associé à cette liaison : il s'agit de la sortiline, une protéine à une seule hélice transmembranaire exprimée dans différents tissus, mais particulièrement abondante dans le système nerveux central en cours de développement comme chez l'adulte. Elle appartient à la famille des protéines VPS10 (« *Vacuolar carboxy-Peptidase Sorting receptor-10* »). Ces protéines sont appelées ainsi car elles possèdent un domaine VPS10 caractérisé pour la première fois dans un récepteur contrôlant le bon adressage d'une carboxypeptidase chez la levure. Ces protéines participent chez les mammifères aux transferts protéiques à travers le réseau de l'appareil de Golgi pour exprimer les protéines à la membrane plasmique, mais également au transfert inverse de la membrane plasmique vers les endosomes ou les lysosomes. Ces protéines sont exprimées principalement dans les tissus nerveux, en particulier dans le cerveau et la moelle épinière, mais aussi dans d'autres tissus comme le muscle squelettique ou les testicules (*Nielsen et al., 2001*). Nykjaer et collaborateurs ont récemment montré que la co-expression de la sortiline avec le récepteur p75^{NTR} est nécessaire à l'induction de l'apoptose par le pro-NGF (*Nykjaer et al., 2004*). Un effet similaire a été identifié pour le pro-BDNF qui induit l'apoptose neuronale grâce à la formation d'un complexe entre le récepteur p75^{NTR} et la sortiline (*Teng et al., 2005*). Les mécanismes exacts de la formation de ce complexe de récepteurs et les voies de signalisation activées sont actuellement à l'étude. Mais déjà des questions se posent sur ce nouveau mécanisme : on pourrait déduire des résultats précédents que la présence de sortiline et son association au récepteur p75^{NTR} conduit à l'apoptose induite par les pro-neurotrophines. Or dans certaines cellules, comme dans les cellules de mélanome A875, le pro-NGF induit la migration cellulaire plutôt que l'apoptose des cellules, alors qu'elles expriment en grandes quantités le récepteur p75^{NTR} et la sortiline (*Shonukan et al., 2003*). De plus, la sortiline, comme le récepteur NogoR, appartient à des familles de protéines qui comptent plusieurs membres tous exprimés par exemple dans le système nerveux (*Lauren et al., 2003 ; Pignot et al., 2003*), suggérant que d'autres complexes pourraient

être formés avec le récepteur p75^{NTR}. Enfin, les sites d'interactions de la sortiline permettant la liaison des pro-neurotrophines peuvent lier d'autres ligands comme la protéine RAP (« *Receptor-associated protein* »), une protéine chaperone des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (« *Low density lipoprotein Receptor-related Protein* » ou LRP) (Munck Petersen et al., 1999), le neuropeptide neurotensine (Mazella, 2001) ou encore les protéines SAP (« *Sphingolipid activator protein* ») (Lefrancois et al., 2003). Ceci suggère de nombreuses possibilités d'interférences et de modulation de la liaison des pro-neurotrophines à la sortiline *in vivo* (Bronfman et Fainzilber, 2004).

2.2.7. Internalisation, dégradation et recyclage du récepteur p75^{NTR}

Alors que l'internalisation et le transport rétrograde du NGF grâce au récepteur TrkA sont bien connus dans les neurones, peu d'études se sont intéressées au trafic intracellulaire du récepteur p75^{NTR}. Bronfman et collaborateurs ont montré que l'activation du récepteur p75^{NTR} par le NGF dans les cellules PC12 conduit à son internalisation, via des vésicules formées à partir de puits à clathrine (Bronfman et al., 2003). Cette internalisation est trois fois plus lente que l'internalisation du récepteur TrkA dans ces mêmes cellules, et conduit à la formation d'endosomes précoces. Ces endosomes ne s'acidifient pas et ne conduisent pas à la dégradation protéolytique des récepteurs p75^{NTR} par fusion avec des lysosomes, mais s'accumulent et se transforment en endosomes de recyclage pour réexprimer ces récepteurs à la surface des cellules PC12 (Bronfman et al., 2003). Enfin, l'internalisation du récepteur p75^{NTR} induit le recrutement des protéines adaptatrices MAGE et NRAGE au niveau de l'endosome, suggérant, comme pour le récepteur TrkA, la formation d'endosomes de signalisation, mais spatialement et temporellement différents des endosomes de signalisation contenant le récepteur TrkA (Bronfman et al., 2003). La vitesse d'internalisation plus lente du récepteur p75^{NTR} par rapport au récepteur TrkA, et l'implication d'un mécanisme clathrine-dépendant dans l'internalisation du récepteur p75^{NTR} ont été confirmés par une autre étude dans les mêmes cellules PC12 (Saxena et al., 2004). Cette nouvelle étude montre que le récepteur p75^{NTR} induit une internalisation beaucoup plus rapide et efficace du BDNF et de la NT-3 par rapport au NGF, suggérant soit une affinité différente des neurotrophines pour le récepteur p75^{NTR} exprimé sur ces cellules, conduisant à une différence d'internalisation, soit un mécanisme d'internalisation s'adaptant en fonction de la neurotrophine activant le récepteur p75^{NTR} (Saxena et al., 2004).

3. EXPRESSION DU NGF DANS LES VOIES AERIENNES

3.1. Sources cellulaires de NGF

Le NGF a été extrait au départ de glandes sous-maxillaires de souris, de sarcomes murins ou encore du venin de serpent (*Levi-Montalcini et al., 1995*). Depuis, la synthèse de NGF a été montrée dans de très nombreux types cellulaires. Dans les voies aériennes, les cellules structurales, mais aussi les cellules inflammatoires infiltrées dans la muqueuse bronchique synthétisent du NGF (Figure 17).

3.1.1. Etudes in vitro

3.1.1.1. Cellules inflammatoires

La synthèse de NGF par les cellules inflammatoires *in vitro* est connue depuis les années 1990. Cette synthèse a d'abord été mise en évidence dans les lymphocytes T (*Ehrhard et al., 1993 ; Santambrogio et al., 1994 ; Lambiase et al., 1997*), qu'ils soient de phénotype Th1 (libérant l'INF γ et l'IL-2), Th2 (libérant l'IL-4 et l'IL-13), ou Th3-T_{Reg} (libérant le TGF- β et l'IL-10) (*Moalem et al., 2000*). Cette synthèse est plus importante dans les lymphocytes activés après reconnaissance d'un antigène (*Edling et al., 2004 ; Oren et al., 2004*). La synthèse de NGF a été mise en évidence depuis dans les autres cellules inflammatoires, en particulier dans les lymphocytes B (*Torcia et al., 1996*), les mastocytes de rat (*Leon et al., 1994*) et humains (*Nilsson et al., 1997 ; Skaper et al., 2001*), les éosinophiles (*Solomon et al., 1998 ; Kobayashi et al., 2002*), et les macrophages (*Ricci et al., 2000 ; Barouch et al., 2001*).

3.1.1.2. Cellules structurales des voies aériennes

La synthèse de NGF par les cellules structurales des voies aériennes a été montrée plus récemment dans notre laboratoire. Les cellules épithéliales bronchiques humaines (*Fox et al., 2001 ; Pons et al., 2001*) [Publication N°1] ou de souris (*Hahn et al., 2006*), les fibroblastes pulmonaires humains (*Olgart et Frossard, 2001 ; Antonelli et al., 2005*) et les cellules musculaires lisses

Expression du NGF dans les voies aériennes

bronchiques humaines (*Freund et al., 2002 ; Kemi et al., 2006*) [*Publication N°2*] en culture expriment le NGF *in vitro* (Tableau 1). L'ARNm du NGF a été mesuré par réaction de polymérisation en chaîne quantitative par fluorescence (Q-PCR) (par exemple 15 fg d'ADN complémentaire (ADNc) de NGF / pg ADNc de glycéraldéhyde 3-phosphate deshydrogenase (GAPDH) dans les cellules musculaires lisses bronchiques) (*Freund et al., 2002*) [*Publication N°2*]. L'étude de la protéine du NGF par technique ELISA (« *Enzyme-linked immunosorbent assay* ») montre une quantité de NGF synthétisé par les trois types cellulaires de l'ordre de 12 à 22 pg NGF/mL de surnageant de culture (*Fox et al., 2001 ; Olgart et Frossard, 2001 ; Pons et al., 2001 ; Freund et al., 2002*) [*Publications N°1 et N°2*]

Ces résultats rejoignent d'autres études qui mettent en évidence une libération de NGF par des types cellulaires d'autres origines que les voies aériennes. C'est le cas par exemple d'une lignée de fibroblastes cutanés humains (*Murase et al., 1992*), de cellules épithéliales humaines intestinales (*Varilek et al., 1995*) ou rétiniennes (*Ishida et al., 1997 ; Lambert et al., 2001*), de cellules musculaires lisses vasculaires humaines (*Ueyama et al., 1993 ; Donovan et al., 1995 ; Nemoto et al., 1998*) ou vésicales (*Tanner et al., 2000*), ou encore de cellules structurales du système reproducteur humain, comme les ovocytes chez la femme (*Abir et al., 2005*) ou les cellules de Leydig chez l'homme (*Muller et al., 2006*). Les cellules structurales sont également capables de synthétiser les autres neurotrophines : c'est le cas par exemple des cellules musculaires lisses d'aorte thoracique de rat qui expriment le BDNF et la NT-3 (*Nemoto et al., 1998*), des cellules endothéliales humaines (*Nakahashi et al., 2000*) et des kératinocytes humains (*Grewe et al., 2000*) qui expriment la NT-4/5, ou encore des hépatocytes de rat qui expriment le BDNF et les NT-3 et -4/5 (*Cassiman et al., 2001*).

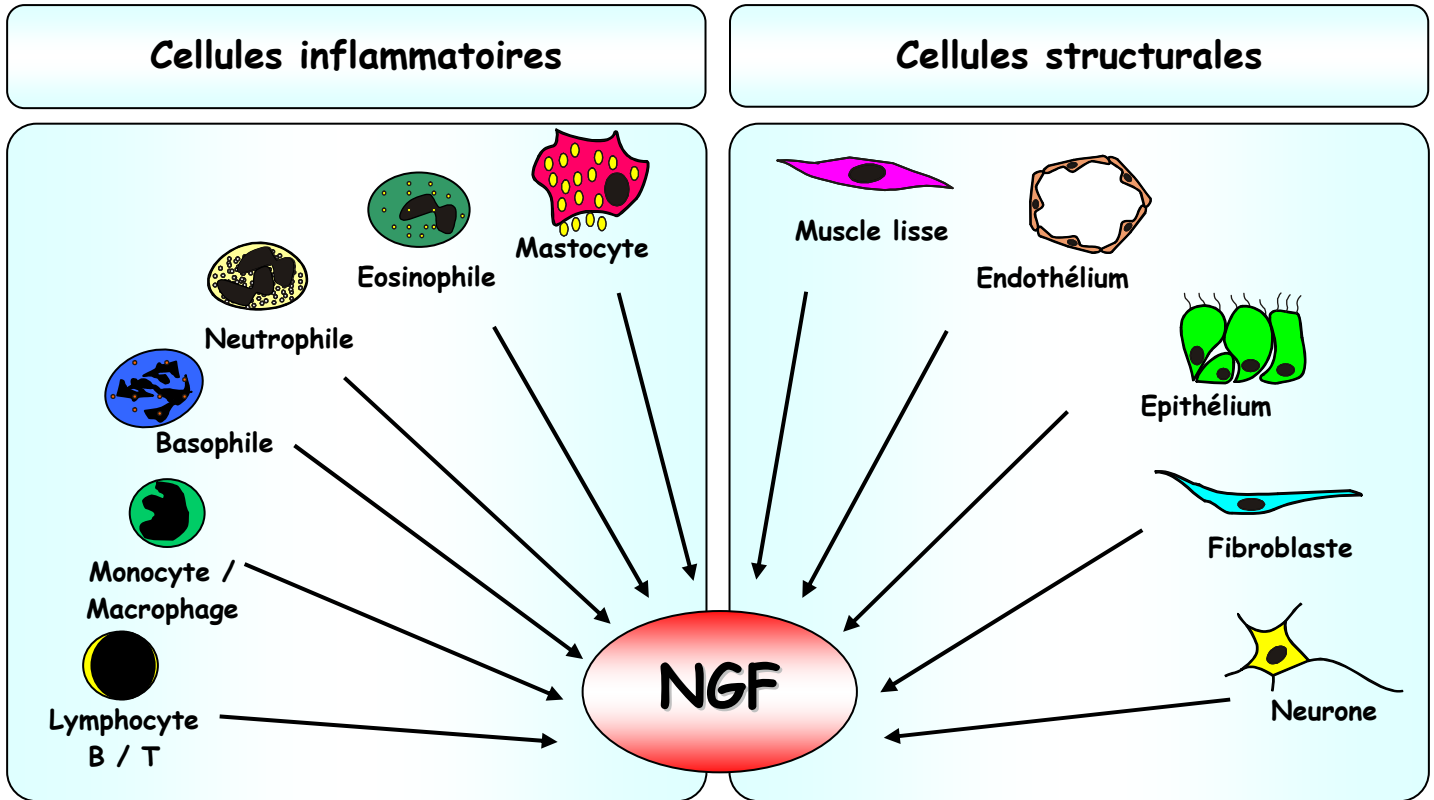


Figure 17. Sources de NGF dans les voies aériennes

Le NGF est exprimé dans les voies aériennes par les cellules structurales, mais également par les cellules inflammatoires infiltrées dans la muqueuse bronchique.

3.1.2. Etudes *in vivo*

Un immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-NGF humain sur des coupes de biopsies bronchiques de patients non asthmatiques montre un marquage des fibroblastes, des cellules épithéliales et musculaires lisses bronchiques (Figure 18) (*Kassel et al., 2001 ; Olgart Höglund et al., 2002 ; Ricci et al., 2004*). Ce résultat est en accord avec les études *in vitro* menées sur les cellules humaines des voies aériennes en culture (voir paragraphe 3.1.1.2.), et également en accord avec une étude menée *in vivo* chez la souris, montrant une expression constitutive du NGF dans l'épithélium bronchique (*Hahn et al., 2006*).

Un immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-NGF humain sur des coupes de biopsies bronchiques provenant de patients asthmatiques montre un marquage des cellules inflammatoires infiltrées (Figure 18) (*Kassel et al., 2001 ; Olgart Höglund et al., 2002*). De plus, des études *in vivo* dans un modèle murin d'asthme (*Braun et al., 1998*) ou chez des patients asthmatiques montrent l'expression du NGF par les cellules inflammatoires présentes dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire, en particulier par les éosinophiles (*Nassenstein et al., 2003 ; Noga et al., 2003*) ou par les monocytes isolés du sang périphérique de patients allergiques (*Rost et al., 2005*). Ainsi ces études *in vivo* confirment la sécrétion de NGF par les cellules structurales des voies aériennes, ainsi que par les cellules inflammatoires infiltrées dans la muqueuse bronchique en conditions inflammatoires.

3.2. Régulation de la synthèse de NGF dans les voies aériennes

Des études menées *in vitro* permettent d'envisager plusieurs mécanismes de régulation de la synthèse de NGF dans les voies aériennes, et certains de ces mécanismes ont été récemment mis en évidence *in vivo*.

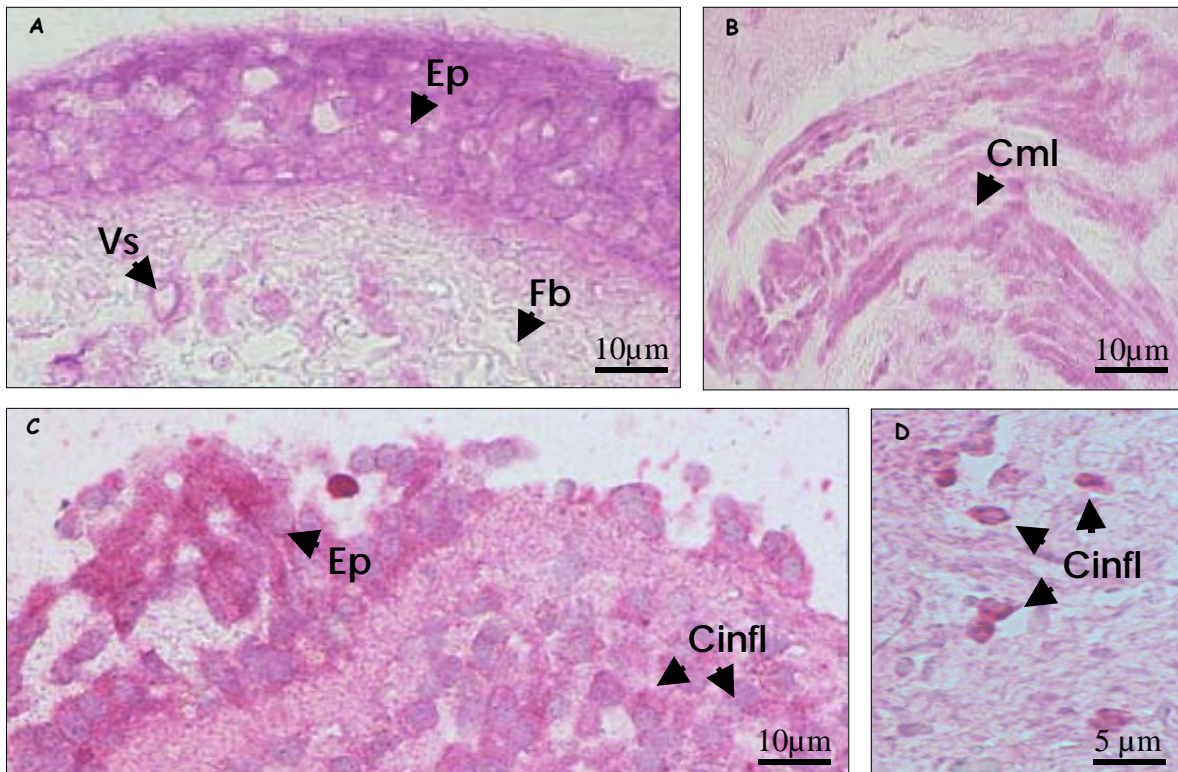


Figure 18. Immunomarquage du NGF sur des coupes de biopsies bronchiques de sujets contrôles non asthmatiques (A,B) et de patients asthmatiques (C,D)

L'immunomarquage réalisé à l'aide d'un anticorps anti-NGF humain montre un marquage intense de l'épithélium bronchique (Ep) et du muscle lisse bronchique (Cml) des sujets contrôles et des sujets asthmatiques. Une expression du NGF, bien que moins intense, est également mise en évidence dans les fibroblastes (Fb) et les vaisseaux sanguins (Vs). Le NGF est également exprimé dans les cellules inflammatoires (Cinfl) infiltrées dans la muqueuse bronchique des patients asthmatiques.

3.2.1. Régulation de la synthèse de NGF en fonction de la densité cellulaire

Des études *in vitro* sur cellules humaines des voies aériennes, en prolifération ou quiescentes, montrent qu'il existe une régulation de la synthèse du NGF en fonction de la densité cellulaire. En effet, les fibroblastes pulmonaires (*Olgart et Frossard, 2001*) et les cellules musculaires lisses bronchiques (*Freund et al., données non publiées*) en culture libèrent du NGF en concentrations plus élevées dans le surnageant cellulaire en début de culture, lorsque les cellules sont dispersées et que les contacts cellulaires sont faibles ; ces concentrations diminuent ensuite progressivement quand le nombre de cellules augmente. Ces expériences suggèrent ainsi une régulation de la libération de NGF en fonction de la densité tissulaire. Ce phénomène a également été mis en évidence pour d'autres types cellulaires humains, comme les kératinocytes (*Di Marco et al., 1993*), les fibroblastes cutanés (*Murase et al., 1992*), les myoblastes (*Erck et al., 1998*) ou les cellules musculaires lisses vésicales (*Clemow et Tuttle, 1998*).

3.2.2. Augmentation de la synthèse de NGF en conditions inflammatoires

Une augmentation de la transcription du NGF a été mise en évidence dans les cellules neuronales et structurales en conditions inflammatoires (Voir paragraphe 1.3.1.4.1). Nous avons obtenu des résultats comparables dans les cellules structurales des voies aériennes en conditions inflammatoires.

Des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF α ou le TGF- β augmentent la synthèse de NGF par les cellules structurales des voies aériennes. Cette régulation a été montrée *in vitro* chez l'homme dans les fibroblastes pulmonaires (*Olgart et Frossard, 2001 ; Antonelli et al., 2005*), les cellules épithéliales A549 (*Fox et al., 2001 ; Pons et al., 2001*) [Publication N°1] et les cellules musculaires lisses bronchiques (*Freund et al., 2002 ; Kemi et al., 2006*) [Publication N°2] (Tableau 1). Des études montrent également une capacité des cytokines pro-inflammatoires à agir de manière synergique pour augmenter la sécrétion de NGF : le TNF α augmente par exemple la sécrétion de NGF induite par l'IL-4 dans les astrocytes (*Brodie et al., 1998*), ou par l'IL-1 β et l'INF γ dans les fibroblastes (*Hattori et al., 1994*).

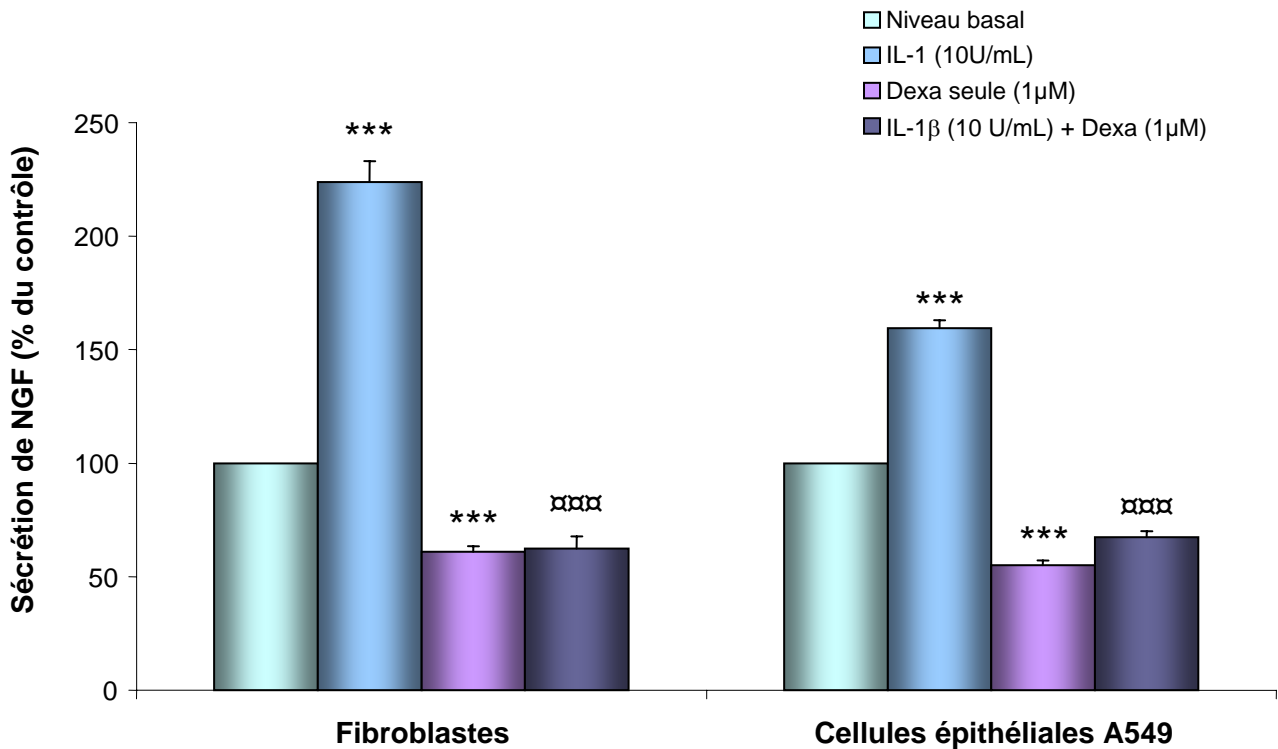


Figure 19. Effet de la dexaméthasone (1µM) sur l'expression constitutive de NGF et celle induite par l'IL-1β dans les fibroblastes pulmonaires et les cellules épithéliales A549 en culture.

La dexaméthasone diminue de manière significative l'expression constitutive de NGF dans les fibroblastes et les cellules épithéliales A549. De même, l'augmentation d'expression du NGF induite par l'IL-1β est diminuée de manière significative par la dexaméthasone à 1µM. Les concentrations de NGF ont été mesurées à l'aide d'une technique ELISA et sont exprimées en pourcentage par rapport au niveau basal de NGF. Les valeurs présentées sont les moyennes ± S.E.M. de n=8 pour les fibroblastes et n=4 expériences pour les cellules A549, réalisées respectivement en dupliqué et tripliqué. *** : p<0,001 en comparaison au niveau basal ; ααα : p<0,001 en comparaison à l'effet induit par l'IL-1β à 10U/ml.

L'augmentation de la synthèse de NGF en conditions inflammatoires dans les voies aériennes a également été démontrée *in vivo* : les concentrations de NGF sont augmentées dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire chez le patient asthmatique (*Virchow et al., 1998 ; Kassel et al., 2001 ; Olgart Höglund et al., 2002*). Une augmentation de la synthèse de NGF a été mise en évidence *in vivo* dans les cellules inflammatoires présentes dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire de patients asthmatiques, en particulier dans les éosinophiles (*Nassenstein et al., 2003 ; Noga et al., 2003*), ou dans les monocytes issus du sang périphérique de patients allergiques (*Rost et al., 2005*).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que les taux élevés de NGF mesurés dans les voies aériennes des patients asthmatiques pourraient avoir plusieurs origines cellulaires : d'une part les cellules structurales exprimant plus de NGF en conditions inflammatoires, et d'autre part les cellules inflammatoires infiltrées dans la muqueuse bronchique, exprimant le NGF de manière constitutive ou en quantités plus importantes.

3.2.3. Diminution de la synthèse de NGF en conditions anti-inflammatoires

Les glucocorticoïdes sont des médicaments anti-inflammatoires efficaces en particulier dans l'asthme. Plusieurs études ont montré une diminution de l'expression basale du NGF ainsi que de son expression induite en conditions inflammatoires après traitement par la dexaméthasone (Voir paragraphe 1.3.1.4.1.).

Notre équipe a montré un effet similaire dans les fibroblastes pulmonaires humains (*Olgart et Frossard, 2001*) et les cellules pulmonaires épithéliales A549 (*Pons et al., 2001*) [Publication N°1] en culture après stimulation par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α (Figure 19). Ces résultats sont en accord avec des données obtenues *in vivo*, montrant une diminution des taux circulants de NGF chez les patients asthmatiques traités par des glucocorticoïdes inhalés (*Noga et al., 2001*). Une étude plus récente a également montré que des éosinophiles isolés de patients allergiques produisent plus de NGF que les éosinophiles isolés de donneurs contrôles non allergiques, et que le traitement par la dexaméthasone entraîne une diminution significative des taux de NGF libérés par les éosinophiles de patients allergiques (*Noga et al., 2005*).

Cellules	Expression constitutive de NGF (pg/mL \pm SEM)	Expression de NGF (pg/mL \pm SEM) induite par l'IL-1 β (10U/mL)	Significativité
Cellules épithéliales A549	12,6 \pm 2,0	20,1 \pm 3,5	p<0,001
Fibroblastes pulmonaires	14,3 \pm 3,2	32,0 \pm 4,5	p<0,001
Cellules musculaires lisses bronchiques	21,4 \pm 7,8	43,5 \pm 4,8	p<0,05

Tableau 1. Expressions constitutive et induite en conditions inflammatoires du NGF par les cellules structurales des voies aériennes *in vitro*

Après 24h de mise en quiescence dans un milieu appauvri en sérum de veau fœtal, les cellules épithéliales expriment le NGF de manière constitutive, de même que les fibroblastes pulmonaires et les cellules musculaires lisses bronchiques. Cette expression est augmentée de manière significative après traitement des cellules par la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β . Les concentrations de NGF ont été mesurées à l'aide d'une technique ELISA et sont exprimées en pg/mL de surnageant de culture. Pour les cellules A549, les fibroblastes pulmonaires et les cellules musculaires lisses bronchiques, les données présentées sont les moyennes \pm S.E.M. de respectivement n=12, 8 et 6 expériences réalisées en dupliqué sur des cellules provenant de 4 à 6 donneurs différents.

Expression du NGF dans les voies aériennes

Ainsi, ces résultats suggèrent que les glucocorticoïdes inhibent la sécrétion de NGF induite en conditions inflammatoires, et que les cellules structurales des voies aériennes, de même que les cellules inflammatoires infiltrées dans la muqueuse bronchique, pourraient être des cibles de l'action anti-inflammatoire des glucocorticoïdes.

4. EFFET DU NGF DANS LES VOIES AERIENNES

Le NGF est bien connu pour son rôle dans la croissance et la survie des nerfs. Il joue le même rôle sur l'innervation dans les voies aériennes, en particulier sur les neurones du système sensitif. Mais le NGF est également un facteur de croissance pour les cellules inflammatoires en contribuant à leur survie, leur attraction dans les voies aériennes et en activant ces cellules. Enfin, le NGF peut également induire des effets sur les cellules structurales des voies aériennes (Figure 20) (*Freund et Frossard, 2004 ; Frossard et al., 2004*).

4.1. Effet du NGF sur les cellules neuronales

Une importante hyperinnervation par des fibres sensibles a été mise en évidence dans les voies aériennes chez la souris transgénique surexprimant le NGF de manière tissu-spécifique au niveau pulmonaire (*Hoyle et al., 1998*). Ce résultat est en accord avec la capacité du NGF de stimuler le développement, la croissance et la survie neuronale, en particulier de l'innervation sensitive (*Thoenen et al., 1987 ; Levi-Montalcini et al., 1995*). Ces neurones expriment les récepteurs TrkA et p75^{NTR} (*Verge et al., 1989 ; Lee et al., 1992 ; Schatteman et al., 1993 ; Smeyne et al., 1994 ; Muragaki et al., 1995*). Le NGF stimule la synthèse et la libération de neuromédiateurs comme la substance P ou le CGRP (« *Calcitonin gene-related peptide* ») à partir des neurones sensitifs (*Lindsay et Harmar, 1989 ; Donnerer et al., 1992 ; Vedder et al., 1993 ; Udem et al., 1999 ; Hunter et al., 2000*). L'injection de NGF dans la paroi de la trachée chez le cobaye anesthésié induit une augmentation de l'expression de la substance P par les neurones sensitifs issus du ganglion jugulaire et innervant les voies aériennes ; de plus le NGF induit l'expression de substance P dans les neurones sensitifs issus du ganglion plexiforme qui ne l'expriment pas de manière constitutive (*Hunter et al., 2000*). Dans une étude récente chez la souris, l'administration de NGF dans les voies aériennes induit une augmentation de l'expression de substance P, de son récepteur TRPV-1 (« *Transient receptor potential vanilloid 1* ») et de l'expression du récepteur TrkA dans les neurones sensitifs de large diamètre innervant les voies aériennes (*Dinh et al., 2004*). L'ensemble de ces résultats montre le rôle majeur du NGF dans l'activité des neurones des voies aériennes, et en particulier de l'innervation sensitive.

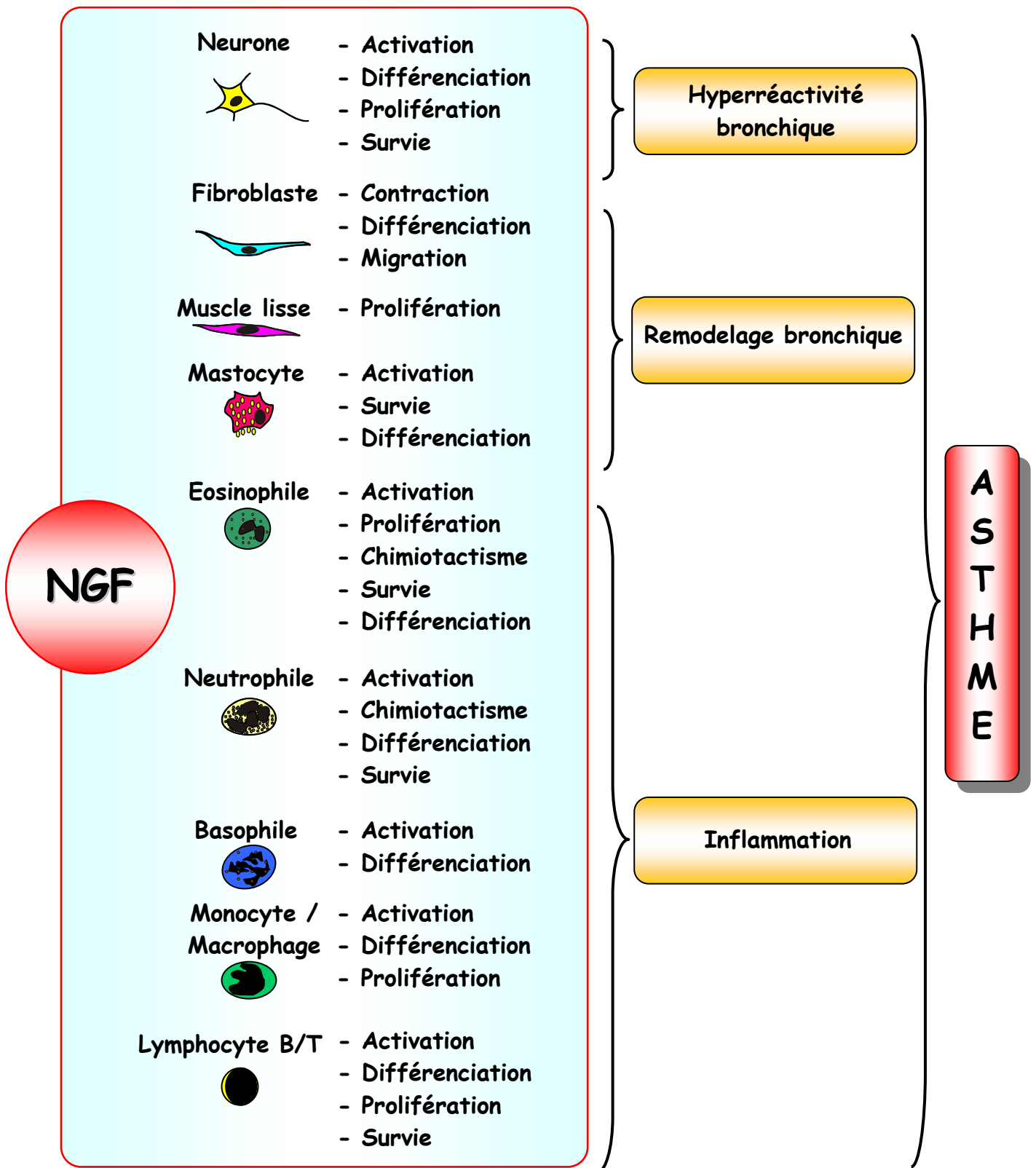


Figure 20. Effets du NGF sur les cellules inflammatoires et les cellules structurales des voies aériennes

Le NGF est un facteur jouant un rôle essentiel dans la croissance et la survie des neurones, mais joue également le rôle de facteur de croissance pour les cellules inflammatoires. De plus, le NGF stimule différents types de cellules structurales des voies aériennes. L'ensemble de ses effets confère au NGF un rôle de médiateur inflammatoire qui contribue à l'inflammation, l'hyperréactivité et le remodelage bronchiques existant dans l'asthme.

4.2. Effet du NGF sur les cellules inflammatoires

4.2.1. Effet sur les mastocytes

4.2.1.1. Effets *in vitro*

Les mastocytes ont été les premières cellules décrites comme des cibles non nerveuses du NGF. Ces cellules expriment les récepteurs TrkA (*Aloe et al., 1997 ; Tam et al., 1997*). L'expression des récepteurs p75^{NTR} reste controversée, puisqu'elle n'a pas été mise en évidence dans les mastocytes de rat ou humains, alors que les mastocytes de souris cultivés en présence d'IL-3 expriment les transcrits codant pour ce récepteur (*Tam et al., 1997*). Ce travail semble donc suggérer que l'expression du récepteur p75^{NTR} dépend des conditions de préparation, de culture cellulaire, et de l'espèce considérée (*Tam et al., 1997*). L'étude de Leon et collaborateurs a montré en 1994 que les mastocytes de rat synthétisent, stockent et libèrent du NGF (*Leon et al., 1994*). Ces résultats suggèrent que le NGF pourrait agir de façon autocrine sur ces cellules (*Leon et al., 1994*). Les effets du NGF sur les mastocytes *in vitro* sont multiples (Figure 20). Le NGF stimule la différenciation et la survie des mastocytes (*Aloe et De Simone, 1989 ; Matsuda et al., 1991 ; Horigome et al., 1994 ; Kawamoto et al., 1995 ; Bullock et Johnson, 1996 ; Kanbe et al., 2000*), et induit par lui-même la libération de médiateurs à partir des mastocytes (*Bruni et al., 1982 ; Sugiyama et al., 1985 ; Pearce et Thompson, 1986 ; Bullock et Johnson, 1996 ; Murakami et al., 1997 ; Tal et Liberman, 1997 ; Kawamoto et al., 2002 ; Stempelj et al., 2003 ; Groneberg et al., 2005 ; Stempelj et Ferjan, 2005*).

4.2.1.2. Effets *in vivo*

Le premier lien entre les mastocytes et le NGF dans les voies aériennes *in vivo* a été établi dans notre laboratoire par Kassel et collaborateurs (*Kassel et al., 2001*). Cette étude a clairement démontré que les mastocytes infiltrés dans la muqueuse bronchique expriment le récepteur TrkA. De plus, une provocation allergénique à faibles doses chez des patients asthmatiques induit une

augmentation du nombre de mastocytes infiltrés, accompagnée par une augmentation des taux de NGF dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire de ces patients (*Kassel et al., 2001*).

Une étude plus récente s'est intéressée au rôle du NGF dans l'inflammation dans un modèle murin d'asthme chez des souris sauvages et des souris surexprimant le NGF de manière tissu-spécifique dans le poumon (*Path et al., 2002*). Le taux de sérotonine mesuré dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire après provocation allergénique a été utilisé comme marqueur de la dégranulation des mastocytes : une augmentation significative des taux de sérotonine a été mesurée chez les souris transgéniques, suggérant un rôle du NGF dans la dégranulation des mastocytes *in vivo* (*Path et al., 2002*).

4.2.2. Effet sur les lymphocytes

4.2.2.1. Effets *in vitro*

L'analyse par RT-PCR du contenu en ARNm des lymphocytes T CD₄⁺ a montré une absence d'expression du récepteur p75^{NTR} par ces cellules, qu'elles soient activées ou non (*Ehrhard et al., 1993*). L'expression du récepteur TrkA dépend du profil Th1 / Th2 des lymphocytes T : seuls les lymphocytes Th2 expriment le récepteur TrkA (*Ehrhard et al., 1993 ; Lambiase et al., 1997*). Les lymphocytes de profil Th1 et Th2 sécrètent du NGF, mais cette sécrétion est potentialisée après stimulation par la phytohématoglutinine seulement chez les lymphocytes de type Th2. Ainsi, ces résultats semblent impliquer le NGF et son récepteur TrkA dans la réponse d'origine Th2 impliquée dans le développement des symptômes asthmatiques. Quant aux lymphocytes B, ils expriment les récepteurs p75^{NTR} et TrkA de manière constitutive (*Torcia et al., 1996*). De nombreuses études ont montré une synthèse de NGF par les lymphocytes T et B (*Ehrhard et al., 1993 ; Santambrogio et al., 1994 ; Torcia et al., 1996 ; Lambiase et al., 1997*), suggérant une action autocrine du NGF sur ces cellules.

Les effets du NGF sur les lymphocytes sont nombreux (Figure 20). Le NGF induit la différenciation et la prolifération des lymphocytes Th2 (*Thorpe et Perez-Polo, 1987 ; Otten et al., 1989 ; Brodie et Gelfand, 1992 ; Santambrogio et al., 1994 ; Kronfeld et al., 2002*). Le NGF module également la synthèse lymphocyte Th2-dépendante d'anticorps (*Manning et al., 1985*), et

active ces cellules, notamment en modulant l'expression du récepteur de l'IL-2 (*Thorpe et al., 1987*), en activant le facteur de transcription c-fos (*Ehrhard et al., 1994*), et en augmentant la synthèse d'IL-4, d'IL-10 et de CGRP (*Bracci-Laudiero et al., 2002 ; Bayas et al., 2003*).

Le NGF stimule également la différenciation et la prolifération des lymphocytes B, de même que la synthèse d'immunoglobulines par les lymphocytes B, en particulier de type IgM, IgA et IgG₄ (*Otten et al., 1989 ; Kimata et al., 1991a ; Kimata et al., 1991b*). Le NGF participe également à la survie des lymphocytes B mémoires (*Torcia et al., 1996*), en particulier via l'activation de la MAPK p38 et de l'activation du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (*Torcia et al., 1996 ; Torcia et al., 2001 ; Rosini et al., 2004*).

4.2.2.2. Effets *in vivo*

Différentes études *in vivo* indiquent clairement que le NGF participe au développement et à la persistance de l'inflammation des voies aériennes. Mais alors que le NGF augmente le nombre d'éosinophiles infiltrés dans la muqueuse bronchique dans un modèle murin d'asthme (Voir paragraphe 4.2.3.2.), le nombre de lymphocytes T ainsi que leur profil ne sont pas modifiés (*Braun et al., 1998 ; Path et al., 2002*). Au contraire, une augmentation significative du nombre de lymphocytes, de macrophages et de neutrophiles a été mise en évidence en même temps qu'une augmentation du nombre d'éosinophiles après sensibilisation et provocation allergénique chez la souris transgénique surexprimant de manière tissu-spécifique le NGF dans le poumon, en comparaison au même traitement chez des souris sauvages (*Quarcoo et al., 2004*). Ces résultats controversés nécessitent des études plus approfondies pour déterminer le rôle réel du NGF sur les lymphocytes T et B *in vivo*.

4.2.3. Effet sur les éosinophiles

4.2.3.1. Effets *in vitro*

Noga et collaborateurs ont montré l'expression du récepteur TrkA sur des éosinophiles issus du liquide de lavage bronchoalvéolaire de patients asthmatiques ou souffrant de rhinite allergique ;

les taux d'ARNm et de protéine du récepteur TrkA étaient variables d'un patient à l'autre (Noga *et al.*, 2002). Une autre étude a montré l'expression des récepteurs TrkA et p75^{NTR} sur des éosinophiles activés présents dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire de patients asthmatiques après provocation allergénique, mais pas sur des éosinophiles non activés issus du sang périphérique (Nassenstein *et al.*, 2003). Ceci suggère que l'activation des éosinophiles pourrait induire l'expression des récepteurs du NGF et ainsi rendre ces cellules sensibles au NGF.

Le NGF est un facteur chimiotactique pour les éosinophiles (Figure 20), et active également ces cellules en induisant la libération de médiateurs inflammatoires comme l'EPO (« *Eosinophil peroxidase* ») ou l'IL-4 (Hamada *et al.*, 1996 ; Solomon *et al.*, 1998 ; Noga *et al.*, 2002 ; Nassenstein *et al.*, 2003). Le NGF induit également la survie des éosinophiles (Nassenstein *et al.*, 2003 ; Hahn *et al.*, 2006). De plus, le NGF stimule la croissance des précurseurs des granulocytes d'origine humaine présents dans le sang et induit leur différenciation en éosinophiles notamment (Matsuda *et al.*, 1988). Cette différenciation peut être stimulée par le NGF de manière synergique avec d'autres cytokines, en particulier le GM-CSF (« *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* ») (Tsuda *et al.*, 1991), l'IL-1 et l'IL-3 (Chevalier *et al.*, 1994), ou encore le SCF (Auffray *et al.*, 1996).

4.2.3.2. Effets *in vivo*

L'accumulation d'éosinophiles activés dans les voies aériennes est caractéristique de l'asthme allergique. Une première étude réalisée *in vivo* a montré une association entre les taux élevés de neurotrophines dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire de patients asthmatiques après provocation allergénique, le taux de NGF en particulier, et le degré d'infiltration des éosinophiles dans la muqueuse bronchique (Virchow *et al.*, 1998). Ces données ont été confirmées dans un modèle murin d'asthme où l'augmentation du nombre d'éosinophiles dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire après provocation allergénique est accompagnée d'une augmentation des taux de neurotrophines (Braun *et al.*, 1998 ; Braun *et al.*, 1999). Le rôle fonctionnel du NGF sur les éosinophiles a ensuite été démontré dans un modèle murin d'asthme en utilisant des souris surexprimant le NGF de manière tissu-spécifique dans le poumon : le nombre d'éosinophiles dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire après provocation allergénique est plus élevé chez les souris transgéniques que chez les souris sauvages (Path *et al.*, 2002). Un pré-traitement par un anticorps

bloquant le NGF avant la provocation allergénique chez les souris sauvages entraîne au contraire une diminution du nombre d'éosinophiles dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (*Path et al., 2002*). Enfin, le pré-traitement par un antagoniste des neurokinines réduit significativement le nombre d'éosinophiles dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire après provocation allergénique chez les souris transgéniques surexprimant le NGF (*Quarcoo et al., 2004*). Ainsi, le NGF semble participer au recrutement des éosinophiles dans les voies aériennes *in vivo*, et cet effet pourrait impliquer des neuropeptides.

4.2.4. Effet sur les monocytes / macrophages

L'analyse par RT-PCR de l'expression des récepteurs TrkA et p75^{NTR} montre que ces cellules expriment le récepteur TrkA mais pas le récepteur p75^{NTR}. Les monocytes expriment le récepteur TrkA qui est fonctionnel, mais durant la différenciation en macrophages, cette expression diminue (*Otten et al., 1994*). Des analyses par RT-PCR et immunohistochimie ont montré une capacité des macrophages à synthétiser du NGF (*Braun et al., 1998 ; Ricci et al., 2000 ; Nassenstein et al., 2003 ; Ricci et al., 2004*), suggérant une possibilité d'action autocrine pour le NGF sur ces cellules.

Le NGF induit la prolifération des monocytes (*la Sala et al., 2000*), et active les macrophages lors de processus inflammatoires et immunitaires, notamment en stimulant leurs propriétés de phagocytose et leurs propriétés bactéricides (*Susaki et al., 1996 ; Barouch et al., 2001*) (Figure 20). Le NGF induit également la libération de médiateurs à partir des monocytes, en particulier l'IL-1, le CGRP ou l'IL-10 (*Barouch et al., 2001 ; Bracci-Laudiero et al., 2005*).

4.2.5. Effet sur les basophiles

Les basophiles expriment les récepteurs p75^{NTR} et TrkA du NGF (*Burgi et al., 1996*). Le NGF induit la différenciation des basophiles (*Matsuda et al., 1988*), et active ces cellules en induisant notamment la libération d'histamine, d'IL-4 et d'IL-13 (*Bischoff et Dahinden, 1992 ; Heinemann et al., 2003 ; Gibbs et al., 2005*) (Figure 20). Cette activation induit la libération d'une quantité encore plus grande d'IL-13 à partir de basophiles issus de patients asthmatiques (*Sin et al., 2001*).

4.2.6. Effet sur les neutrophiles

Le NGF stimule la différenciation des neutrophiles (*Kannan et al., 1991*) (Figure 20). De plus, le NGF stimule la phagocytose et la production de radicaux libres oxygénés par les neutrophiles (*Kannan et al., 1991*). Le NGF est également impliqué dans le chimiotactisme et la viabilité des neutrophiles *in vitro* (*Gee et al., 1983 ; Kannan et al., 1992*) et *in vivo* (*Boyle et al., 1985*).

4.3. Effet du NGF sur les cellules structurales des voies aériennes

Les effets du NGF sur les cellules structurales des voies aériennes n'ont pas été décrits de manière approfondie, mais quelques études récentes suggèrent une possible stimulation de différentes cellules structurales des voies aériennes par le NGF (Figure 20).

Le NGF stimule *in vitro* la contraction et la migration des fibroblastes pulmonaires humains, de même que leur différenciation en myofibroblastes (*Micera et al., 2001 ; Kohyama et al., 2002*). Les fibroblastes pulmonaires humains expriment le récepteur TrkA de manière constitutive, et le récepteur p75^{NTR} seulement après traitement par le NGF (*Micera et al., 2001*). Les effets du NGF pourraient, comme cela a été montré dans des fibroblastes conjonctifs, impliquer la libération de TGF- β (*Micera et al., 2005*). Enfin, nous avons montré récemment que le NGF induit la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques humaines (*Freund-Michel et al., 2006*) [*Publication N°3*], par l'intermédiaire de son récepteur TrkA.

L'ensemble de ces résultats suggère que le NGF, en activant les cellules structurales des voies aériennes, pourrait contribuer au remodelage bronchique existant dans les voies aériennes des patients asthmatiques (Voir paragraphe 6.4.2.).

5. ROLE DU NGF DANS L'ASTHME

5.1. Expression et libération de NGF dans l'asthme

Des taux sériques plus élevés de NGF ont été observés dans les maladies allergiques et inflammatoires et cette augmentation a notamment pu être mise en parallèle avec la sévérité de la maladie asthmatique (*Bonini et al., 1996*). Le sérum des patients asthmatiques présente des taux plus importants de NGF par rapport à ceux des sujets contrôles non-asthmatiques (*Bonini et al., 1996*); cette augmentation a également été mise en évidence dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (*Kassel et al., 2001 ; Olgart Hoglund et al., 2002*), suggérant une régulation locale de la sécrétion de NGF dans l'asthme (Figure 21).

L'augmentation des taux de NGF observée est encore plus importante après provocation allergénique segmentaire (*Virchow et al., 1998*) ou après provocation bronchique à l'allergène à faibles doses (*Kassel et al., 2001*). Ces résultats sont comparables aux résultats observés dans les voies aériennes nasales, dans lesquelles les taux de NGF sont supérieurs dans le liquide de lavage nasal des patients souffrant d'une rhinite allergique en comparaison à des sujets sains contrôles (*Sanico et al., 2000*). Ici aussi, l'augmentation est encore plus importante après provocation allergénique nasale (*Sanico et al., 2000*). Les taux de NGF sont également augmentés dans le liquide de lavage nasal après inhalation de diisocyanate de toluène, un polluant dont l'inhalation induit une irritation nasale et une rhinite (*Wilfong et Dey, 2004*).

5.2. NGF, innervation et hyperréactivité bronchique

Plusieurs études récentes suggèrent une implication du NGF dans l'hyperréactivité bronchique. Tout d'abord, Braun et collaborateurs ont montré en 1998 que des anticorps bloquants du NGF abolissent l'hyperréactivité bronchique observée après sensibilisation et provocation allergénique chez la souris (*Braun et al., 1998*).

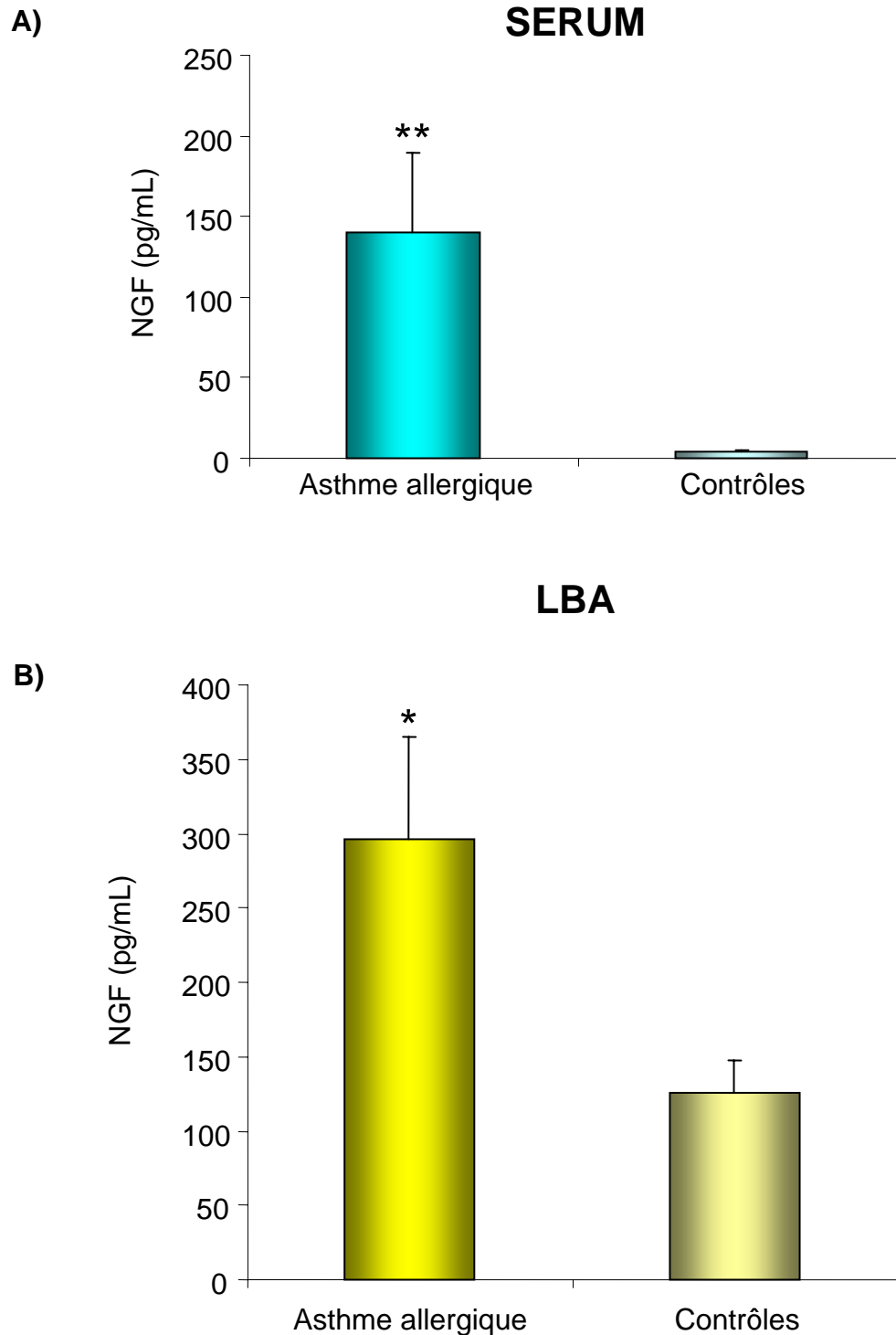


Figure 21. Expression du NGF dans l'asthme

A. Augmentation des taux de NGF dans le sérum des patients asthmatiques par rapport aux sujets contrôles non asthmatiques. L'expérience a été réalisée chez 13 patients asthmatiques et 18 sujets contrôles (D'après Bonini et al., 1996). B. Augmentation des taux de NGF dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LBA) des patients asthmatiques par rapport aux sujets contrôles non asthmatiques. L'expérience a été réalisée chez 14 patients asthmatiques et 7 sujets contrôles non asthmatiques (D'après Olgart-Höglund et al., 2002). Tous les résultats sont exprimés en pg/mL de sérum (A) ou de liquide de lavage bronchoalvéolaire (B) et sont représentés en moyenne \pm S.E.M.

De plus, il a été montré que les souris transgéniques surexprimant le NGF de manière tissu-spécifique dans le poumon présentent une bronchoconstriction plus grande à la capsaïcine que les souris sauvages (Hoyle *et al.*, 1998). D'autre part, un pré-traitement par le NGF induit par lui-même une hyperréactivité bronchique : ceci est montré *in vivo* chez le cobaye (de Vries *et al.*, 1999 ; Friberg *et al.*, 2001) et *in vitro* sur des anneaux de trachée de cobaye (de Vries *et al.*, 2001) et de furet (Wu *et Dey*, 2006). Une étude récente a montré que le NGF induit également une hyperréactivité bronchique *in vitro* sur des anneaux de bronches humaines (Frossard *et al.*, 2005). Un antagoniste du récepteur NK1 de la substance P bloque l'hyperréactivité bronchique induite par un pré-traitement au NGF *in vivo* chez le cobaye (de Vries *et al.*, 1999), et *in vitro* sur des anneaux de trachée de furet (Wu *et Dey*, 2006), suggérant un rôle des tachykinines dans l'hyperréactivité bronchique. Un traitement préliminaire par des anticorps bloquants du NGF réduit également la bronchoconstriction induite *in vivo* chez le cobaye (De Vries *et al.*, 2002) et chez le rat (Glaab *et al.*, 2003) après provocation allergénique. Les souris déficientes en récepteur p75^{NTR} ou les souris pré-traitées à l'aide d'anticorps bloquants anti-p75^{NTR} ne présentent pas d'hyperréactivité bronchique après sensibilisation et provocation allergénique (Tokuoka *et al.*, 2001 ; Kerzel *et al.*, 2003). De plus, l'hyperréactivité bronchique à la métacholine obtenue chez des souris sensibilisées après inhalation de particules de diesel est bloquée par un pré-traitement par un anticorps bloquant du récepteur p75^{NTR} (Farraj *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent ainsi un rôle du récepteur p75^{NTR} dans l'hyperréactivité bronchique.

Le NGF augmente la sensibilité et l'excitabilité des neurones périphériques (Lewin *et al.*, 1993 ; Lewin *et Mendell*, 1994 ; Levi-Montalcini *et al.*, 1996 ; McMahon, 1996 ; Farraj *et al.*, 2006). De plus, des anticorps neutralisants du NGF (Woolf *et al.*, 1994) ou des protéines de fusion TrkA-IgG (McMahon, 1996) inhibent l'inflammation associée à une augmentation de l'expression de certains neuropeptides comme la substance P ou le CGRP, ainsi que l'apparition d'une hypersensibilité locale, comparable à l'hyperalgésie au niveau cutané. Une activation des nerfs sensitifs par le NGF dans les voies aériennes pourrait ainsi être l'un des mécanismes par lequel le NGF induirait une hyperréactivité bronchique (Jacoby, 2003 ; Kerzel *et al.*, 2003 ; Nassenstein *et al.*, 2006 ; Nockher *et Renz*, 2006). Les études sur les souris transgéniques surexprimant le NGF dans le poumon montrent une hyperinnervation de type sensitive (Hoyle *et al.*, 1998) ; les études réalisées sur les souris p75^{NTR}^{-/-} montrent également que la libération de substance P dans les voies aériennes est diminuée de moitié en comparaison avec les souris sauvages (Graham *et al.*, 2001).

Ces études suggèrent ainsi que le NGF, via l'activation de son récepteur p75^{NTR}, induit des modifications anatomiques et fonctionnelles du système nerveux sensitif, pouvant contribuer au développement de l'hyperréactivité bronchique. Enfin, une étude plus récente dans un modèle murin d'asthme a mis en évidence une augmentation de l'innervation cholinergique et une augmentation de l'activation de ces nerfs par le NGF, qui pourraient également contribuer à l'hyperréactivité bronchique (*Bachar et al., 2004*).

5.3. NGF et inflammation des voies aériennes

Dans un modèle murin d'asthme, des anticorps bloquants du NGF réduisent les taux des cytokines de type Th2 IL-4 et d'IL-5 dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (*Braun et al., 1998*). Ceci est important dans l'asthme car des réponses d'origine Th2 participent au développement des symptômes asthmatiques, et l'IL-4 est une cytokine essentielle à l'augmentation de sécrétion des IgE (*Snapper et al., 1988*). Une étude plus récente a également souligné le rôle important du NGF dans la phase aiguë de l'allergie. Le pré-traitement d'une souris sensibilisée par des anticorps bloquant le NGF inhibe totalement l'inflammation des voies aériennes après provocation allergénique (*Path et al., 2002*). De plus, l'utilisation des souris transgéniques surexprimant le NGF de manière tissu-spécifique dans le poumon met en évidence, après sensibilisation et provocation allergénique, une inflammation des voies aériennes plus importante que chez les souris de phénotype sauvage (*Path et al., 2002 ; Quarcoo et al., 2004*). De manière intéressante, cette augmentation est réduite après pré-traitement des souris par un antagoniste des récepteurs aux tachykinines, suggérant un rôle des neuropeptides du système sensitif dans cette inflammation (*Quarcoo et al., 2004*). Le blocage du récepteur p75^{NTR} *in vivo* chez la souris à l'aide d'un anticorps bloquant anti-p75^{NTR}, ainsi que les études chez une souris dont le gène du récepteur p75^{NTR} a été invalidé (p75^{NTR}^{-/-}) ont montré récemment un rôle de ce récepteur p75^{NTR} dans l'inflammation des voies aériennes (*Tokuoka et al., 2001 ; Kerzel et al., 2003*). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle fonctionnel du NGF dans les processus allergiques et l'inflammation bronchique dans l'asthme.

5.4. NGF et remodelage bronchique

5.4.1. Le remodelage bronchique dans l'asthme

Les cellules structurales des voies aériennes, ainsi que les cellules inflammatoires infiltrées dans la muqueuse bronchique libèrent des chimiokines et des facteurs de croissance conduisant au remodelage bronchique dans les voies aériennes du patient asthmatique (*Chiappara et al., 2001 ; Wilson et Bamford, 2001*). On observe une fibrose sous-épithéliale constituée d'une prolifération des fibroblastes accompagnée d'un épaissement de la membrane basale (*Roche et al., 1989 ; Wilson et Li, 1997*), une augmentation de la vascularisation (*Carroll et al., 1997 ; Li et Wilson, 1997*), une augmentation de l'innervation sensitive (*Ollerenshaw et al., 1991*), un œdème (*Brown et al., 1995*), de même qu'une hyperplasie et une hypertrophie du muscle lisse bronchique (*Ebina et al., 1993 ; Stewart, 2001*).

5.4.2. Rôle potentiel du NGF dans le remodelage bronchique

Plusieurs études récentes suggèrent un rôle du NGF dans le remodelage bronchique existant dans les voies aériennes du patient asthmatique.

Tout d'abord, le NGF stimule la contraction et la migration des fibroblastes pulmonaires, ainsi que leur différenciation en myofibroblastes (*Micera et al., 2001 ; Kohyama et al., 2002*). De plus, le NGF stimule la libération de facteurs pro-fibrotiques comme le TGF- β (*Cosgaya et Aranda, 1995*) ou le bFGF (*Chevet et al., 1999*). Le NGF stimule également la libération de cytokines impliquées dans les mécanismes de remodelage bronchique, l'IL-4 à partir des éosinophiles (*Noga et al., 2002*) ou l'IL-13 à partir des basophiles (*Sin et al., 2001*). Le NGF stimule les fibroblastes dans les ulcères de cornée et favorise la réparation tissulaire (*Lambiase et al., 1998 ; Lambiase et al., 2000*). Le NGF stimule la production de collagène de type I par les fibroblastes (*Nithya et al., 2003*), et augmente l'expression du PAI-I (« Plasminogen Activator Inhibitor-I »), un inhibiteur de l'activité protéolytique de la métalloprotéinase de matrice MMP-9 (*Takahashi et al., 2000*), suggérant ainsi un rôle du NGF dans l'augmentation de la synthèse de la matrice extra-cellulaire. Enfin, un marquage plus intense du NGF a été mis en évidence sur des coupes de biopsies bronchiques provenant de 2 patients souffrant de pneumopathie interstitielle fibrosante (*Micera et al., 2001*), ce qui pourrait suggérer une augmentation de l'expression du NGF

dans les maladies fibrosantes. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle du NGF dans la fibrose sous-épithéliale présente dans les voies aériennes du patient asthmatique. L'observation d'un épaississement de la couche sous-épithéliale dans les voies aériennes de la souris transgénique surexprimant le NGF dans le poumon contribue à cette hypothèse (Hoyle *et al.*, 1998).

Le NGF induit également *in vitro* la migration (Dolle *et al.*, 2005 ; Rahbek *et al.*, 2005) et la prolifération des cellules endothéliales (Raychaudhuri *et al.*, 2001 ; Cantarella *et al.*, 2002 ; Moser *et al.*, 2004). De plus, le NGF induit la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Kraemer *et al.*, 1999), ainsi que leur migration (Donovan *et al.*, 1995). Le NGF participe à l'angiogénèse en induisant la libération de facteurs pro-angiogéniques comme par exemple le VEGF (« *Vascular endothelial growth factor* ») (Calza *et al.*, 2001). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle du NGF dans la vascularisation accrue observée dans les voies aériennes des patients asthmatiques.

Le NGF induit une augmentation de l'innervation sensitive lors de sa surexpression dans les voies aériennes chez la souris (Hoyle *et al.*, 1998), et induit une modification phénotypique des neurones innervant la trachée chez le cobaye, en induisant l'expression de substance P dans des neurones qui ne l'expriment pas de manière constitutive (Hunter *et al.*, 2000). Enfin, le NGF induit une augmentation de l'expression de la substance P et de son récepteur TRPV-1 dans les voies aériennes de souris (Dinh *et al.*, 2004). Ces modifications pourraient correspondre à l'augmentation de l'innervation sensitive décrite dans les voies aériennes du patient asthmatique (Ollerenshaw *et al.*, 1991).

Enfin, nous avons montré que le NGF stimule la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques (Freund-Michel *et al.*, 2006) [Publication N°3], suggérant un rôle du NGF dans l'hyperplasie du muscle lisse bronchique observée dans l'asthme.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Au moment où ce travail a débuté, le NGF commençait à être envisagé comme un médiateur de l'inflammation des voies aériennes, jouant un rôle particulièrement important dans l'asthme. Des taux plus élevés de NGF avaient été mis en évidence dans le sérum des patients asthmatiques par rapport à des sujets contrôles non asthmatiques (*Bonini et al., 1996*). Une augmentation similaire avait été mise en évidence dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire des patients asthmatiques, et cette augmentation était encore plus importante après provocation allergénique segmentaire (*Virchow et al., 1998*), ou après inhalation de faibles doses d'allergène de chat comme cela avait été montré au laboratoire (*Kassel et al., 2001*). Ces résultats suggéraient une libération locale de NGF dans les voies aériennes, mais les types cellulaires pouvant synthétiser du NGF dans les voies aériennes n'avaient pas encore été bien étudiés.

Nous avons voulu étudier les sources potentielles de NGF dans les voies aériennes, et nous nous sommes intéressés en particulier aux cellules structurales. En effet, il avait été montré au laboratoire que l'épithélium et le muscle lisse bronchiques, de même que les fibroblastes, étaient des sources potentielles de NGF *in vivo* dans les voies aériennes (*Kassel et al., 2001 ; Olgart Hoglund et al., 2002*). Nous avons étudié ces cellules *in vitro*, afin de confirmer leur capacité à synthétiser du NGF. Nous avons également étudié la régulation de cette synthèse de NGF en conditions pro- et anti-inflammatoires. Une étude précédente au laboratoire avait montré que les fibroblastes pulmonaires en culture primaire synthétisent du NGF, que cette synthèse est augmentée en conditions pro-inflammatoires, et diminuée en conditions anti-inflammatoires après pré-traitement par les glucocorticoïdes budésonide et dexaméthasone (*Olgart et Frossard, 2001*). Nous nous sommes intéressés aux cellules épithéliales A549 en culture (*Pons et al., 2001*) [**Publication N°1**] et aux cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture primaire (*Freund et al., 2002*) [**Publication N°2**].

Les taux de NGF étant augmentés dans les voies aériennes des patients asthmatiques, plusieurs études ont évalué le rôle que jouait le NGF dans cette maladie inflammatoire des voies aériennes dans des modèles animaux d'asthme. Ces études ont montré un rôle du NGF dans l'inflammation (*Braun et al., 1998 ; Path et al., 2002 ; Kerzel et al., 2003 ; Quarcoo et al., 2004*) et

l'hyperréactivité bronchique (*Braun et al., 1998 ; Hoyle et al., 1998 ; de Vries et al., 1999 ; de Vries et al., 2001 ; Tokuoka et al., 2001 ; De Vries et al., 2002 ; Glaab et al., 2003 ; Kerzel et al., 2003 ; Bachar et al., 2004 ; Frossard et al., 2005 ; Wu et Dey, 2006*) existant dans l'asthme. Peu d'études ont par contre recherché un rôle du NGF dans le remodelage bronchique observé dans l'asthme. Un rôle dans la fibrose a été proposé suite à des études sur les fibroblastes pulmonaires en culture primaire montrant une augmentation de la migration et de la différenciation de ces cellules en présence de NGF (*Micera et al., 2001 ; Kohyama et al., 2002*). Un rôle dans l'hyperinnervation sensitive des voies aériennes a également été proposé, suite à une hyperinnervation observée chez la souris transgénique surexprimant le NGF de manière tissu-spécifique dans les voies aériennes (*Hoyle et al., 1998*). Le NGF étant un facteur de croissance, nous avons étudié son effet prolifératif sur les cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture primaire (*Freund-Michel et al., 2006*) [Publication N°3].

Une activation du récepteur TrkA, le récepteur à haute affinité pour le NGF, conduit dans les cellules neuronales à son internalisation et son transport rétrograde le long de l'axone pour aller activer des voies de signalisation à distance de son lieu d'activation. Si ce transport rétrograde est spécifique des neurones, du fait de leur morphologie particulière, l'internalisation des récepteurs TrkA peut exister également dans les cellules structurales, permettant ainsi un contrôle de son expression à la surface de ces cellules. Cette modification d'expression pourrait jouer un rôle dans les voies aériennes, en particulier dans celles des patients asthmatiques où les taux élevés de NGF pourraient contribuer à une activation importante des récepteurs TrkA. Ayant montré la présence d'un récepteur TrkA fonctionnel sur les cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture primaire [Publication N°3], nous avons alors étudié les mécanismes d'internalisation, de dégradation et de resynthèse du récepteur TrkA exprimé sur ces cellules après activation par le NGF (*Freund-Michel et Frossard, en préparation*) [Publication N°4].

RESULTATS

Publication N°1

« Nerve growth factor secretion by human lung epithelial A549 cells in pro- and anti-inflammatory conditions »

*Françoise Pons, Véronique Freund, Hélène Kuissu, Eric Mathieu, Caroline Olgart
et Nelly Frossard*

European Journal of Pharmacology 2001 ; 428 : 365-369

Le facteur de croissance des nerfs ou NGF joue un rôle dans l'inflammation et l'hyperréactivité bronchique existant dans l'asthme, mais les cellules responsables de la synthèse de NGF, de même que la régulation de cette synthèse en conditions pro- et anti-inflammatoires ont été peu étudiées jusqu'à présent. Nous nous sommes intéressés à cette question en étudiant l'expression du NGF et la régulation de cette expression dans les cellules épithéliales humaines A549 en culture.

En conditions basales, les cellules A549 produisent du NGF, production mise en évidence par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps anti-NGF humain. Le NGF est libéré dans le surnageant de culture : cette sécrétion, mesurée à l'aide d'une technique ELISA après 24h de mise en quiescence dans un milieu appauvri en SVF, est de 12pg/ml de surnageant de culture. Le traitement pendant 24h des cellules par la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β (1-30U/ml) induit une augmentation de la sécrétion de NGF de manière concentration-dépendante, avec une augmentation maximale de près de 60% après traitement par l'IL-1 β à 10U/ml. Le traitement de 24h par un glucocorticoïde, la dexaméthasone (1 μ M) induit une réduction significative de près de 45% de la sécrétion basale de NGF par les cellules A549. La sécrétion de NGF stimulée par l'IL-1 β est également diminuée après traitement par la dexaméthasone et les taux mesurés sont comparables à ceux mesurés après traitement par la dexaméthasone en conditions basales.

Ces résultats montrent que les cellules épithéliales humaines A549 en culture synthétisent de manière constitutive le NGF. Cette sécrétion est augmentée en conditions inflammatoires après traitement par l'IL-1 β , et diminuée après traitement par la dexaméthasone.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Nerve growth factor secretion by human lung epithelial A549 cells in pro- and anti-inflammatory conditions

Françoise Pons, **Véronique Freund**, Hélène Kuissu, Eric Mathieu, Caroline Olgart and Nelly Frossard

European Journal of Pharmacology, 2001, Vol. 428, Pages 365-369

Pages 365 à 369 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01280-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01280-8)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Publication N°2

« Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions »

*Véronique Freund, Françoise Pons, Véronique Joly, Eric Mathieu, Nadine Martinet
et Nelly Frossard*

European Respiratory Journal 2002 ; 20 : 458-463

Le NGF peut être synthétisé par certaines cellules structurales des voies aériennes, en particulier par les fibroblastes pulmonaires (*Olgart et Frossard, 2001*) et par les cellules épithéliales A549 [Publication N°1]. Nous nous sommes intéressés ici aux cellules musculaires lisses bronchiques. Il avait été montré précédemment que les cellules musculaires lisses vasculaires produisaient du NGF (*Ueyama et al., 1993 ; Creedon et Tuttle, 1997*), ce qui nous a encouragé dans cette voie. Nous avons voulu également déterminer si la sécrétion constitutive de NGF pouvait être augmentée en conditions inflammatoires dans ces cellules, comme cela était le cas dans les fibroblastes pulmonaires et les cellules épithéliales A549.

Nous avons montré que les cellules musculaires lisses bronchiques humaines produisent *in vitro* du NGF de manière constitutive. Le traitement des cellules par l'IL-1 β (0,1-30U/ml) pendant 24h induit une augmentation concentration-dépendante de l'expression de la protéine du NGF, mesurée par technique ELISA dans le surnageant de culture (de 21 à 43pg/ml pour 10U/ml d'IL-1 β). Une augmentation de 1,6 fois est mesurée pour la protéine du NGF après 10h de traitement par l'IL-1 β à 10U/ml. Une augmentation de près de 2,5 fois est mesurée pour l'ARNm du NGF après 2,5h de traitement (mesurée par PCR quantitative en temps réel) , après traitement par l'IL-1 β à 10U/ml.

Nous avons ainsi montré dans cette étude que les cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture primaire synthétisent du NGF de manière constitutive, et que cette synthèse est augmentée en conditions inflammatoires, après traitement des cellules par la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β .

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions

V. Freund, F. Pons, V. Joly, E. Mathieu, N. Martinet and N. Frossard

European Respiratory Journal, 2002, Vol.20, Pages 458 – 463

Pages 458 à 463

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://erj.ersjournals.com/cgi/content/full/20/2/458>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Publication N°3

« TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation »

Véronique Freund-Michel, Claude Bertrand et Nelly Frossard

Cellular Signalling 2006 ; 18 : 621-627

Nous nous sommes intéressés au rôle potentiel que pourrait jouer le NGF dans les voies aériennes des patients asthmatiques. Un rôle du NGF avait été proposé dans l'inflammation et l'hyperréactivité bronchiques existant dans l'asthme. Nous nous sommes intéressés à un rôle potentiel dans le remodelage bronchique en étudiant si le NGF pouvait avoir un effet prolifératif du NGF sur les cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture primaire.

Nous avons montré que le NGF (0,1-10pM) induit la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture, à l'aide des techniques au XTT et BrdU. Le NGF à ces concentrations induit la phosphorylation du récepteur TrkA exprimé constitutivement par ces cellules. Ces deux effets sont inhibés par l'inhibiteur de kinase K252a. Nous avons ensuite étudié les voies de signalisation impliquées dans cet effet prolifératif. Les inhibiteurs de PI3K et de JNK n'ont pas eu d'effet. Les inhibiteurs de PKC bloquent partiellement l'effet prolifératif du NGF, et bloquent totalement la phosphorylation de la MAPK p38 sans affecter celle de la MAPK ERK1/2. Un inhibiteur de RafK bloque partiellement l'effet prolifératif du NGF, et bloque totalement la phosphorylation de ERK1/2 sans affecter celle de p38. L'implication des MAPK ERK1/2 et p38 est confirmée par l'inhibition de l'effet prolifératif du NGF par des inhibiteurs de ces MAPK. L'association de ces 2 inhibiteurs bloque totalement l'activation des deux MAPK ERK1/2 et p38 et inhibe totalement l'effet prolifératif du NGF.

En conclusion, nous avons montré dans ce travail que le NGF induit la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture, en activant les récepteurs TrkA exprimés constitutivement sur ces cellules. Cet effet implique l'activation de deux voies de signalisation distinctes : l'activation de la voie ras/raf conduisant à l'activation de la MAPK ERK1/2, et l'activation des PKC conduisant à l'activation de la MAPK p38. Ces deux voies sont nécessaires pour induire une prolifération NGF-dépendante de ces cellules.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation

Véronique Freund-Michel, Claude Bertrand et Nelly Frossard

Cellular Signalling, 2006, Vol.18, Pages 621 – 627

Pages 621 à 627 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.06.007>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Publication N°4

« Trafficking of the TrkA receptor in human airway smooth muscle cells in culture »

Véronique Freund-Michel et Nelly Frossard

Cellular and Molecular Biology 2006. Soumis

L'internalisation du récepteur TrkA après activation par le NGF a été mise en évidence dans les cellules neuronales, mais n'a pas été étudié dans les cellules structurales. Ce mécanisme pourrait jouer un rôle important dans les maladies inflammatoires des voies aériennes, en particulier dans l'asthme où les taux de NGF sont élevés. Ayant montré la présence d'un récepteur TrkA fonctionnel exprimé sur les cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture (HASMC) [Publication N°3], nous avons étudié les mécanismes de trafic intracellulaire du récepteur TrkA dans ces cellules.

Nous avons tout d'abord montré que l'activation du récepteur TrkA par le NGF (3pM) dans les HASMC induit son internalisation, pratiquement totale après 15 minutes de traitement. Cette internalisation est partiellement inhibée à l'aide d'inhibiteurs de clathrine, de même que dans des HASMC transfectées à l'aide d'un siRNA (« *Small interfering RNA* ») dirigé contre la clathrine. Nous avons d'autre part montré que l'internalisation du récepteur TrkA dans les HASMC est également dépendante de la protéine pincher : la surexpression de cette protéine native entraîne une augmentation de l'internalisation du récepteur TrkA, alors qu'elle est au contraire diminuée après transfection des HASMC avec un mutant dominant négatif de pincher. Enfin, un mécanisme d'internalisation cavéoles-dépendant a été proposé dans les cellules neuronales, mais des inhibiteurs déstabilisant la structure des cavéoles n'ont pas modifié l'internalisation du TrkA dans les HASMC. Ainsi, nous avons montré que l'internalisation du récepteur TrkA après activation par le NGF dans les HASMC est sous la dépendance de mécanismes clathrine- et pincher-dépendants.

A plus long terme, le NGF induit la dégradation du récepteur internalisé dans les HASMC, totale après 5h de traitement. Cette dégradation est bloquée par des inhibiteurs des enzymes lysosomiales, mais pas du protéasome, montrant que l'internalisation du récepteur TrkA dans les HASMC est suivie de sa dégradation dans les lysosomes.

Nous avons observé ensuite une synthèse de l'ARNm du récepteur TrkA, atteignant un maximum après 3h de traitement par le NGF (3pM). Cette augmentation est diminuée par les inhibiteurs de clathrine et dans les HASMC transfectées à l'aide du siRNA dirigé contre la clathrine. De plus, cette augmentation est potentialisée dans les HASMC surexprimant la protéine native pincher, alors qu'elle est au contraire diminuée dans les HASMC transfectées avec le mutant dominant négatif de pincher. Ces résultats suggèrent ainsi que le signal de synthèse de nouveaux récepteurs TrkA est sous la dépendance de son internalisation clathrine- et pincher-dépendante. Ceci semble confirmé par l'absence d'effet sur la synthèse de l'ARNm du TrkA du blocage de sa dégradation lysosomiale, mécanisme en aval de l'internalisation. Cette augmentation d'ARNm est suivie d'une augmentation de la protéine du TrkA, et nous avons montré que des traitements successifs des HASMC pendant 4 jours d'affilée par le NGF induit une augmentation progressive de l'expression de la protéine du TrkA, suggérant une augmentation du nombre de récepteurs après chaque stimulation, associée à une augmentation journalière de la prolifération NGF/TrkA-dépendante. Ces résultats suggèrent qu'une stimulation répétée des récepteurs TrkA exprimés sur le muscle lisse bronchique pourraient induire une augmentation de leur expression, potentialisant ainsi leurs effets, en particulier la prolifération NGF-dépendante. L'expression du récepteur TrkA a été montrée sur le muscle lisse bronchique humain *in vivo* : ce mécanisme pourrait alors être important dans les voies aériennes des patients asthmatiques où les taux de NGF sont augmentés.

En conclusion, nous avons montré que l'activation du récepteur TrkA par le NGF conduit à son internalisation dans les HASMC, de manière clathrine- et pincher dépendantes. Le récepteur est ensuite dégradé dans les lysosomes, et de nouveaux récepteurs sont synthétisés. De plus, l'augmentation de l'expression du récepteur TrkA observée suite à son activation répétée par le NGF suggère l'existence dans le muscle lisse bronchique d'un mécanisme de régulation positive de l'expression de ce récepteur en fonction de son activation, induisant une potentialisation de ses effets, en particulier la prolifération cellulaire NGF-dépendante.

Trafficking of the TrkA receptor in human airway smooth muscle cells in culture

Véronique Freund-Michel and Nelly Frossard

EA 3771 « Inflammation and environment in asthma », University Louis Pasteur-Strasbourg-I
Faculty of Pharmacy, ILLKIRCH, FRANCE

Abstract

Trafficking of the TrkA receptor is of emerging importance in structural cells in the context of airway inflammatory diseases. We have recently reported expression of functional TrkA receptors in human airway smooth muscle cells (HASMC), and have studied TrkA trafficking mechanisms in these cells. NGF (3pM) induced TrkA internalisation in HASMC, inhibited in siRNA transfected cells expressing less endogenous clathrin, in cells overexpressing a dominant inhibitory mutant of pincher, or after treatment with clathrin inhibitors. In contrast, TrkA internalisation was potentiated in cells overexpressing native pincher. Internalised receptors were degraded in lysosomes, and functional receptors were re-synthesised and re-expressed in HASMC. We observed that blockade of TrkA clathrin- and pincher-dependent internalisation inhibited TrkA re-synthesis, suggesting a role for TrkA internalisation in generating the signal of this re-synthesis. Finally, we observed that NGF repeated stimulations progressively increased TrkA expression in HASMC, associated with an increase in NGF/TrkA-dependent proliferation. In conclusion, we have shown in this study that TrkA internalisation occurs in the airway smooth muscle, involving clathrin- and pincher-dependent mechanisms, and is followed by lysosomal degradation and re-synthesis of functional TrkA receptors. Our results also suggest a regulatory mechanism in HASMC, with TrkA repeated activation inducing up-regulation of its expression and effects.

Keywords:

Airway smooth muscle; clathrin; lysosomes; nerve growth factor (NGF); pincher; TrkA receptor

Introduction

Nerve growth factor (NGF) belongs to the neurotrophin family, also including brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophins -3 and -4/5 (NT-3 and NT-4/5). NGF is essential for development, survival and differentiation of brain and peripheral neurons (34, 35, 47, 56). The biological action of NGF is mediated through activation of its receptors, the high-affinity TrkA receptor (tropomyosin-related kinase A) (11, 36, 46), and the p75^{NTR} receptor, binding all neurotrophins and pro-neurotrophins (3, 6, 33).

TrkA is a receptor tyrosine kinase, whose activation by NGF induces its dimerisation and auto-phosphorylation (20, 24, 25, 37). It has been established that upon binding NGF, TrkA receptor is rapidly endocytosed in a clathrin-dependent or independent manner (for reviews: 17, 58). The most studied endocytic pathway for NGF in neuronal cells is the retrograde signalling: NGF activates receptors expressed at nerve endings, which are internalised into endosomes that are retrogradely trafficked to the cell body, where ligand-receptor complexes initiate transduction cascades (13, 14, 43, 48). Endocytosis of the TrkA receptor can also induce its degradation, targeting lysosomes (22, 28, 42, 45), or its recycling to the cell surface, targeting recycling endosomes (7, 57).

If retrograde signalling is necessary for neurotrophins receptors in neuronal cells, due to their complex morphology, this mechanism is not worth in structural cells. But endocytic trafficking, if occurring in structural cells, might help secondary signalling, or might lead to either degradation or recycling of the TrkA receptor. However, no studies

have been conducted yet on TrkA internalisation and endocytic trafficking in structural cells.

We have recently shown expression of the TrkA receptor by human airway smooth muscle cells (9), leading to cell proliferation once activated by NGF. We have therefore studied the TrkA trafficking mechanisms in human airway smooth muscle cells in primary culture (HASMC), showing that TrkA is internalised in part through clathrin- and pincher-dependent mechanisms, followed by lysosomal degradation. New TrkA receptors are synthesised and expressed at the cell membrane. These new receptors are functional. Moreover, expression of TrkA protein increases after each new NGF stimulation, in parallel with increased HASMC proliferation.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

Cell culture reagents, as well as TrkA and GAPDH primers used for online Q-PCR were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Biotinylation assays were performed with the Cell surface biotinylation and purification Kit from Pierce (Rockford, USA). A/G protein-agarose beads, rabbit anti-human TrkA polyclonal antibody, mouse anti-human clathrin heavy chain (CHC) monoclonal antibody (clone TD.1), mouse anti-HA probe (F-7) monoclonal antibody, control non-specific and clathrin small interfering RNAs (siRNAs) were from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, USA). Goat anti-human TrkA polyclonal antibody used for immunoprecipitation, as well as human β -NGF were from R&D systems (Lille, France). HRP-conjugated

secondary antibodies were from Jackson Immuno-Research Laboratories (Soham, Cambridgeshire, United Kingdom). The chemi-luminescence kit was from Amersham Biosciences (Charbonnières, France). Phycoerythrin-conjugated secondary antibodies were from Molecular Probes (Eugene, USA). Protease inhibitor mixture was from Roche Applied Science (Meylan, France). Proteasome inhibitors were from Calbiochem (La Jolla, USA). Other inhibitors for lysosomes, caveolae and clathrin pathways, as well as the mouse anti-human β -actin monoclonal antibody (clone AC-15) were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). The K252a compound was purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Tri-Reagent[®] for RNA extraction was purchased from Molecular Research Center (Cincinnati, USA). Online Q-PCR was performed on a Lightcycler[®] (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) using Lightcycler[®]-Faststart reaction Mix SYBR Green I from Roche. Cell transfections were performed with the Nucleofector[®] from Amaxa (Köln, Germany) with a Nucleofector[®] kit for human smooth muscle cells (Amaxa). Pincher wild-type and mutant plasmids as well as rabbit anti-pincher antibodies were a generous gift from Dr Simon Haleboua (Center for Brain and Spinal Cord Research, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY, USA). Cell proliferation was assessed by use of the XTT assay (2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, "Cell Proliferation kit II XTT"), provided by Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

Cell culture and treatment

Primary cultures were obtained as previously described (9, 10) with human airway smooth muscle from healthy lung transplant donors after sudden death (Center for Biological Resources (CRB), N. Martinet, Nancy, France). Human airway smooth muscle cells (HASMC) at passage 7 were seeded in 25-cm² flasks (BD Falcon[™], Le Pont de Claix, France) for mRNA studies, in 75-cm² flasks for protein studies, or plated on 4-chamber slides (Nunc, Wiesbaden, Germany) for immunofluorescence and confocal microscopy studies. HASMC were starved for 48h in a DMEM-F12 medium that was insulin-free and low in foetal bovine serum (FBS, 0.3%). All experiments were conducted on cells treated or not with NGF at 3pM. Clathrin recruitment to the cell surface was studied after 2min of NGF treatment. Clathrin-TrkA coimmunoprecipitation was studied on cells treated with NGF for 0, 1, 2, 5, 10 and 15min. TrkA internalisation was studied after 0, 5, 10 and 15min of NGF treatment, by use of clathrin inhibitors monodansylcadaverine (MDC 50 μ M) or chlorpromazine (CPZ 100 μ M), and of caveolae inhibitors nystatin (NYS 30 μ g/ml) and filipin (FILIP 5 μ g/ml), as well as in HASMC transfected with either control or clathrin siRNAs, or in HASMC transfected either with wild-type (WT) or mutant (MUT) pincher plasmids. TrkA degradation was studied by use of proteasome (MG132 10 μ M or lactacystin (Lacta) 20 μ M) or lysosome inhibitors (NH₄Cl 10mM or chloroquine (Chloro) 20 μ M). Cells were pre-treated with each inhibitor or its solvent for 1h before NGF

treatment. TrkA mRNA synthesis was studied after 0, 1, 2, 3, 5 and 10h of NGF treatment. To determine which mechanism was responsible for inducing TrkA receptor mRNA synthesis, measurements of TrkA mRNA expression at 3h of NGF treatment were realised on cells pre-treated with the tyrosine kinase inhibitor K252a (100nM), with clathrin inhibitors CPZ (100 μ M) or MDC (50 μ M), with caveolae inhibitors NYS (30 μ g/ml) or FILIP (5 μ g/ml), with lysosomes inhibitors NH₄Cl (10mM) or Chloro (20 μ M), and on HASMC transfected with either control or clathrin siRNAs, or on HASMC transfected with either WT or MUT pincher plasmids. TrkA protein expression and NGF/TrkA-induced HASMC proliferation were observed after 0, 24 (Day 1 D1), 48 (Day 2 D2), 72 (Day 3 D3) or 96h (Day 4 D4) of NGF treatment, with NGF stimulation repeated every day.

Plasmids, siRNAs and cell transfection

Transient transfection of HASMC was performed by use of the Nucleofector[®] kit. Plasmidic DNA (2 μ g) or siRNA (100nM) was added to 8 x 10⁵ cells suspended in 100 μ l of human smooth muscle cells Nucleofector[®] solution. The program A-30 was selected for optimal density of transfection (60%) and cell survival (70%), according to the manufacturer's instructions. Cells were then plated in 75-cm² flasks (2.4 x 10⁶ cells per flask) and serum-starved for 48h before experiments, with the medium changed 16h after transfection. Green Fluorescent Protein (GFP) was used to determine the transfection efficiency, according to the manufacturer's instructions, by use of the GFP plasmid provided in the Nucleofector[®] kit. A control non-specific siRNA (siRNA C) was used as a negative control. WT and MUT pincher plasmids were a generous gift from Dr Simon Haleboua and have been previously described (44, 49): WT pincher plasmid encodes the native form of pincher whereas MUT pincher plasmid encodes a mutant inhibitory form of pincher.

Western blotting

After starvation and treatment, cells were rinsed in cold PBS and lysed in RIPA buffer, as previously described (9). After determination of the total protein content by the BCA reagents (Sigma Aldrich), 30 to 100 μ g of proteins were subjected to 8% SDS-PAGE gel, and then blotted onto nitrocellulose. Immunoblotting used a rabbit anti-human TrkA polyclonal antibody (1:100 in blocking buffer), a mouse anti-human clathrin monoclonal antibody (1:200 in blocking buffer), a mouse anti-HA probe monoclonal antibody (1:100 in blocking buffer) or a rabbit anti-pincher polyclonal antibody (kind gift from Dr S. Haleboua, 1:2500 in blocking buffer) and immunoreactive proteins were detected by ECL[™] reagents. Normalisation was performed in the same conditions with a mouse monoclonal anti-human β -actin antibody (1:5000 in blocking buffer).

Cell surface biotinylation assay

Internalisation of the TrkA receptor was analysed by use of a cell surface biotinylation assay, with the Cell surface biotinylation and purification Kit,

following instructions provided by the supplier (Pierce). Briefly, starved cells were treated with NGF (3pM) for 0, 5, 10 and 15min. Cells were then subjected to biotinylation on ice during 2h with Sulfo-NHS-biotin solution (1.5mg/ml in PBS). Cells were then washed 4 times in PBS to remove unbound reactive biotin. Proteins were then extracted using ice-cold RIPA buffer, and the extracts were clarified by centrifugation at 10000g for 10min. The resulting supernatant was divided in 2 parts. One part was kept as the "total TrkA" sample, and the second part was subjected to immobilized NeutrAvidin™ resin to isolate biotinylated proteins. Elution of these proteins was then performed with SDS-PAGE buffer containing 50mM DTT to separate Sulfo-NHS-Biotin from extracted proteins. After centrifugation, Western blotting was performed on this "surface TrkA" supernatant and was compared to the "total TrkA" sample. Normalisation for "surface TrkA" samples was done by staining total surface proteins with Ponceau-red.

Clathrin and TrkA receptor coimmunoprecipitation

After starvation and treatment, cells were rinsed in cold PBS and lysed in RIPA buffer. TrkA immunoprecipitation was performed as previously described (9). Briefly, after centrifugation and determination of the total protein content, 500 µg of protein was incubated for 2 h at +4°C with a goat anti-human TrkA polyclonal antibody (4µg), then incubated overnight at +4°C with 20 µl A/G protein-agarose beads for antibody complexing. After 3 centrifugations, the pellet was washed and resuspended in 60 µl 2X Laemmli buffer, heated at 100°C and centrifuged. Western blotting was performed using a mouse monoclonal anti-human CHC antibody (1:100 in blocking buffer). Controls were also performed by immunoprecipitating CHC (3µg monoclonal antibody), followed by Western blotting to reveal the TrkA receptor (rabbit polyclonal anti-human TrkA antibody, 1:100 in blocking buffer).

Immunofluorescence staining and confocal microscopy

HASMC were grown on 4-well chamber slides and starved at 70% confluence. After 24h starvation, control or NGF-treated cells were rinsed in PBS, and fixed and permeabilized in acetone/methanol 50/50 v/v for 3min on ice. The slides were rinsed with PBS followed by 30min of blocking with 10% foetal calf serum and 1% bovine serum albumin in PBS. The slides were rinsed in PBS and incubated in mouse monoclonal anti-CHC antibody (1µg/ml) overnight at +4°C. After 3 washes in PBS, cells were incubated in anti-mouse IgG conjugated with phycoerythrin for 1h at room temperature. The slides were rinsed again in PBS and cover slipped using a fluorescent mounting medium (Dako, Trappes, France) for confocal microscopy. The MRC-1024ES confocal equipment mounted on a Nikon Eclipse TE 300 inverted microscope (Bio-Rad, Hertfordshire, UK) was used for the optical sectioning of cells. Excitation line at 488nm of an krypton/argon laser was used to illuminate a Nikon

60X immersion objective. Emitted light was detected with two photomultipliers through a selected band pass filter of 578 nm. Digital images were recorded using LaserSharp Software (Bio-Rad). Confocal Assistant was used for image analysis (version 4.0.2 by TC Brelje, University of Minnesota, USA).

Extraction of total RNA and reverse transcription

After starvation, control or NGF-treated cells were put in 1ml Tri-Reagent® and total RNA was extracted as previously described (9, 10). A secondary extraction was performed to avoid any genomic DNA contamination. One µg total RNA was then reverse transcribed with 1 U/µl Rnase H minus-Moloney leukaemia virus reverse transcriptase in 1X RT buffer.

Quantitative determination of TrkA mRNA by online quantitative PCR

One µl of the RT product was amplified in a 1X PCR reaction buffer containing 2mM MgCl₂ and 2µl reaction mix with FastStart Taq DNA polymerase, dNTP mix, SYBR Green I (Lightcycler®-Faststart reaction Mix SYBR Green I), with 0.4 µM of each primer:

sense (20pb):

5'CCCCATCCCTGACACTAACA

antisense (20pb):

5'GCACAAGGAGCAGCGTAGAA

in a 20 µl final volume for 40 cycles (denaturation: 15 sec at 95°C, hybridisation: 10 sec at 56°C, elongation: 6 sec at 72°C) in the Lightcycler®. A standard curve was constructed after specific TrkA cDNA amplification, extraction on agarose (Qiaex II®, Qiagen S.A., Courtaboeuf, France), and quantification by Picogreen® fluorescence (DNA Quantification reagent, Interchim, Montluçon, France). The specificity of the 131bp PCR product was validated by the fusion curve obtained after amplification (Lightcycler®), by electrophoresis and molecular sequencing. Results were normalised to expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), quantified by Lightcycler® using 0.4 µM of each primer:

sense (22bp):

5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA

antisense (22bp):

5'-GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGA

in a 20 µl final volume for 40 cycles (denaturation: 15 sec at 95°C, hybridisation: 10 sec at 57°C, elongation: 10 sec at 72°C).

Cell proliferation assay

Cell proliferation was measured by the XTT assay according to the manufacturer's instructions, as previously described (9). Briefly, cells were seeded in 96-well culture plates (3000 cells per well) in low-FBS (0.3%), insulin-free, DMEM-F12 medium, allowed to adhere for 3 h, and then treated as described above for 0 to 4 days. Cells were then exposed to XTT (1 mg/ml, 3h) and absorbance was measured at 450 nm.

Data expression and analysis

Coimmunoprecipitation data are expressed as Western blotting intensities in arbitrary units (AU). TrkA receptor mRNA is expressed as the ratio of TrkA cDNA (fg) / GAPDH cDNA (ng). TrkA receptor protein is expressed as TrkA Western blotting intensities in arbitrary units, and presented on graphs either as a percentage of internalisation compared to surface TrkA basal expression, or as a percentage of total TrkA basal expression. Proliferation data are expressed as a percentage of proliferation compared to controls. Results are presented on all graphs as means \pm S.E.M. Data were analysed by a Student-Newman-Keuls test, or a Dunnett test when comparing several variables to the same control, at a $P < 0.05$ level of significance.

Results

Mechanisms of TrkA internalisation induced by NGF (3pM) in HASMC

The TrkA receptor was constitutively expressed by HASMC, as previously described (9). After treatment with NGF at 3pM, expression of the TrkA receptor rapidly decreased at the cell surface ($89 \pm 2\%$ decrease after 15 min of NGF treatment) (Fig.1A), suggesting TrkA receptor internalisation. Total TrkA expression was not modified during this time of NGF treatment.

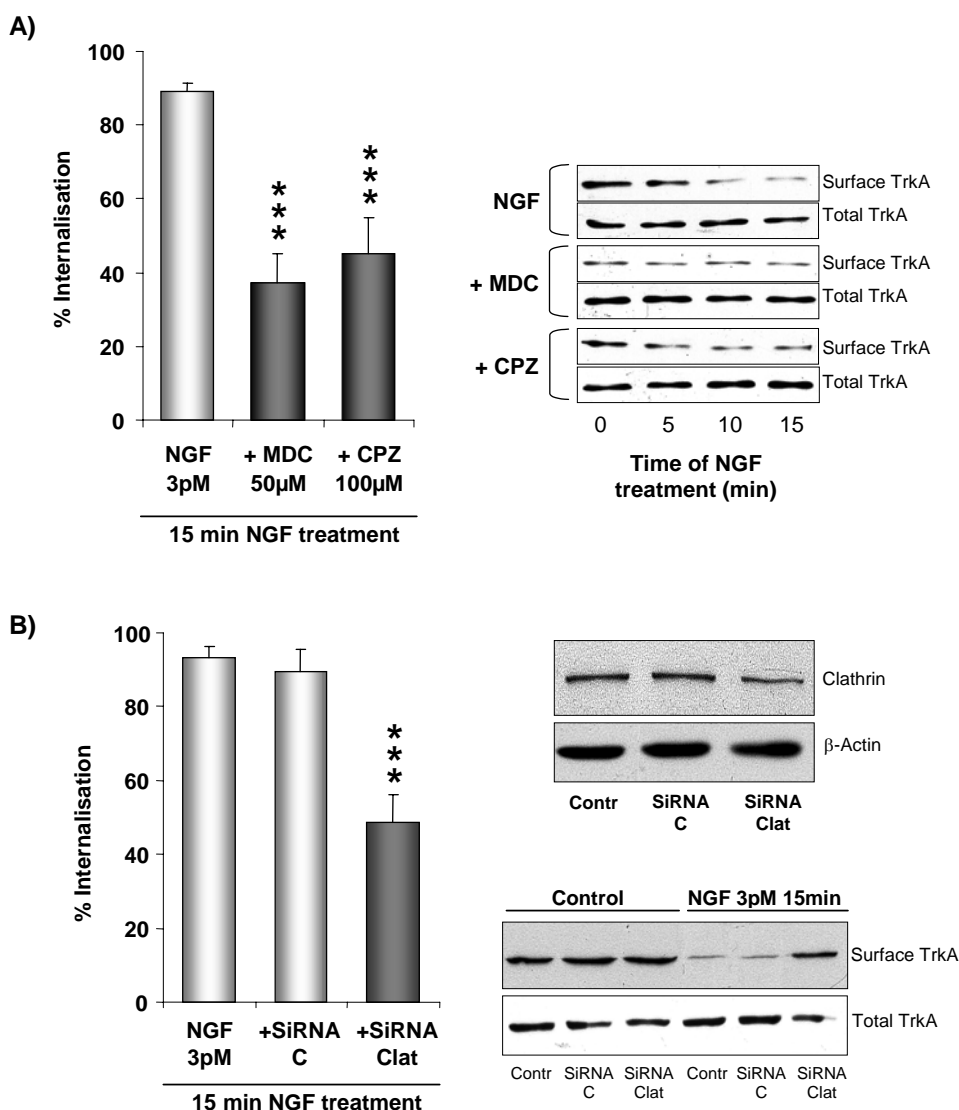


Fig. 1 Involvement of clathrin-dependent mechanisms in TrkA internalisation induced by NGF in HASMC

A) Inhibition of TrkA internalisation by clathrin inhibitors. Cells were stimulated with NGF (3pM) for 0, 5, 10 and 15 min with or without 1h pre-incubation with the clathrin inhibitors monodansylcadaverine (MDC, 50µM) or chlorpromazine (CPZ, 100µM). Internalisation of the TrkA receptor was appreciated by use of a cell-surface biotinylation assay, to observe the decrease in TrkA expression at the cell membrane ("Surface TrkA") after NGF treatment, with TrkA total expression in whole cell lysates used as controls ("Total TrkA"). The graph on the left represents results obtained after 15min of NGF treatment: data are expressed as a percentage of internalisation compared to untreated control cells and are presented as means (blocks) \pm S.E.M. (bars) of three independent experiments performed in duplicate (***: $P < 0.001$ versus control). On the right, representative Western blots of TrkA internalisation kinetics are shown for each condition tested: NGF alone, in presence of MDC, or of CPZ.

B) Inhibition of TrkA internalisation in cells transfected with clathrin siRNA. HASMC were transfected with control (siRNA C) or clathrin (siRNA Clat) siRNAs to block expression of endogenous clathrin. Cells were stimulated 48h later with NGF for 15min and internalisation of the TrkA receptor was visualised as described above. The graph on the left represents results obtained after 15min of NGF treatment: data are expressed as a percentage of internalisation compared to untreated control cells and are presented as means (blocks) \pm S.E.M. (bars) of two independent experiments performed in duplicate (***: $P < 0.001$ versus control). On the right (top), a representative Western blot shows decrease in levels of endogenous clathrin after transfection with siRNA Clat, whereas the non-specific siRNA C did not modify it. β -Actin, probed in the same blots was used to control for protein loading. Western blots on the right (bottom) show kinetics of TrkA internalisation for each condition tested: NGF alone, after transfection with siRNA C, or with siRNA Clat.

Involvement of a clathrin-dependent mechanism
 NGF-induced internalisation of the TrkA receptor was partially blocked by inhibitors of the clathrin pathway (Fig. 1A): after 15min of NGF treatment, there was a significant decrease in TrkA internalisation with MDC ($58\pm 1\%$ inhibition, $p < 0.001$) and CPZ ($51\pm 3\%$ inhibition, $p < 0.001$).

HASMC transfection with clathrin siRNA (siRNA Clat) induced a significant decrease in clathrin protein expression ($51\pm 5\%$ inhibition, $p < 0.01$), whereas control non-specific siRNA (siRNA C) did not modify it (Fig.1B). Both siRNAs did not modify surface and total TrkA expression in control non-treated cells.

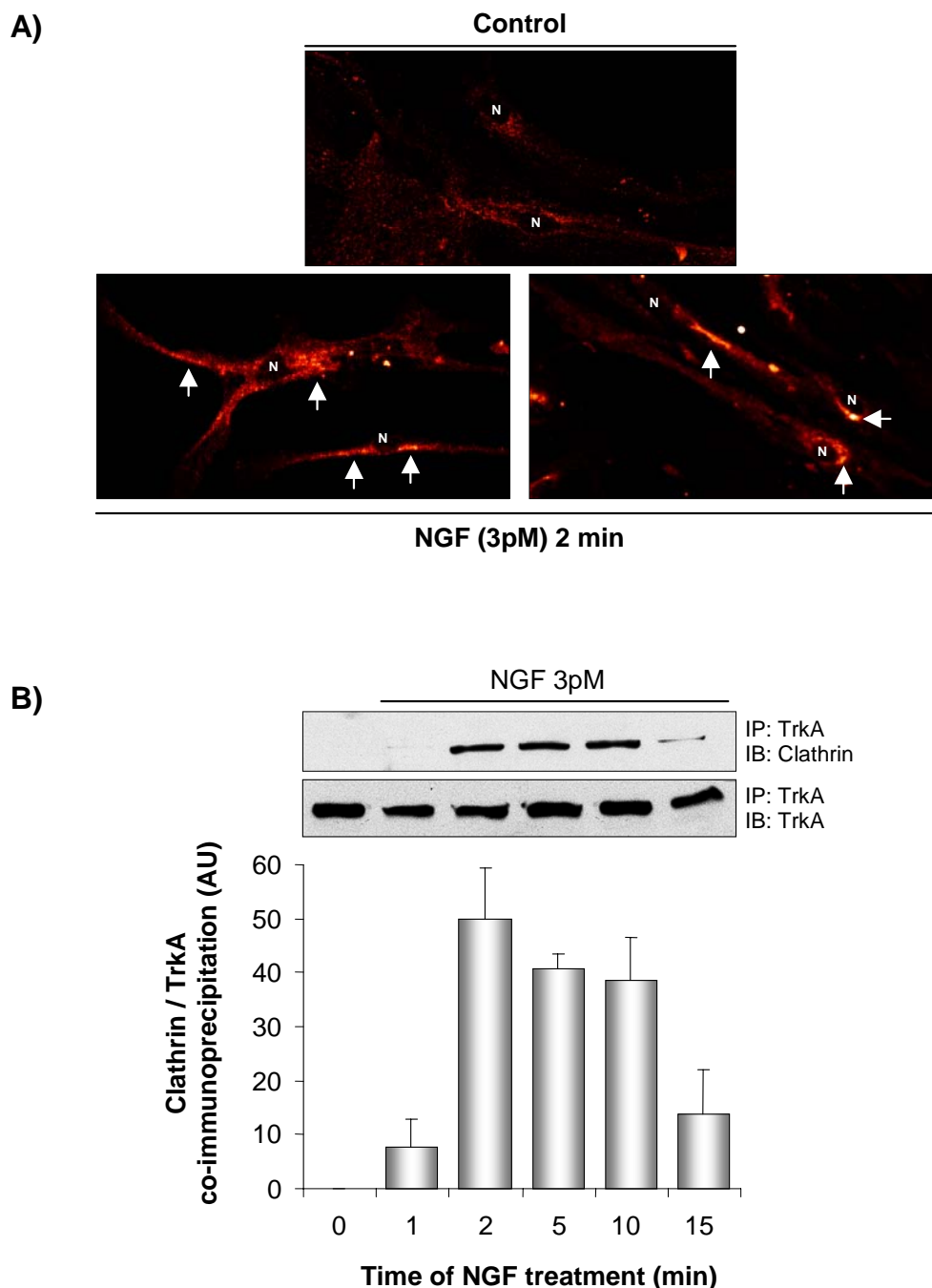


Fig. 2 Recruitment of clathrin in HASMC after NGF treatment

A) *NGF causes clathrin redistribution in HASMC.* Cells were stimulated with NGF (3pM) for 2min and clathrin redistribution in HASMC was visualised by immunofluorescence and confocal microscopy, as described in Material and Methods. The width of each panel in $40\mu\text{m}$ and immunostainings presented are representative of 3 independent experiments (N for cell nucleus).

B) *Coimmunoprecipitation of clathrin and TrkA receptors in HASMC after NGF treatment.* Cells were treated with NGF (3pM) for 0, 1, 2, 5, 10 and 15min and recruitment of clathrin to the TrkA receptor was visualised by coimmunoprecipitation. An anti-TrkA antibody was used to immunoprecipitate cell lysates, and the blots were probed for clathrin (top), or for TrkA (bottom) to control for protein loading. The graph on the bottom of the figure represents the quantification of the amount of clathrin observed in TrkA immunoprecipitates and is expressed as arbitrary units (AU). This result is representative of three independent experiments. Immunoprecipitation has also been conducted with clathrin antibodies followed by TrkA immunoblotting, showing the same kinetics of clathrin recruitment to TrkA (Data not shown).

After 15min of NGF treatment, the decrease in surface TrkA protein expression was not modified in cells transfected with siRNA C (90 ± 6 versus $93\pm 3\%$ decrease in control cells). Internalisation of the TrkA receptor was decreased in cells transfected with siRNA Clat ($47\pm 7\%$ inhibition, $p < 0.001$) (Fig.1B). Involvement of the clathrin pathway was further confirmed by recruitment of clathrin to membranes in response to NGF (Fig. 2A).

By confocal microscopy, clathrin staining in untreated HASMC was distributed diffusely throughout the cell cytoplasm. In contrast, in cells treated with NGF for 2min, there was a clear redistribution of clathrin, with a strong staining at specific locations near the cell membrane. We also immunoprecipitated the TrkA receptor before immunoblotting for clathrin in HASMC after NGF treatment (Fig. 2B).

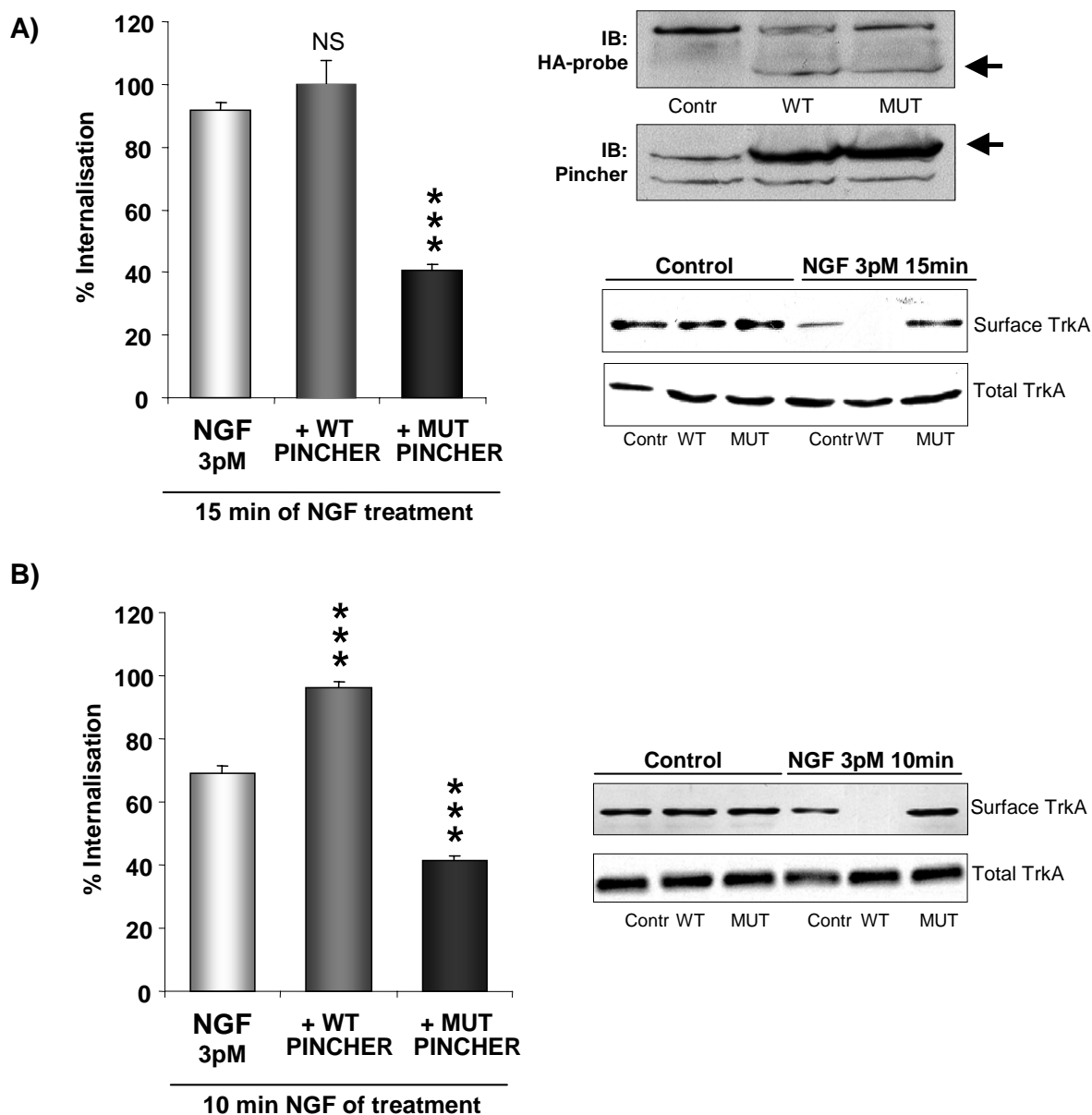


Fig. 3 Involvement of pincher-dependent mechanisms in TrkA internalisation induced by NGF in HASMC

A) *Inhibition of TrkA internalisation in cells transfected with MUT pincher plasmid encoding a mutant form of pincher.* HASMC were transfected with a wild-type form of pincher (WT PINCHER or WT) to overexpress the native form of this protein, or with a mutant form of pincher (MUT PINCHER or MUT), to block the activity of endogenous pincher. Cells were stimulated 48h later with NGF for 15min and internalisation of the TrkA receptor was visualised as described in Fig. 1. The graph on the left represents results obtained after 15min of NGF treatment: data are expressed as a percentage of internalisation compared to untreated control cells and are presented as means (blocks) \pm S.E.M. (bars) of two independent experiments performed in duplicate (NS: non-significant, ***: $P < 0.001$ versus control). On the right (top), representative Western blots show pincher overexpression in cells transfected with WT or MUT pincher plasmids. Blots were probed with anti-HA antibodies, showing appearance of a band at 65kDa corresponding to HA-Pincher in WT and MUT cells, as compared to control untransfected cells (Contr). Blots were then reprobbed with anti-pincher antibodies and the band corresponding to pincher was identified by its increased intensity compared to control untransfected cells. Western blots on the right (bottom) show kinetics of TrkA internalisation for each condition tested: NGF alone, after transfection with WT or with MUT pincher.

B) *Potentiation of TrkA internalisation in cells transfected with WT pincher plasmid.* Experiments were performed as described above, but in cells treated for 10min with NGF (3pM) to appreciate effect of pincher WT overexpression on TrkA internalisation (***: $P < 0.001$ versus control). Similar results were obtained in two independent experiments.

In control non-treated cells, clathrin was not found complexed with the TrkA receptor. In contrast, immunoblotting revealed presence of clathrin in TrkA immuno-precipitates after 1 and until 10min of NGF treatment, decreasing after 15min (Fig. 2B). Similar results were observed when immuno-precipitating clathrin and immunoblotting for the TrkA receptor (Data not shown). Pincher was constitutively expressed in control non-treated HASMC (Fig. 3A). HASMC transfection with WT or MUT pincher plasmids induced overexpression of pincher protein, shown by appearance of a band at approximately 65kDa revealed by immunoblotting with antibodies against the HA tag, and confirmed after re-blotting with anti-pincher antibodies (Fig. 3A). Overexpression of WT or MUT pincher did not affect surface and total TrkA expression in control non-treated cells. After 15min of NGF treatment, overexpression of WT pincher induced a slight but non-significant increase in TrkA internalisation (100 ± 2 versus $92\pm 3\%$ decrease in control treated cells, NS). In contrast, after transfection with the MUT pincher plasmid, encoding a mutant form of pincher that is unable to bind ATP (44), a significant decrease in TrkA internalisation was observed ($60\pm 4\%$ inhibition, $p<0.001$) (Fig.3A).

We also observed TrkA internalisation earlier than 15 min of NGF treatment, to investigate whether WT pincher overexpression might significantly potentiate TrkA internalisation (Fig. 3B). After 10min of NGF treatment, surface TrkA expression was decreased in control non transfected cells, showing TrkA internalisation ($69\pm 2\%$ internalisation, $p<0.001$). This internalisation was significantly potentiated in HASMC transfected with WT pincher after the same time of treatment ($96\pm 3\%$ internalisation, $p<0.001$). In HASMC transfected with the MUT pincher plasmid, TrkA internalisation decreased ($41\pm 4\%$ internalisation, $p<0.001$), thus confirming our results observed after 15 min of NGF treatment.

Absence of caveolae involvement

NGF-induced internalisation of the TrkA receptor was not modified by inhibitors of caveolae (Fig. 4): after 15min of NGF treatment, there was still a decrease in surface TrkA expression with NYST and FILIP ($85\pm 4\%$ and $93\pm 6\%$ decrease, respectively, NS), comparable to the TrkA internalisation observed in control treated cells ($93\pm 5\%$ decrease) (Fig. 4).

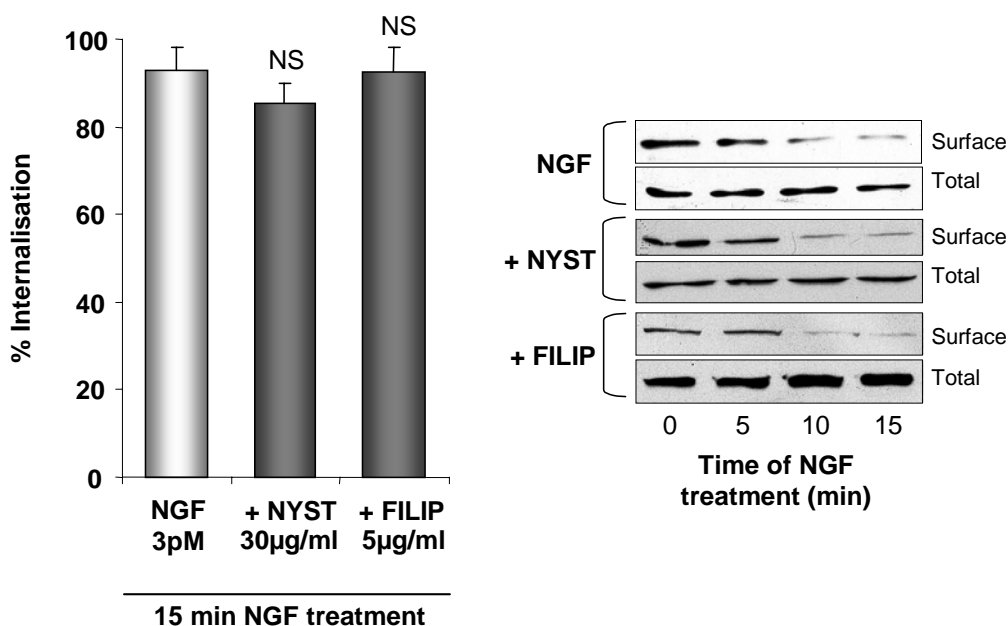


Fig. 4 Absence of caveolae-dependent mechanisms in TrkA internalisation induced by NGF in HASMC

Cells were stimulated with NGF (3pM) for 0, 5, 10 and 15min with or without 1h pre-incubation with the caveolae inhibitors nystatin (NYS, 30µg/ml) or filipin (FILIP, 5µg/ml). Internalisation of the TrkA receptor was appreciated as described in Fig. 1. The graph on the left represents results obtained after 15min of NGF treatment: data are expressed as a percentage of internalisation compared to untreated control cells and are presented as means (blocks) \pm S.E.M. (bars) of three independent experiments performed in duplicate (NS: non-significant versus control). On the right, representative Western blots of TrkA internalisation kinetics are shown for each condition tested: NGF alone, in presence of NYS, or of FILIP.

Degradation of the TrkA receptor in lysosomes

A decreased expression of total TrkA was observed in HASMC after 1h of NGF treatment and TrkA expression totally disappeared in HASMC after 5h (Fig. 5), suggesting TrkA receptor degradation. NGF-induced TrkA degradation was therefore analysed in the presence of 2 inhibitors of lysosomal enzymes and of 2 inhibitors of the proteasome pathway. Whereas proteasome inhibitors had no effect, the two inhibitors of lysosomes Chloro and NH₄Cl lead to a total inhibition of TrkA receptor degradation, with total TrkA expression still visualised in HASMC after 5h of NGF treatment (Fig.5).

TrkA mRNA neo-synthesis

NGF treatment (3pM) significantly and time-dependently enhanced TrkA mRNA expression in HASMC (Fig. 6A). A 2-fold maximal increase in TrkA mRNA levels was observed after 3h of NGF treatment (from 35±3 to 71±6 fg TrkA cDNA / ng GAPDH cDNA, p<0.001). Levels returned progressively to baseline within 10h (Fig. 6A). We further investigated whether TrkA activation, internalisation and/or degradation participated into the signal inducing TrkA mRNA synthesis. The increase in TrkA mRNA levels observed after 3h of NGF treatment was abolished when pre-treating HASMC with the kinase inhibitor K252a (p<0.001) (Fig.6B).

Whereas caveolae inhibitors had no effect, inhibition of the clathrin pathway by CPZ and MDC induced a decrease in TrkA mRNA synthesis of respectively 67±3% (from 71±6 to 47±1 fg TrkA cDNA / ng GAPDH cDNA, p<0.001) and 80±5% (from 71±6 to 42±1 fg TrkA cDNA / ng GAPDH cDNA, p<0.001) (Fig. 6C). Involvement of the clathrin pathway in TrkA mRNA synthesis was further confirmed in HASMC transfected with siRNA Clat, where a 60±6% decrease in TrkA mRNA synthesis was observed (from 71±6 to 49±3 fg TrkA cDNA / ng GAPDH cDNA, p<0.01). HASMC transfection with the non-specific siRNA C had no effect as compared to control treated cells (69±3 versus 71±6 fg TrkA cDNA / ng GAPDH cDNA in control treated cells, NS) (Fig. 6C). Involvement of pincher-dependent mechanisms in TrkA re-synthesis of TrkA receptors was demonstrated in HASMC transfected with the WT pincher plasmid where native pincher over-expression induced a greater but non significant increase in TrkA mRNA synthesis, as compared to control treated cells (from 71±6 to 88±5 fg TrkA cDNA / ng GAPDH cDNA, NS) (Fig. 6C). Moreover, HASMC transfection with MUT pincher induced a significant decrease in TrkA mRNA synthesis (from 71±6 to 41±4 fg TrkA cDNA / ng GAPDH cDNA, p<0.001) (Fig. 6C). Inhibition of TrkA lysosomal degradation by use of lysosomes inhibitors NH₄Cl and Chloro did not modify TrkA mRNA synthesis (from 71±6 to respectively 72±2 and 67±5 fg TrkA cDNA / ng GAPDH cDNA, NS) (Fig. 6B).

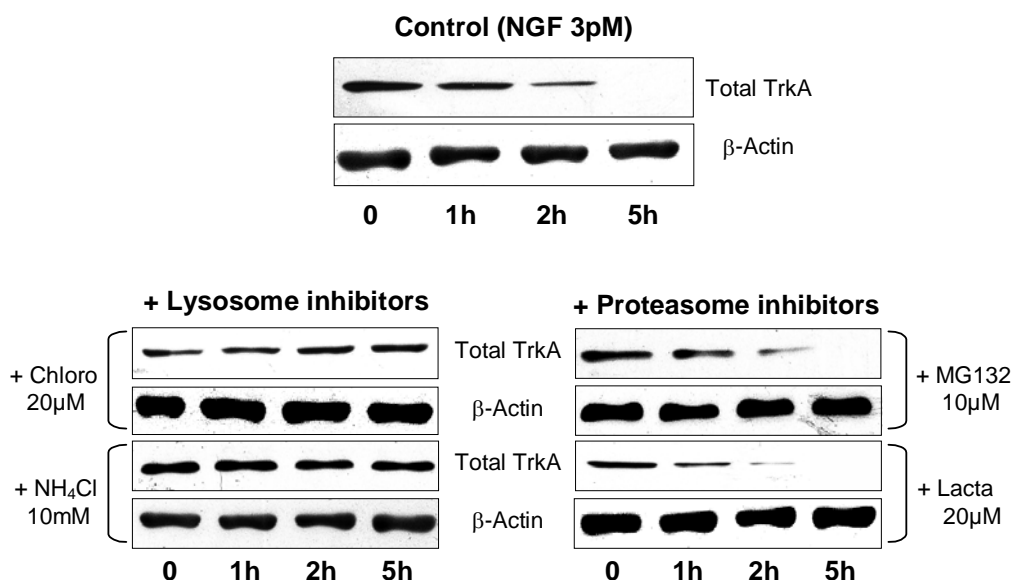


Fig. 5 Degradation pathways of the TrkA receptor after activation by NGF in HASMC

Cells were treated with NGF (3pM) for 0, 1, 2 and 5h, alone or after 1h of pre-treatment with the lysosomes inhibitors chloroquine (Chloro 20µM) and ammonium chloride (NH₄Cl 10mM), or with the proteasome inhibitors MG132 (10µM) and lactacystin (Lacta 20µM). Degradation of the TrkA receptor was visualised by the decrease in total TrkA expression after NGF treatment. β-Actin, probed in the same blots, was used to control for protein loading. Western blots shown are representative of 3 independent experiments performed in duplicate.

TrkA protein neo-synthesis with increased expression and functionality after HASMC repeated NGF stimulations

TrkA mRNA synthesis was followed by TrkA protein synthesis and re-expression at cell surface after 10h of NGF treatment (data not shown). After 24h of NGF treatment (D1), an increase in TrkA protein expression was observed, but non significant ($30\pm 15\%$ increase, NS) (Fig.7A). Cells were treated again every 24h with NGF and TrkA protein expression was observed 24h after each NGF stimulation.

We observed a time-dependent increase in TrkA protein expression, becoming significant after 2 stimulations (D2, $69\pm 21\%$ increase, $p < 0.05$), and reaching a plateau after 3 stimulations (D3: $121\pm 11\%$ increase, $p < 0.01$; D4: $111\pm 32\%$ increase, $p < 0.01$) (Fig.7A).

We also showed that the TrkA receptors re-expressed in HASMC were functional since TrkA phosphorylation was observed after each NGF stimulation (Data not shown).

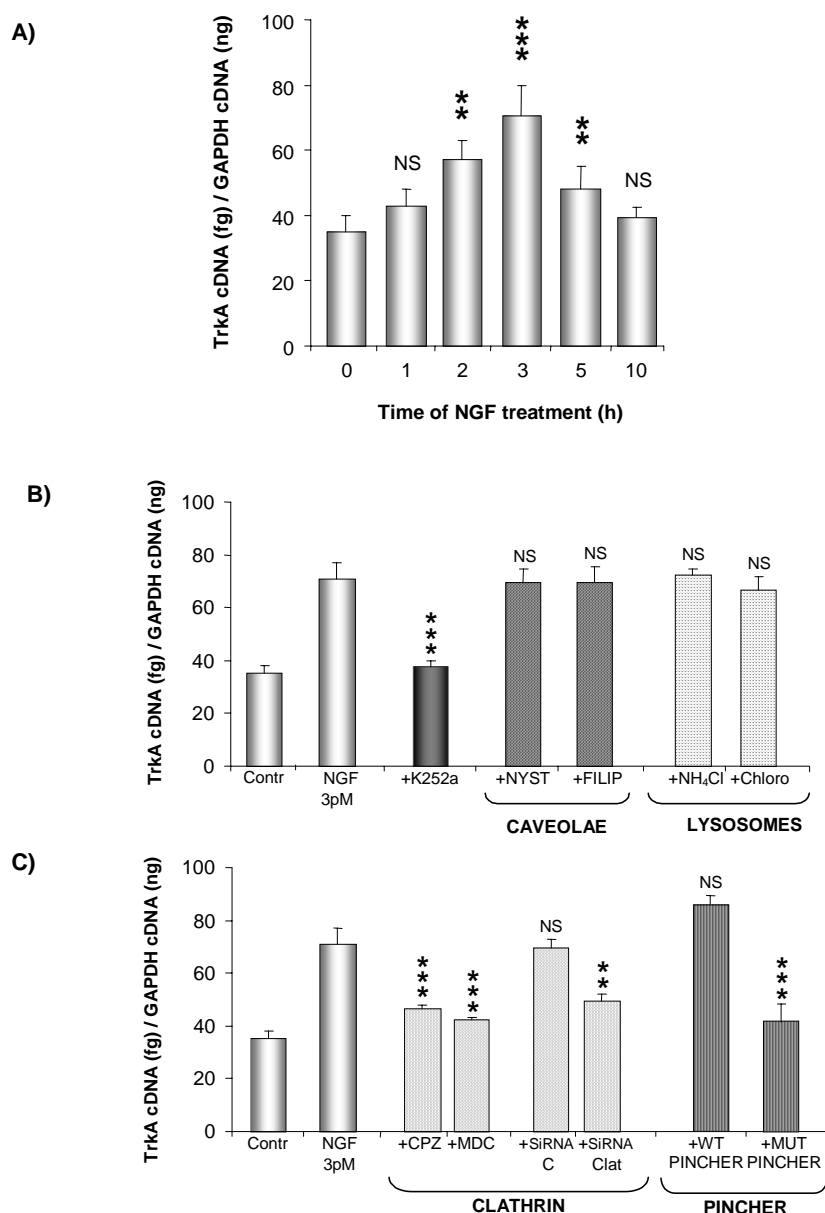


Fig. 6 TrkA mRNA synthesis after NGF treatment in HASMC

A) *Kinetics of TrkA mRNA synthesis.* Cells were treated with NGF (3pM) for 0, 1, 2, 3, 5 and 10h and expression of TrkA mRNA was measured by online Q-PCR (Lightcycler®). Data are expressed as TrkA cDNA (fg) / GAPDH cDNA (ng) and are presented as means (blocks) ± S.E.M. (bars) of 3 independent experiments performed in duplicate (NS: non-significant; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ versus control).

B) and C) *Mechanisms involved in generating the signal responsible for TrkA mRNA synthesis.* HASMC were treated for 3h with NGF (3pM) alone or after 1h pre-treatment with the kinase inhibitor K252a (100nM), the caveolae inhibitors nystatin (NYS 30µg/ml) or filipin (FILIP 5µg/ml), the lysosomes inhibitors chloroquine (Chloro 20µM) and ammonium chloride (NH₄Cl 10mM), or the clathrin inhibitors monodansylcadaverine (MDC 50µM) or chlorpromazine (CPZ 100µM). TrkA mRNA synthesis was also measured after NGF treatment (3pM) in cells transfected with the control non-specific siRNA (siRNA C 100nM), with the clathrin siRNA (siRNA Clat 100nM), with the wild-type form (WT 2µg) or the mutant form (MUT 2µg) of pincher. Expression of TrkA mRNA was measured by online Q-PCR (Lightcycler®). Data are expressed as TrkA cDNA (fg) / GAPDH cDNA (ng) and are presented as means (blocks) ± S.E.M. (bars) of two independent experiments performed in duplicate (NS: non-significant; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ versus control).

Our previous results in this work showed TrkA internalisation and total degradation after one NGF stimulation. Induction of HASMC proliferation at D2 after a second NGF stimulation therefore confirmed functionality of these newly synthesised TrkA receptors. Moreover, each new NGF stimulation, 24h after the precedent one, induced a greater HASMC proliferation (D2: $7\pm 1\%$ increase, $p < 0.01$; D3: $9\pm 1\%$ increase, $p < 0.001$; D4: $13\pm 2\%$ increase, $p < 0.001$), in parallel to the progressive increase in TrkA protein expression (Fig.7B).

Discussion

We here report that activation of the TrkA receptor by NGF at picomolar concentrations induces its internalisation in human airway smooth muscle cells, mediated through clathrin- and pincher-dependent mechanisms. The TrkA receptor is then degraded in lysosomes, followed by TrkA mRNA and protein synthesis. TrkA re-synthesis seems to be induced by a signal generated during TrkA internalisation, since clathrin and pincher inhibition block TrkA mRNA synthesis, whereas lysosomes inhibitors have no effect. Finally, newly synthesised TrkA receptors are functional and repeated NGF stimulations of HASMC induce an increase in TrkA protein expression, in parallel with an increase in NGF/TrkA-induced HASMC proliferation.

First, trafficking of the TrkA receptor in structural cells is a new finding. NGF was first known for its essential effect on neuronal cells, and trafficking of the TrkA receptor has been widely studied in these cells, in particular retrograde signalling (for reviews: (1, 39)). We show here that regulation of TrkA receptor expression also occurs in structural cells through receptors internalisation and degradation. This is in accordance with the reported trafficking of receptors with tyrosine kinase activity in other structural cells, for example receptor for epidermal growth factor in human kidney epithelial cells (32) or mouse NR6 fibroblasts (15), or receptor for insulin in adipocytes (30).

Internalisation of the TrkA receptor in HASMC occurs very rapidly after NGF activation, since treatment by NGF induces clearing of almost 90% of the receptor from the cell surface within 15min of NGF treatment. This is consistent with previous reports of TrkA internalisation in neuronal cells, in particular in PC12 cells where 66 to 70% of the surface receptors were internalised after 15 to 20min of NGF treatment (14, 22). By contrast, whereas Jullien and co-workers reported a maintained low level of TrkA expression at the cell surface even after prolonged NGF exposure (22), our study clearly indicates that the TrkA receptor is totally removed from the cell surface, and can not be detected anymore after 30min of NGF treatment.

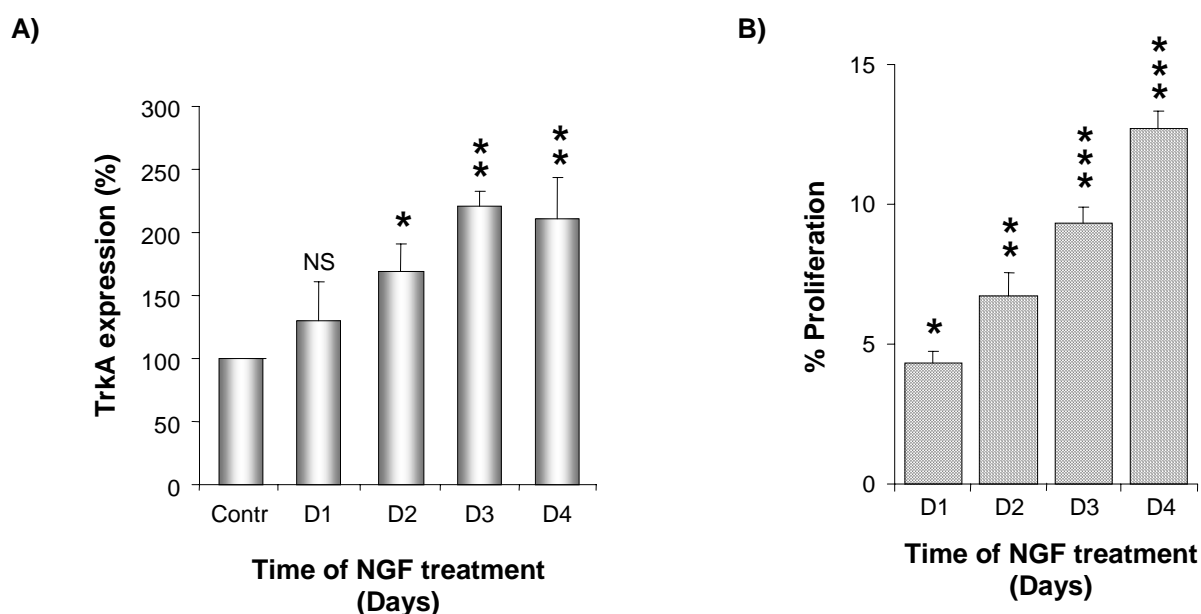


Fig. 7 Expression and functionality of neo-synthesised TrkA receptors after NGF repeated treatments in HASMC

A) *Expression of total TrkA protein.* HASMC were treated with NGF (3pM) during 24 (Day 1, D1), 48 (Day 2, D2), 72 (Day 3, D3) or 96h (Day 4, D4) and the increase in total TrkA protein was visualised each day by Western blotting. The graph represents the quantification of the amount of total TrkA protein measured in treated cells as compared with control untreated cells (Contr). Data are expressed as a percentage of increase in TrkA expression compared to controls and are presented as means (blocks) \pm S.E.M. (bars) of three experiments performed in duplicate (NS: non-significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ versus control).

B) *HASMC proliferation.* Cells were treated as described above and cell proliferation was measured each day after NGF stimulation (3pM) by the XTT technique, as described in Material and Methods. Data are expressed as a percentage of proliferation compared to untreated control cells and are presented as means (blocks) \pm S.E.M. (bars) of three experiments performed in triplicate (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ versus control).

However, concentrations of NGF tested were very different, in the picomolar range for our study, in the nanomolar range for Jullien and co-workers. This suggests that trafficking of the TrkA receptor mechanisms may differ in function of the dose of NGF tested. The mechanisms of TrkA trafficking may also differ between neuronal and structural cells, and need therefore to be further elucidated.

In our study conducted on structural cells, internalisation of the TrkA receptor was blocked when pre-treating airway smooth muscle cells with the tyrosine-kinase inhibitor K252a. In neuronal cells, a role for the TrkA kinase in receptor internalisation is still controversial: some studies showed that blocking TrkA kinase with K252a inhibited TrkA internalisation (16, 40, 54), whereas other studies did not find any blockade of TrkA internalisation after cell treatment with K252a (22, 23). A recent study suggested that TrkA kinase activity may not directly participate into TrkA internalisation, but rather into targeting TrkA receptors to late endosomes and lysosomes, once they have been internalised (42). Our results might indicate that activation of the TrkA kinase participate into TrkA internalisation in HASMC, but since these mechanisms are controversial even in neuronal cells, this should be further investigated.

Inhibition of TrkA internalisation by clathrin inhibitors and siRNA Clat shows involvement of clathrin in this mechanism. These result is in accordance with other studies showing a rapid endocytosis of the TrkA receptor in a clathrin-dependent manner in PC12 cells (13), and in neurons in primary culture, from hippocampus (2), or from dorsal root ganglia (18). However, inhibition of TrkA internalisation was not total, suggesting other mechanisms to participate to TrkA internalisation in HASMC. TrkA activation has been shown at cell membrane where macropinocytosis occurs (21, 44), and a membrane trafficking protein called pincher (for pinocytic chaperone) that mediates TrkA internalisation has been identified (44, 49). We have shown in our study that pincher is constitutively expressed in HASMC. This protein has been initially identified in PC12 cells (44) and later in peripheral and central neurons (49). This is the first time that pincher protein expression is described in structural cells of the airways, but this result is in accordance with high levels of pincher mRNA expression observed in the lung (44). Overexpression of pincher in HASMC enhanced NGF-induced internalisation of the TrkA receptor, whereas a dominant inhibitory mutant form of pincher inhibited this internalisation. These results are in accordance with data obtained in neuronal cells (44, 49), and suggest that pincher plays a role in TrkA internalisation also in structural cells. Although it has been shown that pincher- and clathrin-mediated internalisation of the TrkA receptor may be independent mechanisms in neuronal cells (44, 49), our results show that both clathrin- and pincher-dependent mechanisms are activated in HASMC to induce TrkA internalisation. A third mechanism has been proposed in TrkA internalisation occurring in neuronal cells and involving caveolae (58), since TrkA expression has been shown in cholesterol-enriched membranes in

which caveolae are internalised (4, 19) However, TrkA internalisation in a caveolae-dependent manner has never been clearly evidenced. We have shown in our study that internalisation of the TrkA receptor in HASMC after NGF treatment was not modified by inhibitors that complex cholesterol and unsettle caveolae structure, thus preventing internalisation by this mechanism. Caveolae have been evidenced in airway smooth muscle cells (12, 31), but our result suggest that caveolae do not participate into TrkA internalisation in HASMC.

Analysis of the total cellular amount of the TrkA receptor at longer times of NGF treatment showed a decrease in total TrkA occurring within 1h of NGF treatment. These data suggest that internalised receptors are further degraded. Experiments conducted with inhibitors of lysosomal enzymes showed a total inhibition of TrkA degradation, indicating that TrkA degradation occurs in lysosomes. This result is in agreement with other studies conducted in PC12 cells, where lysosomes inhibitors blocked TrkA degradation (22), and where the TrkA receptor was co-localized with lysobisphosphatidic acid, a marker for the inner membrane of late endosomes and lysosomes (42). This result is also in agreement with degradation of other receptors with tyrosine-kinase activity, for example EGF-induced EGF receptor degradation in lysosomes evidenced in mouse 3T3 fibroblasts (29), or in modified mouse fibroblasts NR6 (27). We observed that TrkA receptor expression totally disappeared in HASMC after 5h of NGF treatment, suggesting that all TrkA receptors expressed in HASMC are activated by NGF and further degraded. This result may also suggest that intracellular pre-formed TrkA pools do not exist in HASMC, and this may be in accordance with our TrkA Western blotting studies, showing a unique band at 140kDa mapping the mature TrkA receptor, whereas an immature TrkA form of 110kDa has been evidenced with the same antibody in PC12 cells (22). Finally, as TrkA expression totally disappears after 5h of NGF treatment, suggesting TrkA total degradation, it seems improbable that some TrkA receptors traffick to the recycling pathway, as it has been demonstrated in Chinese hamster ovary fibroblasts (57), or in PC12 cells (7).

A neo-synthesis of the TrkA receptor was evidenced in our study, with a maximal increase in TrkA mRNA levels after 3h of NGF treatment. We have shown in this study that this TrkA mRNA synthesis was blocked by inhibition of TrkA internalisation. This is an original result, suggesting that the signal responsible for TrkA re-synthesis is generated during TrkA internalisation involving clathrin- and pincher-dependent mechanisms. This hypothesis seems to be confirmed since blocking TrkA degradation in lysosomes, which occurs after TrkA internalisation, does not affect TrkA mRNA synthesis. Internalisation of the TrkA receptor in neuronal cells involving clathrin (14, 18) and pincher (44, 49) induces formation of signalling endosomes that serve as a signalling platform and help contacts between TrkA receptors and intracellular proteins, in particular effectors of the ERK1/2 pathway, such as Rap1, Raf, MEK1/2 and ERK1/2, but also of the

PI3K and PLC γ pathways (8, 13, 14, 52, 55). Some of these effectors might therefore participate into generation of the signal inducing TrkA re-synthesis in HASMC.

TrkA mRNA synthesis was followed by TrkA protein synthesis with detection of TrkA protein expression again at the cell surface after 10h of NGF treatment (Data not shown). Kinetics of surface TrkA expression followed total TrkA expression, suggesting that most of the TrkA receptors neo-synthesized are re-expressed at the cell membrane. The increase in TrkA expression observed after NGF treatment is very surprising, since endocytic trafficking targeting receptors to lysosomes induce rather a down-regulation of the total number of receptors at the cell surface. This has been evidenced for other tyrosine-kinase receptors such as for the EGF receptor *in vitro* in a murine fibroblast B82 cell line (51) or *in vivo* in several organs in the rat (53), for the TrkB receptor in primary cultures of cerebellar granule neurons (45), and also for the TrkA receptor itself *in vitro* in rat cortical neurons (28). Moreover, we have shown that NGF repeated stimulations of HASMC induced a progressive increase in TrkA protein expression, in parallel with an increase in NGF-induced TrkA-dependent HASMC proliferation. Our results therefore suggest that an up-regulation of TrkA expression can occur after NGF-induced TrkA activation in the airway smooth muscle, with progressive increased expression of functional TrkA receptors, leading to an increased smooth muscle proliferation. Since TrkA receptors are expressed on the human airway smooth muscle *in vivo* (41), such a mechanism might be important in airway diseases such as asthma, where increased NGF levels have been found (5, 26, 38, 50).

In conclusion, we report in this study that activation of the TrkA receptor by NGF at picomolar concentrations causes its internalisation mediated by clathrin- and pincher-dependent pathways, followed by lysosomal degradation. This adds to the knowledge about trafficking of the TrkA receptor in structural cells, that had never been studied before. We have also shown that TrkA receptors were neo-synthesized and re-expressed in HASMC, with increase in TrkA protein expression associated with increase in HASMC NGF/TrkA-dependent proliferation. These results suggest existence of a regulatory mechanism in HASMC controlling TrkA expression in function of its activation, leading to potentiation of NGF TrkA-dependent effects on the airway smooth muscle, in particular HASMC proliferation.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr Christian Muller for his help in immunofluorescence experiments and confocal microscopy studies. The authors also wish to thank Dr Simon Haleboua for kindly providing WT and MUT pincher plasmids as well as rabbit anti-pincher antibodies, and Dr Julie Rosenbaum for her technical advices.

References

1. Barker, P. A., N. K. Hussain, and P. S. McPherson. 2002. Retrograde signaling by the neurotrophins follows a well-worn trk. *Trends Neurosci* **25**:379-81.
2. Beattie, E. C., C. L. Howe, A. Wilde, F. M. Brodsky, and W. C. Mobley. 2000. NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *J Neurosci* **20**:7325-33.
3. Beattie, M. S., A. W. Harrington, R. Lee, J. Y. Kim, S. L. Boyce, F. M. Longo, J. C. Bresnahan, B. L. Hempstead, and S. O. Yoon. 2002. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* **36**:375-86.
4. Bilderback, T. R., V. R. Gazula, M. P. Lisanti, and R. T. Dobrowsky. 1999. Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem* **274**:257-63.
5. Bonini, S., A. Lambiase, S. Bonini, F. Angelucci, L. Magrini, L. Manni, and L. Aloe. 1996. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10955-60.
6. Chao, M. V. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* **4**:299-309.
7. Chen, Z. Y., A. Ieraci, M. Tanowitz, and F. S. Lee. 2005. A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of trk neurotrophin receptors. *Mol Biol Cell* **16**:5761-72.
8. Delcroix, J. D., J. S. Valletta, C. Wu, S. J. Hunt, A. S. Kowal, and W. C. Mobley. 2003. NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* **39**:69-84.
9. Freund-Michel, V., C. Bertrand, and N. Frossard. 2006. TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation. *Cell Signal* **18**:621-7.
10. Freund, V., F. Pons, V. Joly, E. Mathieu, N. Martinet, and N. Frossard. 2002. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Respir J* **20**:458-63.
11. Godfrey, E. W., and E. M. Shooter. 1986. Nerve growth factor receptors on chick embryo sympathetic ganglion cells: binding characteristics and development. *J Neurosci* **6**:2543-50.
12. Gosens, R., G. L. Stelmack, G. Dueck, K. D. McNeill, A. Yamasaki, W. T. Gerthoffer, H. Unruh, A. S. Gounni, J. Zaagsma, and A. J. Halayko. 2006. Role of caveolin-1 in p42/p44 MAP kinase activation and proliferation of human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**:L523-34.
13. Grimes, M. L., E. Beattie, and W. C. Mobley. 1997. A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:9909-14.
14. Grimes, M. L., J. Zhou, E. C. Beattie, E. C. Yuen, D. E. Hall, J. S. Valletta, K. S. Topp, J. H. LaVail, N. W. Bunnett, and W. C. Mobley. 1996. Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci* **16**:7950-64.
15. Haugh, J. M., A. C. Huang, H. S. Wiley, A. Wells, and D. A. Lauffenburger. 1999. Internalized epidermal growth factor receptors participate in the activation of p21(ras) in fibroblasts. *J Biol Chem* **274**:34350-60.
16. Heerssen, H. M., M. F. Pazyra, and R. A. Segal. 2004. Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons. *Nat Neurosci* **7**:596-604.
17. Howe, C. L., and W. C. Mobley. 2005. Long-distance retrograde neurotrophic signaling. *Curr Opin Neurobiol* **15**:40-8.
18. Howe, C. L., J. S. Valletta, A. S. Rusnak, and W. C. Mobley. 2001. NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* **32**:801-14.
19. Huang, C. S., J. Zhou, A. K. Feng, C. C. Lynch, J. Klumperman, S. J. DeArmond, and W. C. Mobley. 1999. Nerve growth factor signaling in caveolae-like domains at the plasma membrane. *J Biol Chem* **274**:36707-14.
20. Jing, S., P. Tapley, and M. Barbacid. 1992. Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* **9**:1067-79.
21. Jullien, J., V. Guili, E. A. Derrington, J. L. Darlix, L. F. Reichardt, and B. B. Rudkin. 2003. Trafficking of TrkA-green fluorescent protein chimerae during nerve growth factor-induced differentiation. *J Biol Chem* **278**:8706-16.
22. Jullien, J., V. Guili, L. F. Reichardt, and B. B. Rudkin. 2002. Molecular kinetics of nerve growth factor receptor trafficking and activation. *J Biol Chem* **277**:38700-8.
23. Kahle, P., P. A. Barker, E. M. Shooter, and C. Hertel. 1994. p75 nerve growth factor receptor modulates p140trkA kinase activity, but not ligand internalization, in PC12 cells. *J Neurosci Res* **38**:599-606.

24. Kaplan, D. R., B. L. Hempstead, D. Martin-Zanca, M. V. Chao, and L. F. Parada. 1991. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* **252**:554-8.
25. Kaplan, D. R., D. Martin-Zanca, and L. F. Parada. 1991. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* **350**:158-60.
26. Kassel, O., F. de Blay, C. Duvernelle, C. Olgart, D. Israel-Biet, P. Krieger, L. Moreau, C. Muller, G. Pauli, and N. Frossard. 2001. Local increase in the number of mast cells and expression of nerve growth factor in the bronchus of asthmatic patients after repeated inhalation of allergen at low-dose. *Clin Exp Allergy* **31**:1432-40.
27. Kil, S. J., M. Hobert, and C. Carlin. 1999. A leucine-based determinant in the epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain is required for the efficient transport of ligand-receptor complexes to lysosomes. *J Biol Chem* **274**:3141-50.
28. Knusel, B., H. Gao, T. Okazaki, T. Yoshida, N. Mori, F. Hefti, and D. R. Kaplan. 1997. Ligand-induced down-regulation of Trk messenger RNA, protein and tyrosine phosphorylation in rat cortical neurons. *Neuroscience* **78**:851-62.
29. Kornilova, E., T. Sorkina, L. Beguinot, and A. Sorkin. 1996. Lysosomal targeting of epidermal growth factor receptors via a kinase-dependent pathway is mediated by the receptor carboxyl-terminal residues 1022-1123. *J Biol Chem* **271**:30340-6.
30. Kublaoui, B., J. Lee, and P. F. Pilch. 1995. Dynamics of signaling during insulin-stimulated endocytosis of its receptor in adipocytes. *J Biol Chem* **270**:59-65.
31. Kuo, K. H., A. M. Herrera, and C. Y. Seow. 2003. Ultrastructure of airway smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol* **137**:197-208.
32. Kuwada, S. K., K. A. Lund, X. F. Li, P. Cliften, K. Amsler, L. K. Opreko, and H. S. Wiley. 1998. Differential signaling and regulation of apical vs. basolateral EGFR in polarized epithelial cells. *Am J Physiol* **275**:C1419-28.
33. Lee, R., P. Kermani, K. K. Teng, and B. L. Hempstead. 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**:1945-8.
34. Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**:1154-62.
35. Levi-Montalcini, R., and P. U. Angeletti. 1966. Second symposium on catecholamines. Modification of sympathetic function. *Immunosympathectomy. Pharmacol Rev* **18**:619-28.
36. Martin-Zanca, D., S. H. Hughes, and M. Barbacid. 1986. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* **319**:743-8.
37. Meakin, S. O., and E. M. Shooter. 1991. Tyrosine kinase activity coupled to the high-affinity nerve growth factor-receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:5862-6.
38. Olgart Hoglund, C., F. de Blay, J. P. Oster, C. Duvernelle, O. Kassel, G. Pauli, and N. Frossard. 2002. Nerve growth factor levels and localisation in human asthmatic bronchi. *Eur Respir J* **20**:1110-6.
39. Reichardt, L. F., and W. C. Mobley. 2004. Going the distance, or not, with neurotrophin signals. *Cell* **118**:141-3.
40. Reynolds, A. J., S. E. Bartlett, and I. A. Hendry. 1998. Signalling events regulating the retrograde axonal transport of 125I-beta nerve growth factor in vivo. *Brain Res* **798**:67-74.
41. Ricci, A., L. Felici, S. Mariotta, F. Mannino, G. Schmid, C. Terzano, G. Cardillo, F. Amenta, and E. Bronzetti. 2004. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**:12-9.
42. Saxena, S., C. L. Howe, J. M. Cosgaya, P. Steiner, H. Hirling, J. R. Chan, J. Weis, and A. Kruttgen. 2005. Differential endocytic sorting of p75NTR and TrkA in response to NGF: a role for late endosomes in TrkA trafficking. *Mol Cell Neurosci* **28**:571-87.
43. Senger, D. L., and R. B. Campenot. 1997. Rapid retrograde tyrosine phosphorylation of trkA and other proteins in rat sympathetic neurons in compartmented cultures. *J Cell Biol* **138**:411-21.
44. Shao, Y., W. Akmentin, J. J. Toledo-Aral, J. Rosenbaum, G. Valdez, J. B. Cabot, B. S. Hilbush, and S. Haleboua. 2002. Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes. *J Cell Biol* **157**:679-91.
45. Sommerfeld, M. T., R. Schweigreiter, Y. A. Barde, and E. Hoppe. 2000. Down-regulation of the neurotrophin receptor TrkB following ligand binding. Evidence for an involvement of the proteasome and differential regulation of TrkA and TrkB. *J Biol Chem* **275**:8982-90.
46. Sutter, A., R. J. Riopelle, R. M. Harris-Warrick, and E. M. Shooter. 1979. Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J Biol Chem* **254**:5972-82.
47. Thoenen, H., C. Bandtlow, and R. Heumann. 1987. The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **109**:145-78.
48. Ure, D. R., and R. B. Campenot. 1997. Retrograde transport and steady-state distribution of 125I-nerve growth factor in rat sympathetic neurons in compartmented cultures. *J Neurosci* **17**:1282-90.
49. Valdez, G., W. Akmentin, P. Philippidou, R. Kuruvilla, D. D. Ginty, and S. Haleboua. 2005. Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors. *J Neurosci* **25**:5236-47.
50. Virchow, J. C., P. Julius, M. Lommatzsch, W. Luttmann, H. Renz, and A. Braun. 1998. Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. *Am J Respir Crit Care Med* **158**:2002-5.
51. Wiley, H. S., J. J. Herbst, B. J. Walsh, D. A. Lauffenburger, M. G. Rosenfeld, and G. N. Gill. 1991. The role of tyrosine kinase activity in endocytosis, compartmentation, and down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **266**:11083-94.
52. Wu, C., C. F. Lai, and W. C. Mobley. 2001. Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J Neurosci* **21**:5406-16.
53. Yanai, S., Y. Sugiyama, T. Iga, T. Fuwa, and M. Hanano. 1990. Kinetic analysis of the downregulation of epidermal growth factor receptors in rats in vivo. *Am J Physiol* **258**:C593-8.
54. Ye, H., R. Kuruvilla, L. S. Zweifel, and D. D. Ginty. 2003. Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron* **39**:57-68.
55. York, R. D., H. Yao, T. Dillon, C. L. Ellig, S. P. Eckert, E. W. McCleskey, and P. J. Stork. 1998. Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* **392**:622-6.
56. Yuen, E. C., and W. C. Mobley. 1995. Therapeutic applications of neurotrophic factors in disorders of motor neurons and peripheral nerves. *Mol Med Today* **1**:278-86.
57. Zapf-Colby, A., and J. M. Olefsky. 1998. Nerve growth factor processing and trafficking events following TrkA-mediated endocytosis. *Endocrinology* **139**:3232-40.
58. Zweifel, L. S., R. Kuruvilla, and D. D. Ginty. 2005. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci* **6**:615-25.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Suite à des travaux récents ayant montré une augmentation des taux de NGF dans les voies aériennes des patients asthmatiques, le but initial de ce travail a été d'étudier les sources potentielles de NGF dans les voies aériennes. En effet, nous avons montré que les cellules structurales des voies aériennes sécrètent le NGF de manière constitutive, et que cette expression est augmentée en conditions inflammatoires, et diminuée après traitement par des glucocorticoïdes anti-inflammatoires [**Publication N°1**] et [**Publication N°2**]. Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle que le NGF pouvait jouer dans l'asthme et nous avons proposé un rôle du NGF dans le remodelage bronchique des voies aériennes, en montrant son effet prolifératif sur les cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture primaire [**Publication N°3**]. Enfin, nous avons étudié les mécanismes d'internalisation, de dégradation et de resynthèse du récepteur TrkA dans les cellules musculaires lisses bronchiques humaines [**Publication N°4**].

Expression constitutive du NGF dans les cellules structurales des voies aériennes

La sécrétion de NGF par les cellules structurales des voies aériennes a été mise en évidence très récemment. Nous avons montré au laboratoire que les fibroblastes pulmonaires (*Olgart et Frossard, 2001*), les cellules épithéliales humaines A549 (*Pons et al., 2001*) [**Publication N°1**] et les cellules musculaires lisses bronchiques (*Freund et al., 2002*) [**Publication N°2**] sécrètent *in vitro* du NGF de manière constitutive. Ces études sont en accord avec la synthèse de NGF par des cellules structurales d'autres origines, comme les fibroblastes cutanés humains (*Murase et al., 1992 ; Cartwright et al., 1994*), les cellules épithéliales intestinales humaines (*Varilek et al., 1995*), les kératinocytes humains (*Pincelli, 2000*) ou les cellules musculaires lisses vasculaires humaines (*Ueyama et al., 1993 ; Creedon et Tuttle, 1997*). Ces résultats *in vitro* ont été confirmés par des études *in vivo* réalisées au laboratoire sur des coupes de biopsies bronchiques de volontaires sains contrôles non asthmatiques montrant un immunomarquage du NGF dans les fibroblastes, l'épithélium et le muscle lisse bronchique (*Kassel et al., 2001 ; Olgart Hoglund et al., 2002*).

Ainsi, le NGF est exprimé de manière constitutive dans les voies aériennes des sujets sains ; il y joue probablement un rôle physiologique, encore inconnu pour l'instant, qu'il faudra étudier. Nous pourrions envisager pour cela d'inhiber l'expression du NGF ou de ses récepteurs

TrkA et p75^{NTR} en générant des souris dont le gène de ces protéines est délété, ou à l'aide de la technique siRNA in vivo. Cette inhibition d'expression pourra se faire de manière tissu-spécifique au niveau du poumon en utilisant un promoteur spécifique de la protéine CCSP (« Clara cell secretory protein ») exprimée dans les cellules de Clara.

Régulation de l'expression du NGF par les cellules structurales des voies aériennes

De manière intéressante, une régulation de la sécrétion de NGF a été mise en évidence en fonction de la densité cellulaire dans les fibroblastes pulmonaires (*Olgart et Frossard, 2001*) et les cellules musculaires lisses bronchiques (*Freund et al., données non publiées*). Le NGF est sécrété en quantités importantes quand les jonctions cellulaires sont lâches, puis sa sécrétion diminue au fur et à mesure que les cellules arrivent à confluence. Cette régulation de la sécrétion de NGF en fonction de la densité cellulaire a été montrée dans d'autres cellules humaines comme dans les cellules épithéliales (*Di Marco et al., 1993*), les fibroblastes cutanés humains (*Murase et al., 1992*) ou les cellules musculaires lisses vésicales (*Clemow et Tuttle, 1998*).

Le rôle de cette régulation n'est pas connu pour l'instant, mais suggère que la sécrétion de NGF, inversement proportionnelle à la densité cellulaire, pourrait conférer un rôle au NGF dans la prolifération et la différenciation cellulaire, ou encore dans le développement des tissus en particulier dans les voies aériennes.

La régulation majeure mise en évidence dans les travaux réalisés au laboratoire sur le NGF est l'augmentation de son expression par les cellules structurales des voies aériennes en conditions inflammatoires, mimées *in vitro* par le traitement des cellules en culture à l'aide des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α (*Pons et al., 2001 ; Olgart et Frossard, 2001 ; Freund et al., 2002*), **[Publication N°1]** et **[Publication N°2]**. Cette augmentation est en accord avec une augmentation de la sécrétion de NGF en conditions inflammatoires mise en évidence dans d'autres cellules comme les fibroblastes de rat (*Lindholm et al., 1987*), les fibroblastes cutanés humains (*Hattori et al., 1993*) ou des lignées cellulaires issues de glioblastomes ou d'astrocytomes humains (*Emmett et al., 1997*). Ces résultats sont également en accord avec une étude récente montrant une stimulation

de la libération de NGF par l'IL-1 β à partir de segments de bronche humaine *in vitro* (Frossard et al., 2005). Des taux importants d'IL-1 β et de TNF α ont été mis en évidence dans un certain nombre de maladies inflammatoires, et en particulier dans l'asthme (Barnes et al., 1998). Les cellules inflammatoires comme les macrophages, les mastocytes et les lymphocytes sont des sources de ces cytokines dans les voies aériennes. Ces cellules sont infiltrées dans la muqueuse bronchique des patients asthmatiques, et pourraient ainsi libérer ces cytokines à proximité des cellules structurales, stimulant ainsi la libération de NGF à partir de ces cellules.

Ainsi en conditions inflammatoires, les cellules structurales pourraient participer à l'augmentation des taux de NGF mise en évidence dans les voies aériennes des patients asthmatiques (Virchow et al., 1998 ; Kassel et al., 2001 ; Olgart Hoglund et al., 2002). Il a été montré *in vivo* que les cellules inflammatoires infiltrées dans les voies aériennes des patients asthmatiques sont également une source de NGF (Olgart Hoglund et al., 2002). Ces cellules pourraient ainsi également contribuer à l'augmentation du NGF mesurée dans les voies aériennes en cas d'asthme.

Il faudra maintenant étudier les mécanismes intracellulaires activés par les cytokines pro-inflammatoires dans les cellules structurales et responsables de la sécrétion de NGF. Le facteur de transcription AP-1 est souvent activé par ces cytokines inflammatoires, et plusieurs éléments de réponse pour AP-1 ont été décrits dans le promoteur du gène codant pour le NGF ; il pourrait ainsi participer aux mécanismes conduisant à la stimulation de la synthèse de NGF en conditions inflammatoires.

Les glucocorticoïdes sont connus pour leurs effets anti-inflammatoires et leur efficacité clinique dans le traitement de l'asthme. Nous avons montré que ces molécules peuvent diminuer la libération constitutive de NGF à partir des fibroblastes pulmonaires (Olgart et Frossard, 2001) ou des cellules épithéliales A549 (Pons et al., 2001) [**Publication N°1**]. De plus, les glucocorticoïdes inhibent également la sécrétion de NGF induite en conditions inflammatoires. Ces données sont en accord avec les données obtenues dans d'autres types cellulaires, où les glucocorticoïdes induisent une inhibition de la libération de différentes cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8, l'IL-11 ou l'éotaxine (Lilly et al., 1997 ; Barnes et al., 1998 ; Ek et al., 1999). Ces données suggèrent que les cellules structurales des voies aériennes comme les fibroblastes pulmonaires ou

les cellules épithéliales bronchiques pourraient être des cibles de l'activité anti-inflammatoire des glucocorticoïdes dans l'asthme, en bloquant la sécrétion excessive de NGF par ces cellules en conditions inflammatoires.

Les mécanismes activés par les glucocorticoïdes et responsables de ce blocage doivent être maintenant étudiés. Ils pourraient résulter d'une diminution de la stabilité de l'ARNm du NGF, ou d'une inhibition de la transcription du gène du NGF : une interaction a notamment été proposée entre les glucocorticoïdes et le facteur de transcription AP-1 pouvant être impliquée dans l'expression du NGF dans les fibroblastes de rat (Berninger et al., 1993).

Rôle du NGF dans les voies aériennes

Le rôle du NGF dans l'inflammation et l'hyperréactivité bronchique existant dans l'asthme a été étudié dans différents modèles *in vivo* et *in vitro* (Braun et al., 1998 ; Hoyle et al., 1998 ; de Vries et al., 1999 ; de Vries et al., 2001 ; De Vries et al., 2002 ; Path et al., 2002 ; Glaab et al., 2003 ; Kerzel et al., 2003 ; Bachar et al., 2004 ; Frossard et al., 2005 ; Wu et Dey, 2006). L'action biologique du NGF à des concentrations picomolaires résulte de l'activation de son récepteur TrkA. L'expression constitutive du récepteur TrkA a été montrée *in vivo* dans les bronches humaines, et en particulier par le muscle lisse bronchique (Ricci et al., 2004). Les voies de signalisation activées par le récepteur TrkA décrites dans les cellules neuronales sont identiques à celles induisant la prolifération du muscle lisse bronchique après activation par d'autres facteurs de croissance, comme l'EGF et le PDGF. Nous avons alors étudié un rôle potentiel du NGF dans la prolifération du muscle lisse bronchique via l'activation de son récepteur TrkA [**Publication N°3**]. Nous avons ainsi montré que le NGF à concentrations picomolaires induit la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques en culture primaire, via l'activation du récepteur TrkA. Ces données sont en accord avec la capacité du NGF à induire la prolifération d'autres cellules structurales humaines comme les cellules endothéliales (Raychaudhuri et al., 2001 ; Steinle et Granger, 2003 ; Moser et al., 2004), les fibroblastes (Lambert et al., 2004) ou les cellules épithéliales de différentes origines (Di Marco et al., 1993 ; Descamps et al., 1998 ; You et al., 2000). Mais toutes ces études avaient été réalisées en utilisant des concentrations de NGF de l'ordre du nanomolaire, concentrations similaires à celles utilisées dans les cellules neuronales afin d'y induire une différenciation et une

survie NGF-dépendante. Nous avons voulu utiliser des concentrations correspondant mieux à l'affinité du NGF pour son récepteur TrkA : en effet la constante de dissociation K_D caractéristique de l'affinité du NGF pour son récepteur TrkA est de 10 à 20pM dans les neurones sensitifs ou sympathiques (*Sutter et al., 1979 ; Godfrey et Shooter, 1986*). Nous avons ainsi montré de manière originale que le NGF, à des concentrations picomolaires, est capable d'induire l'activation du récepteur TrkA exprimé sur les cellules musculaires lisses bronchiques humaines, induisant la prolifération de ces cellules.

Nous avons ensuite étudié la cascade de signalisation impliquée dans cet effet prolifératif du NGF. En effet, les voies de signalisation activées par le récepteur TrkA sont bien décrites dans les cellules neuronales, et en particulier les cellules PC12, mais très peu d'éléments sont connus dans les cellules structurales. Nous avons ainsi montré que la prolifération NGF-dépendante des cellules musculaires lisses bronchiques résulte de l'activation de deux voies de signalisation bien distinctes : d'une part l'activation de la PKC conduisant à la phosphorylation de la MAPK p38, et d'autre part l'activation de la voie ras/raf conduisant à l'activation de la MAPK ERK1/2, et l'activation de ces deux voies est nécessaire pour induire l'effet prolifératif du NGF. Ces voies de signalisation avaient été décrites dans les cellules neuronales, en particulier dans les cellules PC12 où elles contribuent à la différenciation induite par le NGF (*Chao, 2003*). L'implication de la voie ERK1/2 avait déjà été décrite dans l'effet prolifératif du NGF dans les cellules endothéliales (*Steinle et Granger, 2003*) ou épithéliales (*Descamps et al., 1998*) humaines. Il s'agit par contre de la première implication de la voie de la MAPK p38 décrite dans un effet prolifératif induit par le NGF. Ces résultats sont en accord avec l'implication de la MAPK p38 dans l'effet prolifératif induit par d'autres facteurs de croissance comme le PDGF dans les cellules musculaires lisses vasculaires humaines (*Kavurma et Khachigian, 2003*) ou le FGF dans les cellules musculaires lisses bronchiques humaines (*Fernandes et al., 2004*).

Suite à ces résultats in vitro, il sera intéressant d'évaluer l'implication du NGF dans l'hyperplasie du muscle lisse bronchique in vivo. Cette étude pourra être réalisée en mettant en place au laboratoire un modèle murin de remodelage bronchique induit par une provocation allergénique chronique sur plusieurs mois, modèle décrit récemment dans la littérature (Akkoc et al., 2001 ; Tanaka et al., 2001 ; Shinagawa et Kojima, 2003 ; Tsuchiya et al., 2003). Ce modèle permet de reproduire plusieurs modifications structurales observées dans les voies aériennes des

patients asthmatiques, en particulier une fibrose sous-épithéliale et un épaissement du muscle lisse bronchique. Un pré-traitement par des anticorps bloquants du NGF dans ce modèle permettra d'apprécier le rôle potentiel du NGF dans l'épaississement du muscle lisse bronchique in vivo. En parallèle, nous pourrons utiliser la souris transgénique surexprimant le NGF de manière tissu-spécifique au niveau du poumon et réaliser la même administration chronique d'allergène. Ceci nous permettra d'apprécier une augmentation éventuelle du remodelage bronchique, et notamment un épaissement du muscle lisse bronchique, dans les voies aériennes de ces souris transgéniques en comparaison aux souris sauvages. Ces modèles permettront également d'apprécier in vivo le rôle du NGF dans d'autres modifications structurales observées dans les voies aériennes des patients asthmatiques, en particulier dans la fibrose sous-épithéliale, comme suggéré par plusieurs études in vitro (Micera et al., 2001 ; Kohyama et al., 2002).

D'autre part, il sera intéressant de voir si l'administration de NGF conduit elle-même à l'apparition de modifications structurales du muscle lisse dans les voies aériennes. Une administration unique de NGF a déjà été réalisée in vivo afin d'étudier le rôle du NGF dans l'hyperréactivité bronchique (de Vries et al., 1999). Il faudra mettre en place un modèle d'administration chronique de NGF afin d'évaluer à long terme son implication dans l'apparition des modifications structurales des voies aériennes.

Régulation de l'expression du récepteur TrkA par le NGF

Les mécanismes d'internalisation, de dégradation et de resynthèse du récepteur TrkA après activation par le NGF ont bien été étudiés dans les cellules neuronales. En effet, l'internalisation du récepteur entraîne sa disparition de la surface des cellules, et permet ainsi de stopper les effets du NGF TrkA-dépendants (Knusel et al., 1997 ; Sommerfeld et al., 2000), puis entraîne sa dégradation ou son recyclage. L'internalisation du récepteur TrkA dans les cellules neuronales conduit également à son transport rétrograde (Reichardt et Mobley, 2004).

Nous avons mis pour la première fois en évidence des mécanismes d'internalisation, de dégradation et de resynthèse du récepteur TrkA dans des cellules structurales [Publication N°4]. L'internalisation des récepteurs TrkA est très rapide dans les cellules musculaires lisses bronchiques après activation par le NGF, et est comparable à ce qui est observé dans les cellules neuronales, en particulier les cellules PC12 (Grimes et al., 1996 ; Jullien et al., 2002). Mais des différences ont

également été mises en évidence, notamment pour la dégradation du récepteur qui semble totale dans les cellules musculaires lisses bronchiques, alors qu'un niveau faible d'expression subsiste dans les cellules PC12 après activation par le NGF (Jullien *et al.*, 2002).

*Les inhibiteurs de clathrine n'ayant que partiellement bloqué l'internalisation du récepteur TrkA dans les cellules musculaires lisses bronchiques, nous avons étudié l'implication d'autres mécanismes dans l'internalisation du récepteur TrkA, en particulier l'implication des cavéolines et de la protéine Pincher découverte récemment (Shao *et al.*, 2002 ; Valdez *et al.*, 2005).*

La comparaison de nos résultats à ceux obtenus dans les cellules PC12 suggère qu'il existe des différences dans la dégradation du récepteur TrkA après activation par le NGF dans les cellules neuronales et les cellules structurales, qu'il faudra étudier plus en détail. Néanmoins, nous comparons ici des résultats obtenus dans différentes études, et il faudra en premier lieu vérifier que les différences observées ne sont pas dues à des conditions expérimentales différentes, et notamment une différence dans l'expression basale du récepteur TrkA entre les cellules neuronales et structurales.

Nous avons également montré dans cette étude qu'après dégradation dans les lysosomes, les récepteurs TrkA étaient resynthétisés et réexprimés en plus grande quantité qu'au départ, avant traitement des cellules par le NGF. Ce résultat est très surprenant, car l'internalisation et la dégradation d'autres récepteurs à tyrosine-kinase conduisent souvent à une diminution de l'expression de ces récepteurs à la surface des cellules neuronales : cela a été montré par exemple pour le récepteur de l'EGF (Yanai *et al.*, 1990 ; Wiley *et al.*, 1991), le récepteur TrkB (Sommerfeld *et al.*, 2000) ou le récepteur TrkA lui-même (Knusel *et al.*, 1997). Ainsi, dans les cellules musculaires lisses bronchiques humaines, l'activation du récepteur TrkA par le NGF conduit à une régulation positive de son expression, et les récepteurs néo-synthétisés sont fonctionnels. On peut alors imaginer que le NGF présent *in vivo* en grandes quantités dans les voies aériennes des patients asthmatiques pourrait induire une activation importante des récepteurs TrkA exprimés sur le muscle lisse bronchique. Cette activation pourrait alors conduire à une augmentation d'expression de ces récepteurs, et pourrait ainsi contribuer à potentialiser les effets du NGF dans l'asthme, et en particulier ses effets sur le muscle lisse bronchique.

Pour étayer cette hypothèse, nous pourrions évaluer l'expression du récepteur TrkA dans un modèle murin d'asthme, afin de comparer son expression à celle des souris naïves, et utiliser un pré-traitement par des anticorps bloquants du NGF afin de confirmer l'implication du NGF dans l'augmentation éventuelle observée. Ces résultats pourront être confirmés par l'étude de l'expression du récepteur TrkA dans les voies aériennes de la souris transgénique surexprimant le NGF de manière tissu-spécifique dans le poumon. Enfin, ces résultats devront être confirmés in vivo chez l'homme en comparant l'expression des récepteurs TrkA dans des biopsies bronchiques de donneurs sains contrôles et de patients asthmatiques.

Conclusion et perspectives thérapeutiques

Au début de nos travaux, le NGF était surtout connu pour son rôle dans la croissance et la survie des neurones. Nous avons contribué à la description d'un nouveau rôle du NGF dans les maladies inflammatoires des voies aériennes, en particulier dans l'asthme. En effet, un rôle du NGF s'est peu à peu affirmé dans les voies aériennes, et nous y avons contribué en apportant des informations sur sa sécrétion et la régulation de cette sécrétion dans les voies aériennes, sur son implication possible dans le remodelage bronchique, notamment dans l'hyperplasie du muscle lisse bronchique, et sur la régulation éventuelle de l'expression du récepteur TrkA après activation par le NGF dans les cellules structurales des voies aériennes. Le blocage des effets du NGF semble ainsi constituer une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement des maladies inflammatoires des voies aériennes, et dans l'asthme en particulier.

Un anticorps monoclonal anti-NGF humanisé appelé RN624 a par exemple été récemment testé en étude clinique chez l'homme et réduit la douleur dans l'ostéoarthrite (Hefli et al., 2006). Son utilisation pourrait être envisagée dans le traitement de l'asthme. Néanmoins, les anticorps monoclonaux peuvent entraîner l'apparition d'anticorps neutralisants et ainsi une perte d'efficacité. De plus, leur administration ne peut se faire par voie orale. La meilleure approche thérapeutique dans ce domaine semble donc le développement de molécules antagonistes du NGF de faible poids moléculaire, présentant un plus faible risque d'immunisation et pouvant être administrés par voie orale. Une étude récente montre qu'une molécule de petite taille mimant le domaine de liaison du récepteur TrkA au NGF, le domaine D5 extracellulaire, séquestre le NGF et empêche sa fixation sur ses récepteurs endogènes, conduisant ainsi à un blocage de l'inflammation et l'hyperréactivité

bronchique dans un modèle d'asthme chez le cobaye (*Watson et al., 2006*). Le blocage de la liaison du NGF à ses récepteurs semble ainsi constituer une nouvelle approche thérapeutique efficace dans un modèle animal d'asthme, et valide la recherche et le développement de petites molécules antagonistes bloquant cette liaison comme nouveaux traitements dans cette maladie.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abir, R., Fisch, B., Jin, S., Barnnet, M., Ben-Haroush, A., Felz, C., Kessler-Ickson, G., Feldberg, D., Nitke, S. et Ao, A. Presence of NGF and its receptors in ovaries from human fetuses and adults. *Mol Hum Reprod* 2005; **11**: 229-236.
- Aggarwal, B.B. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann Rheum Dis* 2000; **59 Suppl 1**: i6-16.
- Aguilar, R.C. et Wendland, B. Endocytosis of membrane receptors: two pathways are better than one. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 2679-2680.
- Akkoc, T., Tolunay, S., Barlan, I. et Basaran, M. Airway remodeling and serum total immunoglobulin E (IgE) levels in a murine model of asthma. *J Asthma* 2001; **38**: 585-591.
- Alam, M., Pravica, V., Fryer, A.A., Hawkins, C.P. et Hutchinson, I.V. Novel polymorphism in the promoter region of the human nerve growth-factor gene. *Int J Immunogenet* 2005; **32**: 379-382.
- Alderson, R.F., Curtis, R., Alterman, A.L., Lindsay, R.M. et DiStefano, P.S. Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro. *Brain Res* 2000; **871**: 210-222.
- Alessi, D.R., Saito, Y., Campbell, D.G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C.J. et Cowley, S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *Embo J* 1994; **13**: 1610-1619.
- Aloe, L., Bracci-Laudiero, L., Bonini, S. et Manni, L. The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy* 1997; **52**: 883-894.
- Aloe, L. et De Simone, R. NGF primed spleen cells injected in brain of developing rats differentiate into mast cells. *Int J Dev Neurosci* 1989; **7**: 565-573.
- Andjelkovic, M., Suidan, H.S., Meier, R., Frech, M., Alessi, D.R. et Hemmings, B.A. Nerve growth factor promotes activation of the alpha, beta and gamma isoforms of protein kinase B in PC12 pheochromocytoma cells. *Eur J Biochem* 1998; **251**: 195-200.
- Andsberg, G., Kokaia, Z. et Lindvall, O. Upregulation of p75 neurotrophin receptor after stroke in mice does not contribute to differential vulnerability of striatal neurons. *Exp Neurol* 2001; **169**: 351-363.
- Angeletti, R.H., Mercanti, D. et Bradshaw, R.A. Amino acid sequences of mouse 2.5S nerve growth factor. I. Isolation and characterization of the soluble tryptic and chymotryptic peptides. *Biochemistry* 1973; **12**: 90-100.
- Antonelli, A., Lapucci, G., Vigneti, E., Bonini, S. et Aloe, L. Human lung fibroblast response to NGF, IL-1beta, and dexamethasone. *Lung* 2005; **183**: 337-351.
- Armstrong, D.M., Brady, R., Hersh, L.B., Hayes, R.C. et Wiley, R.G. Expression of choline acetyltransferase and nerve growth factor receptor within hypoglossal motoneurons following nerve injury. *J Comp Neurol* 1991; **304**: 596-607.
- Ashcroft, M., Stephens, R.M., Hallberg, B., Downward, J. et Kaplan, D.R. The selective and inducible activation of endogenous PI 3-kinase in PC12 cells results in efficient NGF-mediated survival but defective neurite outgrowth. *Oncogene* 1999; **18**: 4586-4597.
- Atwal, J.K., Massie, B., Miller, F.D. et Kaplan, D.R. The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* 2000; **27**: 265-277.
- Auffray, I., Chevalier, S., Froger, J., Izac, B., Vainchenker, W., Gascan, H. et Coulombel, L. Nerve growth factor is involved in the supportive effect by bone marrow--derived stromal cells of the factor-dependent human cell line UT-7. *Blood* 1996; **88**: 1608-1618.
- Auger, K.R., Carpenter, C.L., Cantley, L.C. et Varticovski, L. Phosphatidylinositol 3-kinase and its novel product, phosphatidylinositol 3-phosphate, are present in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1989; **264**: 20181-20184.
- Aurikko, J.P., Ruotolo, B.T., Grossmann, J.G., Moncrieffe, M.C., Stephens, E., Leppanen, V.M., Robinson, C.V., Saarna, M., Bradshaw, R.A. et Blundell, T.L. Characterization of symmetric complexes of nerve growth factor and the ectodomain of the pan-neurotrophin receptor, p75NTR. *J Biol Chem* 2005; **280**: 33453-33460.
- Bachar, O., Adner, M., Uddman, R. et Cardell, L.O. Nerve growth factor enhances cholinergic innervation and contractile response to electric field stimulation in a murine in vitro model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; **34**: 1137-1145.
- Baldwin, A.N., Bitler, C.M., Welcher, A.A. et Shooter, E.M. Studies on the structure and binding properties of the cysteine-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR). *J Biol Chem* 1992; **267**: 8352-8359.
- Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H. et Lesslauer, W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 1993; **73**: 431-445.
- Barker, P.A. p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 2004; **42**: 529-533.
- Barker, P.A., Barbee, G., Misko, T.P. et Shooter, E.M. The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30645-30650.
- Barker, P.A., Lomen-Hoerth, C., Gensch, E.M., Meakin, S.O., Glass, D.J. et Shooter, E.M. Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J Biol Chem* 1993; **268**: 15150-15157.

- Barker, P.A., Miller, F.D., Large, T.H. et Murphy, R.A. Generation of the truncated form of the nerve growth factor receptor by rat Schwann cells. Evidence for post-translational processing. *J Biol Chem* 1991; **266**: 19113-19119.
- Barker, P.A. et Salehi, A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res* 2002; **67**: 705-712.
- Barker, P.A. et Shooter, E.M. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* 1994; **13**: 203-215.
- Barnes, P.J., Chung, K.F. et Page, C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev* 1998; **50**: 515-596.
- Barouch, R., Kazimirsky, G., Appel, E. et Brodie, C. Nerve growth factor regulates TNF-alpha production in mouse macrophages via MAP kinase activation. *J Leukoc Biol* 2001; **69**: 1019-1026.
- Battleman, D.S., Geller, A.I. et Chao, M.V. HSV-1 vector-mediated gene transfer of the human nerve growth factor receptor p75hNGFR defines high-affinity NGF binding. *J Neurosci* 1993; **13**: 941-951.
- Baud, V. et Karin, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 372-377.
- Bax, B., Blundell, T.L., Murray-Rust, J. et McDonald, N.Q. Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins. *Structure* 1997; **5**: 1275-1285.
- Baxter, R.M., Cohen, P., Obermeier, A., Ullrich, A., Downes, C.P. et Doza, Y.N. Phosphotyrosine residues in the nerve-growth-factor receptor (Trk-A). Their role in the activation of inositolphospholipid metabolism and protein kinase cascades in pheochromocytoma (PC12) cells. *Eur J Biochem* 1995; **234**: 84-91.
- Bayas, A., Kruse, N., Moriabadi, N.F., Weber, F., Hummel, V., Wohleben, G., Gold, R., Toyka, K.V. et Rieckmann, P. Modulation of cytokine mRNA expression by brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells. *Neurosci Lett* 2003; **335**: 155-158.
- Bazenet, C.E., Mota, M.A. et Rubin, L.L. The small GTP-binding protein Cdc42 is required for nerve growth factor withdrawal-induced neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 3984-3989.
- Beattie, E.C., Howe, C.L., Wilde, A., Brodsky, F.M. et Mobley, W.C. NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *J Neurosci* 2000; **20**: 7325-7333.
- Beattie, M.S., Harrington, A.W., Lee, R., Kim, J.Y., Boyce, S.L., Longo, F.M., Bresnahan, J.C., Hempstead, B.L. et Yoon, S.O. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 2002; **36**: 375-386.
- Benedetti, M., Levi, A. et Chao, M.V. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 7859-7863.
- Benzel, I., Barde, Y.A. et Casademunt, E. Strain-specific complementation between NRIF1 and NRIF2, two zinc finger proteins sharing structural and biochemical properties. *Gene* 2001; **281**: 19-30.
- Beraud, C., Henzel, W.J. et Baeuerle, P.A. Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 429-434.
- Berger, E.A. et Shooter, E.M. Evidence for pro-beta-nerve growth factor, a biosynthetic precursor to beta-nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**: 3647-3651.
- Bernd, P. et Greene, L.A. Association of 125I-nerve growth factor with PC12 pheochromocytoma cells. Evidence for internalization via high-affinity receptors only and for long-term regulation by nerve growth factor of both high- and low-affinity receptors. *J Biol Chem* 1984; **259**: 15509-15516.
- Berninger, B., Garcia, D.E., Inagaki, N., Hahnel, C. et Lindholm, D. BDNF and NT-3 induce intracellular Ca²⁺ elevation in hippocampal neurones. *Neuroreport* 1993; **4**: 1303-1306.
- Bertaux, O., Toselli-Mollereau, E., Auffray, C. et Devignes, M.D. Alternative usage of 5' exons in the chicken nerve growth factor gene: refined characterization of a weakly expressed gene. *Gene* 2004; **334**: 83-97.
- Bhakar, A.L., Roux, P.P., Lachance, C., Kryl, D., Zeindler, C. et Barker, P.A. The p75 neurotrophin receptor (p75NTR) alters tumor necrosis factor-mediated NF-kappaB activity under physiological conditions, but direct p75NTR-mediated NF-kappaB activation requires cell stress. *J Biol Chem* 1999; **274**: 21443-21449.
- Bhattacharyya, A., Watson, F.L., Pomeroy, S.L., Zhang, Y.Z., Stiles, C.D. et Segal, R.A. High-resolution imaging demonstrates dynein-based vesicular transport of activated Trk receptors. *J Neurobiol* 2002; **51**: 302-312.
- Bibel, M., Hoppe, E. et Barde, Y.A. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *Embo J* 1999; **18**: 616-622.
- Bierl, M.A., Jones, E.E., Crutcher, K.A. et Isaacson, L.G. 'Mature' nerve growth factor is a minor species in most peripheral tissues. *Neurosci Lett* 2005; **380**: 133-137.
- Bilderback, T.R., Gazula, V.R., Lisanti, M.P. et Dobrowsky, R.T. Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem* 1999; **274**: 257-263.
- Bischoff, S.C. et Dahinden, C.A. Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood* 1992; **79**: 2662-2669.
- Bode, W., Schwager, P. et Huber, R. The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 1978; **118**: 99-112.

- Bonini, S., Lambiase, A., Bonini, S., Angelucci, F., Magrini, L., Manni, L. et Aloe, L. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 10955-10960.
- Bonini, S., Lambiase, A., Bonini, S., Levi-Schaffer, F. et Aloe, L. Nerve growth factor: an important molecule in allergic inflammation and tissue remodelling. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; **118**: 159-162.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A. et Greenberg, M.E. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 1999; **286**: 1358-1362.
- Bonni, A., Ginty, D.D., Dudek, H. et Greenberg, M.E. Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Mol Cell Neurosci* 1995; **6**: 168-183.
- Bothwell, M.A. et Shooter, E.M. Thermodynamics of interaction of the subunits of 7 S nerve growth factor. The mechanism of activation of the esteropeptidase activity by chelators. *J Biol Chem* 1978; **253**: 8458-8464.
- Boyle, M.D., Lawman, M.J., Gee, A.P. et Young, M. Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J Immunol* 1985; **134**: 564-568.
- Bracci-Laudiero, L., Aloe, L., Buanne, P., Finn, A., Stenfors, C., Vigneti, E., Theodorsson, E. et Lundeberg, T. NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF? *J Neuroimmunol* 2002; **123**: 58-65.
- Bracci-Laudiero, L., Aloe, L., Caroleo, M.C., Buanne, P., Costa, N., Starace, G. et Lundeberg, T. Endogenous NGF regulates CGRP expression in human monocytes, and affects HLA-DR and CD86 expression and IL-10 production. *Blood* 2005; **106**: 3507-3514.
- Bradshaw, R.A., Murray-Rust, J., Ibanez, C.F., McDonald, N.Q., Lapatto, R. et Blundell, T.L. Nerve growth factor: structure/function relationships. *Protein Sci* 1994; **3**: 1901-1913.
- Brann, A.B., Scott, R., Neuberger, Y., Abulafia, D., Boldin, S., Fainzilber, M. et Futerman, A.H. Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 1999; **19**: 8199-8206.
- Brann, A.B., Tcherpakov, M., Williams, I.M., Futerman, A.H. et Fainzilber, M. Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* 2002; **277**: 9812-9818.
- Braun, A., Appel, E., Baruch, R., Herz, U., Botchkarev, V., Paus, R., Brodie, C. et Renz, H. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 3240-3251.
- Braun, A., Lommatzsch, M., Mannsfeldt, A., Neuhaus-Steinmetz, U., Fischer, A., Schnoy, N., Lewin, G.R. et Renz, H. Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; **21**: 537-546.
- Bresnahan, P.A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H.L., Brake, A.J., Barr, P.J. et Thomas, G. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol* 1990; **111**: 2851-2859.
- Brodie, C. et Gelfand, E.W. Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J Immunol* 1992; **148**: 3492-3497.
- Brodie, C., Goldreich, N., Haiman, T. et Kazimirsky, G. Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion. *J Neuroimmunol* 1998; **81**: 20-30.
- Bronfman, F.C. et Fainzilber, M. Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep* 2004; **5**: 867-871.
- Bronfman, F.C., Tcherpakov, M., Jovin, T.M. et Fainzilber, M. Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the signaling endosome. *J Neurosci* 2003; **23**: 3209-3220.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B. et Goldstein, J.L. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 2000; **100**: 391-398.
- Brown, R.H., Zerhouni, E.A. et Mitzner, W. Airway edema potentiates airway reactivity. *J Appl Physiol* 1995; **79**: 1242-1248.
- Bruckner, S.R., Tammariello, S.P., Kuan, C.Y., Flavell, R.A., Rakic, P. et Estus, S. JNK3 contributes to c-Jun activation and apoptosis but not oxidative stress in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurochem* 2001; **78**: 298-303.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. et Greenberg, M.E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; **96**: 857-868.
- Brunet, A., Datta, S.R. et Greenberg, M.E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 2001; **11**: 297-305.
- Bruni, A., Bigon, E., Boarato, E., Mietto, L., Leon, A. et Toffano, G. Interaction between nerve growth factor and lysophosphatidylserine on rat peritoneal mast cells. *FEBS Lett* 1982; **138**: 190-192.
- Bui, N.T., Konig, H.G., Culmsee, C., Bauerbach, E., Poppe, M., Krieglstein, J. et Prehn, J.H. p75 neurotrophin receptor is required for constitutive and NGF-induced survival signalling in PC12 cells and rat hippocampal neurones. *J Neurochem* 2002; **81**: 594-605.

- Bullock, E.D. et Johnson, E.M., Jr. Nerve growth factor induces the expression of certain cytokine genes and bcl-2 in mast cells. Potential role in survival promotion. *J Biol Chem* 1996; **271**: 27500-27508.
- Burgi, B., Otten, U.H., Ochensberger, B., Rihs, S., Heese, K., Ehrhard, P.B., Ibanez, C.F. et Dahinden, C.A. Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor. *J Immunol* 1996; **157**: 5582-5588.
- Burke, M.A. et Bothwell, M. p75 neurotrophin receptor mediates neurotrophin activation of NF-kappa B and induction of iNOS expression in P19 neurons. *J Neurobiol* 2003; **55**: 191-203.
- Burrige, K. et Wennerberg, K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004; **116**: 167-179.
- Cabrera, N., Diaz-Rodriguez, E., Becker, E., Martin-Zanca, D. et Pandiella, A. TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment. *J Cell Biol* 1996; **132**: 427-436.
- Calza, L., Giardino, L., Giuliani, A., Aloe, L. et Levi-Montalcini, R. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactive factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 4160-4165.
- Campanot, R.B. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**: 4516-4519.
- Cantarella, G., Lempereur, L., Presta, M., Ribatti, D., Lombardo, G., Lazarovici, P., Zappala, G., Pafumi, C. et Bernardini, R. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *Faseb J* 2002; **16**: 1307-1309.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. et Reed, J.C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; **282**: 1318-1321.
- Carrier, A., Devignes, M.D., Rosier, M.F. et Auffray, C. Cloning and mapping of 5' exons from the gene encoding chicken beta nerve growth factor. *Gene* 1992; **116**: 173-179.
- Carrier, A., Rosier, M.F., Guillemot, F., Goguel, A.F., Pulcini, F., Bernheim, A., Auffray, C. et Devignes, M.D. Integrated physical, genetic, and genic map covering 3 Mb around the human NGF gene (NGFB) at 1p13. *Genomics* 1996; **31**: 80-89.
- Carroll, N.G., Cooke, C. et James, A.L. Bronchial blood vessel dimensions in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **155**: 689-695.
- Carter, B.D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhauser, N., Bohm-Matthaei, R., Baeuerle, P.A. et Barde, Y.A. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 1996; **272**: 542-545.
- Cartwright, M., Martin, S., D'Mello, S. et Heinrich, G. The human nerve growth factor gene: structure of the promoter region and expression in L929 fibroblasts. *Brain Res Mol Brain Res* 1992; **15**: 67-75.
- Cartwright, M., Mikheev, A.M. et Heinrich, G. Expression of neurotrophin genes in human fibroblasts: differential regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Int J Dev Neurosci* 1994; **12**: 685-693.
- Casaccia-Bonnel, P., Carter, B.D., Dobrowsky, R.T. et Chao, M.V. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 1996; **383**: 716-719.
- Casademunt, E., Carter, B.D., Benzel, I., Frade, J.M., Dechant, G. et Barde, Y.A. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *Embo J* 1999; **18**: 6050-6061.
- Casey, P.J. Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. *Biochem Soc Trans* 1995; **23**: 161-166.
- Casha, S., Yu, W.R. et Fehlings, M.G. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 2001; **103**: 203-218.
- Cassiman, D., Deneff, C., Desmet, V.J. et Roskams, T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 2001; **33**: 148-158.
- Chan, J.R., Watkins, T.A., Cosgaya, J.M., Zhang, C., Chen, L., Reichardt, L.F., Shooter, E.M. et Barres, B.A. NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron* 2004; **43**: 183-191.
- Chang, B.B., Persengiev, S.P., de Diego, J.G., Sacristan, M.P., Martin-Zanca, D. et Kilpatrick, D.L. Proximal promoter sequences mediate cell-specific and elevated expression of the favorable prognosis marker TrkA in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 39-44.
- Chang, C.N., Yang, J.T., Lee, T.H., Cheng, W.C., Hsu, Y.H. et Wu, J.H. Dexamethasone enhances upregulation of nerve growth factor mRNA expression in ischemic rat brain. *J Clin Neurosci* 2005; **12**: 680-684.
- Chang, M.S., Arevalo, J.C. et Chao, M.V. Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J Neurosci Res* 2004; **78**: 186-192.
- Chao, M.V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003; **4**: 299-309.
- Chao, M.V. et Bothwell, M. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 2002; **33**: 9-12.
- Chao, M.V. et Hempstead, B.L. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* 1995; **18**: 321-326.
- Chapman, B.S. A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas. *FEBS Lett* 1995; **374**: 216-220.
- Chapman, B.S. et Kuntz, I.D. Modeled structure of the 75-kDa neurotrophin receptor. *Protein Sci* 1995; **4**: 1696-1707.
- Chen, Y., Dicou, E. et Djakiew, D. Characterization of nerve growth factor precursor protein expression in rat round spermatids and the trophic effects of nerve growth factor in the maintenance of Sertoli cell viability. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **127**: 129-136.
- Chen, Z.Y., Ieraci, A., Tanowitz, M. et Lee, F.S. A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 5761-5772.

- Chevalier, S., Praloran, V., Smith, C., MacGrogan, D., Ip, N.Y., Yancopoulos, G.D., Brachet, P., Pouplard, A. et Gascan, H. Expression and functionality of the trkA proto-oncogene product/NGF receptor in undifferentiated hematopoietic cells. *Blood* 1994; **83**: 1479-1485.
- Chevet, E., Lemaitre, G., Janjic, N., Barritault, D., Bikfalvi, A. et Katinka, M.D. Fibroblast growth factor receptors participate in the control of mitogen-activated protein kinase activity during nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 20901-20908.
- Chiappara, G., Gagliardo, R., Siena, A., Bonsignore, M.R., Bousquet, J., Bonsignore, G. et Vignola, A.M. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; **1**: 85-93.
- Chiaravello, A., Neuman, K., Palm, K., Metsis, M. et Neuman, T. Helix-loop-helix transcription factors mediate activation and repression of the p75LNGFR gene. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 6036-6044.
- Chittka, A. et Chao, M.V. Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 10705-10710.
- Clary, D.O. et Reichardt, L.F. 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* 1994; **91**: 11133-11137.
- Claude, P., Hawrot, E., Dunis, D.A. et Campenot, R.B. Binding, internalization, and retrograde transport of 125I-nerve growth factor in cultured rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 1982; **2**: 431-442.
- Claude, P., Hawrot, E. et Parada, I. Ultrastructural studies on the intracellular fate of 125I-nerve growth factor in cultured rat sympathetic neurons. *J Cell Biochem* 1982; **20**: 1-13.
- Clemow, D.B. et Tuttle, J.B. Effects of growth rate and cell density on nerve growth factor secretion in cultures of vascular and bladder smooth muscle cells from hypertensive and hyperactive rats. *Cell Tissue Res* 1998; **294**: 431-438.
- Colangelo, A.M., Johnson, P.F. et Mocchetti, I. beta-adrenergic receptor-induced activation of nerve growth factor gene transcription in rat cerebral cortex involves CCAAT/enhancer-binding protein delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 10920-10925.
- Colangelo, A.M., Mallei, A., Johnson, P.F. et Mocchetti, I. Synergistic effect of dexamethasone and beta-adrenergic receptor agonists on the nerve growth factor gene transcription. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; **124**: 97-104.
- Colangelo, A.M., Pani, L. et Mocchetti, I. Correlation between increased AP-1/NGF binding activity and induction of nerve growth factor transcription by multiple signal transduction pathways in C6-2B glioma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; **35**: 1-10.
- Coleman, E.S. et Wooten, M.W. Nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells employs the PMA-insensitive protein kinase C-zeta isoform. *J Mol Neurosci* 1994; **5**: 39-57.
- Confalonieri, S., Salcini, A.E., Puri, C., Tacchetti, C. et Di Fiore, P.P. Tyrosine phosphorylation of Eps15 is required for ligand-regulated, but not constitutive, endocytosis. *J Cell Biol* 2000; **150**: 905-912.
- Conti, G., Stoll, G., Scarpini, E., Baron, P.L., Bianchi, R., Livraghi, S. et Scarlato, G. p75 neurotrophin receptor induction and macrophage infiltration in peripheral nerve during experimental diabetic neuropathy: possible relevance on regeneration. *Exp Neurol* 1997; **146**: 206-211.
- Cosgaya, J.M. et Aranda, A. Nerve growth factor regulates transforming growth factor-beta 1 gene expression by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms in PC12 cells. *J Neurochem* 1995; **65**: 2484-2490.
- Cosgaya, J.M., Chan, J.R. et Shooter, E.M. The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science* 2002; **298**: 1245-1248.
- Cosgaya, J.M. et Shooter, E.M. Binding of nerve growth factor to its p75 receptor in stressed cells induces selective I κ B β -beta degradation and NF- κ B nuclear translocation. *J Neurochem* 2001; **79**: 391-399.
- Coulson, E.J., Reid, K., Baca, M., Shipham, K.A., Hulett, S.M., Kilpatrick, T.J. et Bartlett, P.F. Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem* 2000; **275**: 30537-30545.
- Coulson, E.J., Reid, K., Barrett, G.L. et Bartlett, P.F. p75 neurotrophin receptor-mediated neuronal death is promoted by Bcl-2 and prevented by Bcl-xL. *J Biol Chem* 1999; **274**: 16387-16391.
- Coulson, E.J., Reid, K., Shipham, K.M., Morley, S., Kilpatrick, T.J. et Bartlett, P.F. The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog Brain Res* 2004; **146**: 41-62.
- Creedon, D.J. et Tuttle, J.B. Synergistic increase in nerve growth factor secretion by cultured vascular smooth muscle cells treated with injury-related growth factors. *J Neurosci Res* 1997; **47**: 277-286.
- Crowder, R.J. et Freeman, R.S. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998; **18**: 2933-2943.
- Cullen, P.J., Cozier, G.E., Banting, G. et Mellor, H. Modular phosphoinositide-binding domains--their role in signalling and membrane trafficking. *Curr Biol* 2001; **11**: R882-893.
- Culmsee, C., Gerling, N., Lehmann, M., Nikolova-Karakashian, M., Prehn, J.H., Mattson, M.P. et Kriegstein, J. Nerve growth factor survival signaling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor P75. *Neuroscience* 2002; **115**: 1089-1108.
- Darling, T.L., Petrides, P.E., Beguin, P., Frey, P., Shooter, E.M., Selby, M. et Rutter, W.J. The biosynthesis and processing of proteins in the mouse 7S nerve growth factor complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983; **48 Pt 1**: 427-434.

- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. et Greenberg, M.E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; **91**: 231-241.
- Davies, A.M., Lee, K.F. et Jaenisch, R. p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins. *Neuron* 1993; **11**: 565-574.
- de Vries, A., Dessing, M.C., Engels, F., Henricks, P.A. et Nijkamp, F.P. Nerve growth factor induces a neurokinin-1 receptor-mediated airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **159**: 1541-1544.
- De Vries, A., Engels, F., Henricks, P.A., Leusink-Muis, T., Fischer, A. et Nijkamp, F.P. Antibodies directed against nerve growth factor inhibit the acute bronchoconstriction due to allergen challenge in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy* 2002; **32**: 325-328.
- de Vries, A., van Rijnsoever, C., Engels, F., Henricks, P.A. et Nijkamp, F.P. The role of sensory nerve endings in nerve growth factor-induced airway hyperresponsiveness to histamine in guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 2001; **134**: 771-776.
- Dechant, G. Molecular interactions between neurotrophin receptors. *Cell Tissue Res* 2001; **305**: 229-238.
- Dechant, G. et Barde, Y.A. Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* 1997; **7**: 413-418.
- Dechant, G. et Barde, Y.A. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* 2002; **5**: 1131-1136.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. et Nunez, G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; **278**: 687-689.
- Delcroix, J.D., Valletta, J.S., Wu, C., Hunt, S.J., Kowal, A.S. et Mobley, W.C. NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* 2003; **39**: 69-84.
- Delsite, R. et Djakiew, D. Characterization of nerve growth factor precursor protein expression by human prostate stromal cells: a role in selective neurotrophin stimulation of prostate epithelial cell growth. *Prostate* 1999; **41**: 39-48.
- Descamps, S., Lebourhis, X., Delehedde, M., Boilly, B. et Hondermarck, H. Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 16659-16662.
- Deshmukh, M. et Johnson, E.M., Jr. Evidence of a novel event during neuronal death: development of competence-to-die in response to cytoplasmic cytochrome c. *Neuron* 1998; **21**: 695-705.
- Dethleffsen, K., Morl, K. et Meyer, M. Control of local NGF mRNA synthesis by preformed factors rapidly released from peripheral nerves. *Mol Cell Neurosci* 2002; **20**: 503-514.
- Di Marco, E., Mathor, M., Bondanza, S., Cutuli, N., Marchisio, P.C., Cancedda, R. et De Luca, M. Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. *J Biol Chem* 1993; **268**: 22838-22846.
- di Mola, F.F., Friess, H., Zhu, Z.W., Koliopanos, A., Bley, T., Di Sebastiano, P., Innocenti, P., Zimmermann, A. et Buchler, M.W. Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; **46**: 670-679.
- Diaz-Meco, M.T., Dominguez, I., Sanz, L., Dent, P., Lozano, J., Municio, M.M., Berra, E., Hay, R.T., Sturgill, T.W. et Moscat, J. zeta PKC induces phosphorylation and inactivation of I kappa B-alpha in vitro. *Embo J* 1994; **13**: 2842-2848.
- Diaz-Rodriguez, E., Cabrera, N., Esparis-Ogando, A., Montero, J.C. et Pandiella, A. Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *Eur J Neurosci* 1999; **11**: 1421-1430.
- Dinh, Q.T., Groneberg, D.A., Peiser, C., Springer, J., Joachim, R.A., Arck, P.C., Klapp, B.F. et Fischer, A. Nerve growth factor-induced substance P in capsaicin-insensitive vagal neurons innervating the lower mouse airway. *Clin Exp Allergy* 2004; **34**: 1474-1479.
- DiStefano, P.S., Chelsea, D.M., Schick, C.M. et McKelvy, J.F. Involvement of a metalloprotease in low-affinity nerve growth factor receptor truncation: inhibition of truncation in vitro and in vivo. *J Neurosci* 1993; **13**: 2405-2414.
- D'Mello, S.R. et Heinrich, G. Structural and functional identification of regulatory regions and cis elements surrounding the nerve growth factor gene promoter. *Brain Res Mol Brain Res* 1991; **11**: 255-264.
- Dobrowsky, R.T., Jenkins, G.M. et Hannun, Y.A. Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J Biol Chem* 1995; **270**: 22135-22142.
- Dobrowsky, R.T., Werner, M.H., Castellino, A.M., Chao, M.V. et Hannun, Y.A. Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 1994; **265**: 1596-1599.
- Dolle, J.P., Rezvan, A., Allen, F.D., Lazarovici, P. et Lelkes, P.I. Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **315**: 1220-1227.
- Donnerer, J., Schuligoi, R. et Stein, C. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience* 1992; **49**: 693-698.
- Donovan, M.J., Miranda, R.C., Kraemer, R., McCaffrey, T.A., Tessarollo, L., Mahadeo, D., Sharif, S., Kaplan, D.R., Tsoulfas, P., Parada, L. et al. Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol* 1995; **147**: 309-324.

- Dowling, P., Ming, X., Raval, S., Husar, W., Casaccia-Bonnet, P., Chao, M., Cook, S. et Blumberg, B. Up-regulated p75NTR neurotrophin receptor on glial cells in MS plaques. *Neurology* 1999; **53**: 1676-1682.
- Downing, J.R., Roussel, M.F. et Sherr, C.J. Ligand and protein kinase C downmodulate the colony-stimulating factor 1 receptor by independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 2890-2896.
- Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. et MacKinnon, R. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 1996; **85**: 1067-1076.
- Du, Y., Fischer, T.Z., Clinton-Luke, P., Lercher, L.D. et Dreyfus, C.F. Distinct effects of p75 in mediating actions of neurotrophins on basal forebrain oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 2006; **31**: 366-375.
- Dubus, P., Parrens, M., El-Mokhtari, Y., Ferrer, J., Groppi, A. et Merlio, J.P. Identification of novel trkA variants with deletions in leucine-rich motifs of the extracellular domain. *J Neuroimmunol* 2000; **107**: 42-49.
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R. et Greenberg, M.E. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997; **275**: 661-665.
- Ebina, M., Takahashi, T., Chiba, T. et Motomiya, M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 1993; **148**: 720-726.
- Edling, A.E., Nanavati, T., Johnson, J.M. et Tuohy, V.K. Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. *J Neurosci Res* 2004; **77**: 709-717.
- Edwards, R.H., Selby, M.J., Garcia, P.D. et Rutter, W.J. Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor. *J Biol Chem* 1988; **263**: 6810-6815.
- Edwards, R.H., Selby, M.J. et Rutter, W.J. Differential RNA splicing predicts two distinct nerve growth factor precursors. *Nature* 1986; **319**: 784-787.
- Ehrhard, P.B., Erb, P., Graumann, U. et Otten, U. 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* 1993; **90**: 10984-10988.
- Ehrhard, P.B., Erb, P., Graumann, U., Schmutz, B. et Otten, U. Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation. *J Immunol* 1994; **152**: 2705-2709.
- Ek, A., Larsson, K., Siljerud, S. et Palmberg, L. Fluticasone and budesonide inhibit cytokine release in human lung epithelial cells and alveolar macrophages. *Allergy* 1999; **54**: 691-699.
- Emmett, C.J., McNeely, P.A. et Johnson, R.M. Evaluation of human astrocytoma and glioblastoma cell lines for nerve growth factor release. *Neurochem Int* 1997; **30**: 465-474.
- Epa, W.R., Markovska, K. et Barrett, G.L. The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation. *J Neurochem* 2004; **89**: 344-353.
- Erck, C., Meisinger, C., Grothe, C. et Seidl, K. Regulation of nerve growth factor and its low-affinity receptor (p75NTR) during myogenic differentiation. *J Cell Physiol* 1998; **176**: 22-31.
- Ernfors, P., Henschen, A., Olson, L. et Persson, H. Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron* 1989; **2**: 1605-1613.
- Ernfors, P., Wetmore, C., Olson, L. et Persson, H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 1990; **5**: 511-526.
- Espósito, D., Patel, P., Stephens, R.M., Perez, P., Chao, M.V., Kaplan, D.R. et Hempstead, B.L. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* 2001; **276**: 32687-32695.
- Evans, B.A. et Richards, R.I. Genes for the alpha and gamma subunits of mouse nerve growth factor are contiguous. *Embo J* 1985; **4**: 133-138.
- Eveleth, D.D. et Bradshaw, R.A. Internalization and cycling of nerve growth factor in PC12 cells: interconversion of type II (fast) and type I (slow) nerve growth factor receptors. *Neuron* 1988; **1**: 929-936.
- Eveleth, D.D. et Bradshaw, R.A. Nerve growth factor nonresponsive pheochromocytoma cells: altered internalization results in signaling dysfunction. *J Cell Biol* 1992; **117**: 291-299.
- Fabian, J.R., Daar, I.O. et Morrison, D.K. Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 7170-7179.
- Fahnestock, M. Structure and biosynthesis of nerve growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991; **165**: 1-26.
- Fahnestock, M., Michalski, B., Xu, B. et Coughlin, M.D. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci* 2001; **18**: 210-220.
- Fahnestock, M., Yu, G. et Coughlin, M.D. ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule? *Prog Brain Res* 2004; **146**: 101-110.
- Fahnestock, M., Yu, G., Michalski, B., Mathew, S., Colquhoun, A., Ross, G.M. et Coughlin, M.D. The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *J Neurochem* 2004; **89**: 581-592.
- Fan, G., Merritt, S.E., Kortenjann, M., Shaw, P.E. et Holzman, L.B. Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mapk but not ERK2. *J Biol Chem* 1996; **271**: 24788-24793.
- Farraj, A.K., Haykal-Coates, N., Ledbetter, A.D., Evansky, P.A. et Gavett, S.H. Inhibition of Pan Neurotrophin Receptor p75 Attenuates Diesel Particulate-Induced Enhancement of Allergic Airway Responses in C57/B16J Mice. *Inhal Toxicol* 2006; **18**: 483-491.

- Feinstein, D.L. et Larhammar, D. Identification of a conserved protein motif in a group of growth factor receptors. *FEBS Lett* 1990; **272**: 7-11.
- Fernandes, D.J., Ravenhall, C.E., Harris, T., Tran, T., Vlahos, R. et Stewart, A.G. Contribution of the p38MAPK signalling pathway to proliferation in human cultured airway smooth muscle cells is mitogen-specific. *Br J Pharmacol* 2004; **142**: 1182-1190.
- Flamig, G., Engele, J., Geerling, I., Pezeshki, G., Adler, G. et Reinshagen, M. Neurotrophin and GDNF expression increases in rat adrenal glands during experimental colitis. *Neuro Endocrinol Lett* 2001; **22**: 461-466.
- Fox, A.J., Patel, H.J., Barnes, P.J. et Belvisi, M.G. Release of nerve growth factor by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 2001; **424**: 159-162.
- Frade, J.M. et Barde, Y.A. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* 1999; **126**: 683-690.
- Francke, U., de Martinville, B., Coussens, L. et Ullrich, A. The human gene for the beta subunit of nerve growth factor is located on the proximal short arm of chromosome 1. *Science* 1983; **222**: 1248-1251.
- Freund, V. et Frossard, N. Expression of nerve growth factor in the airways and its possible role in asthma. *Prog Brain Res* 2004; **146**: 335-346.
- Freund, V., Pons, F., Joly, V., Mathieu, E., Martinet, N. et Frossard, N. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Respir J* 2002; **20**: 458-463.
- Freund-Michel, V., Bertrand, C. et Frossard, N. TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation. *Cell Signal* 2006; **18**: 621-627.
- Friberg, S.G., Olgart Hoglund, C. et Gustafsson, L.E. Nerve growth factor increases airway responses and decreases levels of exhaled nitric oxide during histamine challenge in an in vivo guinea-pig model. *Acta Physiol Scand* 2001; **173**: 239-245.
- Friedman, W.J., Altiok, N., Fredholm, B.B. et Persson, H. Mechanisms of nerve growth factor mRNA regulation by interleukin-1 beta in hippocampal cultures: role of second messengers. *J Neurosci Res* 1992; **33**: 37-46.
- Friedman, W.J. et Greene, L.A. Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res* 1999; **253**: 131-142.
- Friedman, W.J., Thakur, S., Seidman, L. et Rabson, A.B. Regulation of nerve growth factor mRNA by interleukin-1 in rat hippocampal astrocytes is mediated by NFkappaB. *J Biol Chem* 1996; **271**: 31115-31120.
- Frossard, N., Freund, V. et Advenier, C. Nerve growth factor and its receptors in asthma and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004; **500**: 453-465.
- Frossard, N., Naline, E., Olgart Hoglund, C., Georges, O. et Advenier, C. Nerve growth factor is released by IL-1beta and induces hyperresponsiveness of the human isolated bronchus. *Eur Respir J* 2005; **26**: 15-20.
- Furuno, T. et Nakanishi, M. Neurotrophic factors increase tumor necrosis factor-alpha-induced nuclear translocation of NF-kappaB in rat PC12 cells. *Neurosci Lett* 2006; **392**: 240-244.
- Gadient, R.A., Cron, K.C. et Otten, U. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 1990; **117**: 335-340.
- Galve-Roperh, I., Malpartida, J.M., Haro, A., Brachet, P. et Diaz-Laviada, I. Regulation of nerve growth factor secretion and mRNA expression by bacterial lipopolysaccharide in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 1997; **49**: 569-575.
- Gargano, N., Levi, A. et Alema, S. Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA receptors. *J Neurosci Res* 1997; **50**: 1-12.
- Gee, A.P., Boyle, M.D., Munger, K.L., Lawman, M.J. et Young, M. Nerve growth factor: stimulation of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**: 7215-7218.
- Geetha, T., Kenchappa, R.S., Wooten, M.W. et Carter, B.D. TRAF6-mediated ubiquitination regulates nuclear translocation of NRIF, the p75 receptor interactor. *Embo J* 2005; **24**: 3859-3868.
- Geetha, T. et Wooten, M.W. Association of the atypical protein kinase C-interacting protein p62/ZIP with nerve growth factor receptor TrkA regulates receptor trafficking and Erk5 signaling. *J Biol Chem* 2003; **278**: 4730-4739.
- Gehler, S., Gallo, G., Veien, E. et Letourneau, P.C. p75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity. *J Neurosci* 2004; **24**: 4363-4372.
- Gentry, J.J., Casaccia-Bonnet, P. et Carter, B.D. Nerve growth factor activation of nuclear factor kappaB through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 7558-7565.
- Gentry, J.J., Rutkoski, N.J., Burke, T.L. et Carter, B.D. A functional interaction between the p75 neurotrophin receptor interacting factors, TRAF6 and NRIF. *J Biol Chem* 2004; **279**: 16646-16656.
- Gibbs, B.F., Zillikens, D. et Grabbe, J. Nerve growth factor influences IgE-mediated human basophil activation: functional properties and intracellular mechanisms compared with IL-3. *Int Immunopharmacol* 2005; **5**: 735-747.
- Glaab, T., Hoymann, H.G., Hecht, M., Korolewicz, R., Tschernig, T., Hohlfeld, J.M., Krug, N. et Braun, A. Effect of anti-nerve growth factor on early and late airway responses in allergic rats. *Allergy* 2003; **58**: 900-904.
- Godfrey, E.W. et Shooter, E.M. Nerve growth factor receptors on chick embryo sympathetic ganglion cells: binding characteristics and development. *J Neurosci* 1986; **6**: 2543-2550.
- Graham, R.M., Friedman, M. et Hoyle, G.W. Sensory nerves promote ozone-induced lung inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164**: 307-313.

- Greco, A., Miranda, C., Pagliardini, S., Fusetti, L., Bongarzone, I. et Pierotti, M.A. Chromosome 1 rearrangements involving the genes TPR and NTRK1 produce structurally different thyroid-specific TRK oncogenes. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; **19**: 112-123.
- Greene, L.A., Shooter, E.M. et Varon, S. Enzymatic activities of mouse nerve growth factor and its subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968; **60**: 1383-1388.
- Grewe, M., Vogelsang, K., Ruzicka, T., Stege, H. et Krutmann, J. Neurotrophin-4 production by human epidermal keratinocytes: increased expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2000; **114**: 1108-1112.
- Grimes, M.L., Zhou, J., Beattie, E.C., Yuen, E.C., Hall, D.E., Valletta, J.S., Topp, K.S., LaVail, J.H., Bunnett, N.W. et Mobley, W.C. Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci* 1996; **16**: 7950-7964.
- Grob, P.M., Ross, A.H., Koprowski, H. et Bothwell, M. Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 1985; **260**: 8044-8049.
- Groneberg, D.A., Serowka, F., Peckenschneider, N., Artuc, M., Grutzkau, A., Fischer, A., Henz, B.M. et Welker, P. Gene expression and regulation of nerve growth factor in atopic dermatitis mast cells and the human mast cell line-1. *J Neuroimmunol* 2005; **161**: 87-92.
- Hafezparast, M., Klocke, R., Ruhrberg, C., Marquardt, A., Ahmad-Annuar, A., Bowen, S., Lalli, G., Witherden, A.S., Hummerich, H., Nicholson, S., Morgan, P.J., Oozageer, R., Priestley, J.V., Averill, S., King, V.R., Ball, S., Peters, J., Toda, T., Yamamoto, A., Hiraoka, Y., Augustin, M., Korthaus, D., Wattler, S., Wabnitz, P., Dickneite, C., Lampel, S., Boehme, F., Peraus, G., Popp, A., Rudelius, M., Schlegel, J., Fuchs, H., Hrabe de Angelis, M., Schiavo, G., Shima, D.T., Russ, A.P., Stumm, G., Martin, J.E. et Fisher, E.M. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 2003; **300**: 808-812.
- Hahn, C., Islamian, A.P., Renz, H. et Nockher, W.A. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **117**: 787-794.
- Hallbook, F., Ebendal, T. et Persson, H. Production and characterization of biologically active recombinant beta nerve growth factor. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 452-456.
- Hamada, A., Watanabe, N., Ohtomo, H. et Matsuda, H. Nerve growth factor enhances survival and cytotoxic activity of human eosinophils. *Br J Haematol* 1996; **93**: 299-302.
- Hamanoue, M., Middleton, G., Wyatt, S., Jaffray, E., Hay, R.T. et Davies, A.M. p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 1999; **14**: 28-40.
- Harding, T.C., Xue, L., Bienemann, A., Haywood, D., Dickens, M., Tolkovsky, A.M. et Uney, J.B. Inhibition of JNK by overexpression of the JNL binding domain of JIP-1 prevents apoptosis in sympathetic neurons. *J Biol Chem* 2001; **276**: 4531-4534.
- Harrington, A.W., Kim, J.Y. et Yoon, S.O. Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci* 2002; **22**: 156-166.
- Harris, C.A. et Johnson, E.M., Jr. BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37754-37760.
- Hattori, A., Iwasaki, S., Murase, K., Tsujimoto, M., Sato, M., Hayashi, K. et Kohno, M. Tumor necrosis factor is markedly synergistic with interleukin 1 and interferon-gamma in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. *FEBS Lett* 1994; **340**: 177-180.
- Hattori, A., Tanaka, E., Murase, K., Ishida, N., Chatani, Y., Tsujimoto, M., Hayashi, K. et Kohno, M. Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. *J Biol Chem* 1993; **268**: 2577-2582.
- Hayden, M.S. et Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004; **18**: 2195-2224.
- He, X.L. et Garcia, K.C. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 2004; **304**: 870-875.
- Heerssen, H.M., Pazyra, M.F. et Segal, R.A. Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons. *Nat Neurosci* 2004; **7**: 596-604.
- Heerssen, H.M. et Segal, R.A. Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci* 2002; **25**: 160-165.
- Heese, K., Hock, C. et Otten, U. Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J Neurochem* 1998; **70**: 699-707.
- Heese, K., Inoue, N. et Sawada, T. NF-kappaB regulates B-cell-derived nerve growth factor expression. *Cell Mol Immunol* 2006; **3**: 63-66.
- Hefti, F.F., Rosenthal, A., Walicke, P.A., Wyatt, S., Vergara, G., Shelton, D.L. et Davies, A.M. Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. *Trends Pharmacol Sci* 2006; **27**: 85-91.
- Heinemann, A., Ofner, M., Amann, R. et Peskar, B.A. A novel assay to measure the calcium flux in human basophils: effects of chemokines and nerve growth factor. *Pharmacology* 2003; **67**: 49-54.
- Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F. et Chao, M.V. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 1991; **350**: 678-683.
- Hengerer, B., Lindholm, D., Heumann, R., Ruther, U., Wagner, E.F. et Thoenen, H. Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by c-fos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**: 3899-3903.

- Heumann, R., Korsching, S., Bandtlow, C. et Thoenen, H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* 1987; **104**: 1623-1631.
- Hiltunen, J.O., Laurikainen, A., Vakeva, A., Meri, S. et Saarna, M. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor mRNAs are regulated in distinct cell populations of rat heart after ischaemia and reperfusion. *J Pathol* 2001; **194**: 247-253.
- Hirai, S., Izawa, M., Osada, S., Spyrou, G. et Ohno, S. Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene* 1996; **12**: 641-650.
- Hirata, H., Hibasami, H., Yoshida, T., Ogawa, M., Matsumoto, M., Morita, A. et Uchida, A. Nerve growth factor signaling of p75 induces differentiation and ceramide-mediated apoptosis in Schwann cells cultured from degenerating nerves. *Glia* 2001; **36**: 245-258.
- Holden, P.H., Asopa, V., Robertson, A.G., Clarke, A.R., Tyler, S., Bennett, G.S., Brain, S.D., Wilcock, G.K., Allen, S.J., Smith, S.K. et Dawbarn, D. Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor. *Nat Biotechnol* 1997; **15**: 668-672.
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., Emllet, D.R., Dieterich, R. et Wong, A.J. Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 12419-12424.
- Horigome, K., Bullock, E.D. et Johnson, E.M., Jr. Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. Survival promotion and immediate-early gene induction. *J Biol Chem* 1994; **269**: 2695-2702.
- Hosang, M. et Shooter, E.M. The internalization of nerve growth factor by high-affinity receptors on pheochromocytoma PC12 cells. *Embo J* 1987; **6**: 1197-1202.
- Howe, C.L., Valletta, J.S., Rusnak, A.S. et Mobley, W.C. NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 2001; **32**: 801-814.
- Hoyle, G.W., Graham, R.M., Finkelstein, J.B., Nguyen, K.P., Gozal, D. et Friedman, M. Hyperinnervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; **18**: 149-157.
- Huang, C.S., Zhou, J., Feng, A.K., Lynch, C.C., Klumperman, J., DeArmond, S.J. et Mobley, W.C. Nerve growth factor signaling in caveolae-like domains at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1999; **274**: 36707-36714.
- Huber, L.J. et Chao, M.V. A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation. *J Neurosci Res* 1995; **40**: 557-563.
- Huebner, K., Isobe, M., Chao, M., Bothwell, M., Ross, A.H., Finan, J., Hoxie, J.A., Sehgal, A., Buck, C.R., Lanahan, A. et al. The nerve growth factor receptor gene is at human chromosome region 17q12-17q22, distal to the chromosome 17 breakpoint in acute leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**: 1403-1407.
- Hughes, A.L., Messineo-Jones, D., Lad, S.P. et Neet, K.E. Distinction between differentiation, cell cycle, and apoptosis signals in PC12 cells by the nerve growth factor mutant delta9/13, which is selective for the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci Res* 2001; **63**: 10-19.
- Hunter, D.D., Myers, A.C. et Udem, B.J. Nerve growth factor-induced phenotypic switch in guinea pig airway sensory neurons. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**: 1985-1990.
- Ibanez, C.F. Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF. *Trends Neurosci* 2002; **25**: 284-286.
- Ibanez, C.F., Ilag, L.L., Murray-Rust, J. et Persson, H. An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin. *Embo J* 1993; **12**: 2281-2293.
- Indo, Y., Mardy, S., Tsuruta, M., Karim, M.A. et Matsuda, I. Structure and organization of the human TRKA gene encoding a high affinity receptor for nerve growth factor. *Jpn J Hum Genet* 1997; **42**: 343-351.
- Irie, S., Hachiya, T., Rabizadeh, S., Maruyama, W., Mukai, J., Li, Y., Reed, J.C., Bredesen, D.E. et Sato, T.A. Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 1999; **460**: 191-198.
- Isackson, P.J. et Bradshaw, R.A. The alpha-subunit of mouse 7 S nerve growth factor is an inactive serine protease. *J Biol Chem* 1984; **259**: 5380-5383.
- Isackson, P.J., Nisco, S.J. et Bradshaw, R.A. Expression of the alpha subunit of 7S nerve growth factor in the mouse submandibular gland. *Neurochem Res* 1987; **12**: 959-966.
- Isackson, P.J., Ullrich, A. et Bradshaw, R.A. Mouse 7S nerve growth factor: complete sequence of a cDNA coding for the alpha-subunit precursor and its relationship to serine proteases. *Biochemistry* 1984; **23**: 5997-6002.
- Ishida, K., Yoshimura, N., Yoshida, M., Honda, Y., Murase, K. et Hayashi, K. Expression of neurotrophic factors in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 1997; **16**: 96-101.
- Ivanisevic, L., Banerjee, K. et Saragovi, H.U. Differential cross-regulation of TrkA and TrkC tyrosine kinase receptors with p75. *Oncogene* 2003; **22**: 5677-5685.
- Jacoby, D.B. Airway neural plasticity: the nerves they are a-changin'. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; **28**: 138-141.
- Janknecht, R., Ernst, W.H., Pingoud, V. et Nordheim, A. Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *Embo J* 1993; **12**: 5097-5104.
- Jehan, F., Neveu, I., Naveilhan, P., Brachet, P. et Wion, D. Complex interactions among second messenger pathways, steroid hormones, and protooncogenes of the Fos and Jun families converge in the regulation of the nerve growth factor gene. *J Neurochem* 1993; **60**: 1843-1853.
- Jing, S., Tapley, P. et Barbacid, M. Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 1992; **9**: 1067-1079.

- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M. et Chao, M. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 1986; **47**: 545-554.
- Jongstra-Bilen, J., Coblenz, L. et Shooter, E.M. The in vitro processing of the NGF precursors by the gamma-subunit of the 7S NGF complex. *Brain Res Mol Brain Res* 1989; **5**: 159-169.
- Jullien, J., Guili, V., Derrington, E.A., Darlix, J.L., Reichardt, L.F. et Rudkin, B.B. Trafficking of TrkA-green fluorescent protein chimerae during nerve growth factor-induced differentiation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 8706-8716.
- Jullien, J., Guili, V., Reichardt, L.F. et Rudkin, B.B. Molecular kinetics of nerve growth factor receptor trafficking and activation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 38700-38708.
- Kahle, P., Barker, P.A., Shooter, E.M. et Hertel, C. p75 nerve growth factor receptor modulates p140trkA kinase activity, but not ligand internalization, in PC12 cells. *J Neurosci Res* 1994; **38**: 599-606.
- Kanbe, N., Kurosawa, M., Miyachi, Y., Kanbe, M., Saitoh, H. et Matsuda, H. Nerve growth factor prevents apoptosis of cord blood-derived human cultured mast cells synergistically with stem cell factor. *Clin Exp Allergy* 2000; **30**: 1113-1120.
- Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D. et Weiss, A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999; **9**: 601-604.
- Kannan, Y., Usami, K., Okada, M., Shimizu, S. et Matsuda, H. Nerve growth factor suppresses apoptosis of murine neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **186**: 1050-1056.
- Kannan, Y., Ushio, H., Koyama, H., Okada, M., Oikawa, M., Yoshihara, T., Kaneko, M. et Matsuda, H. 2.5S nerve growth factor enhances survival, phagocytosis, and superoxide production of murine neutrophils. *Blood* 1991; **77**: 1320-1325.
- Kanning, K.C., Hudson, M., Amieux, P.S., Wiley, J.C., Bothwell, M. et Schecterson, L.C. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci* 2003; **23**: 5425-5436.
- Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V. et Parada, L.F. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 1991; **252**: 554-558.
- Kaplan, D.R., Martin-Zanca, D. et Parada, L.F. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 1991; **350**: 158-160.
- Kaplan, D.R. et Miller, F.D. Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 213-221.
- Kaplan, D.R. et Miller, F.D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000; **10**: 381-391.
- Kasaian, M.T. et Neet, K.E. Internalization of nerve growth factor by PC12 cells. A description of cellular pools. *J Biol Chem* 1988; **263**: 5083-5090.
- Kassel, O., de Blay, F., Duvernelle, C., Olgart, C., Israel-Biet, D., Krieger, P., Moreau, L., Muller, C., Pauli, G. et Frossard, N. Local increase in the number of mast cells and expression of nerve growth factor in the bronchus of asthmatic patients after repeated inhalation of allergen at low-dose. *Clin Exp Allergy* 2001; **31**: 1432-1440.
- Kato, Y., Kravchenko, V.V., Tapping, R.I., Han, J., Ulevitch, R.J. et Lee, J.D. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *Embo J* 1997; **16**: 7054-7066.
- Kavurma, M.M. et Khachigian, L.M. ERK, JNK, and p38 MAP kinases differentially regulate proliferation and migration of phenotypically distinct smooth muscle cell subtypes. *J Cell Biochem* 2003; **89**: 289-300.
- Kawamoto, K., Aoki, J., Tanaka, A., Itakura, A., Hosono, H., Arai, H., Kiso, Y. et Matsuda, H. Nerve growth factor activates mast cells through the collaborative interaction with lysophosphatidylserine expressed on the membrane surface of activated platelets. *J Immunol* 2002; **168**: 6412-6419.
- Kawamoto, K., Okada, T., Kannan, Y., Ushio, H., Matsumoto, M. et Matsuda, H. Nerve growth factor prevents apoptosis of rat peritoneal mast cells through the trk proto-oncogene receptor. *Blood* 1995; **86**: 4638-4644.
- Kemi, C., Grunewald, J., Eklund, A. et Hoglund, C.O. Differential regulation of neurotrophin expression in human bronchial smooth muscle cells. *Respir Res* 2006; **7**: 18.
- Kendall, S.E., Goldhawk, D.E., Kubu, C., Barker, P.A. et Verdi, J.M. Expression analysis of a novel p75(NTR) signaling protein, which regulates cell cycle progression and apoptosis. *Mech Dev* 2002; **117**: 187-200.
- Kendall, S.E., Ryczko, M.C., Mehan, M. et Verdi, J.M. Characterization of NADE, NRIF and SC-1 gene expression during mouse neurogenesis. *Brain Res Dev Brain Res* 2003; **144**: 151-158.
- Kerzel, S., Path, G., Nockher, W.A., Quarcoo, D., Raap, U., Groneberg, D.A., Dinh, Q.T., Fischer, A., Braun, A. et Renz, H. Pan-neurotrophin receptor p75 contributes to neuronal hyperreactivity and airway inflammation in a murine model of experimental asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; **28**: 170-178.
- Khursigara, G., Bertin, J., Yano, H., Moffett, H., DiStefano, P.S. et Chao, M.V. A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* 2001; **21**: 5854-5863.
- Khursigara, G., Orlinick, J.R. et Chao, M.V. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* 1999; **274**: 2597-2600.
- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C., Kusunoki, T., Hosoi, S. et Mikawa, H. Nerve growth factor specifically induces human IgG4 production. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 137-141.

- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C. et Mikawa, H. Stimulation of Ig production and growth of human lymphoblastoid B-cell lines by nerve growth factor. *Immunology* 1991; **72**: 451-452.
- Kita, Y., Kimura, K.D., Kobayashi, M., Ihara, S., Kaibuchi, K., Kuroda, S., Ui, M., Iba, H., Konishi, H., Kikkawa, U., Nagata, S. et Fukui, Y. Microinjection of activated phosphatidylinositol-3 kinase induces process outgrowth in rat PC12 cells through the Rac-JNK signal transduction pathway. *J Cell Sci* 1998; **111** (Pt 7): 907-915.
- Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E. et Barbacid, M. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 1991; **65**: 189-197.
- Klesse, L.J. et Parada, L.F. p21 ras and phosphatidylinositol-3 kinase are required for survival of wild-type and NF1 mutant sensory neurons. *J Neurosci* 1998; **18**: 10420-10428.
- Klumpp, S., Kriha, D., Bechmann, G., Maassen, A., Maier, S., Pallast, S., Hoell, P. et Kriegstein, J. Phosphorylation of the growth factors bFGF, NGF and BDNF: a prerequisite for their biological activity. *Neurochem Int* 2006; **48**: 131-137.
- Knusel, B., Gao, H., Okazaki, T., Yoshida, T., Mori, N., Hefti, F. et Kaplan, D.R. Ligand-induced down-regulation of Trk messenger RNA, protein and tyrosine phosphorylation in rat cortical neurons. *Neuroscience* 1997; **78**: 851-862.
- Kobayashi, H., Gleich, G.J., Butterfield, J.H. et Kita, H. Human eosinophils produce neurotrophins and secrete nerve growth factor on immunologic stimuli. *Blood* 2002; **99**: 2214-2220.
- Kohyama, T., Liu, X., Wen, F.Q., Kobayashi, T., Abe, S., Ertl, R. et Rennard, S.I. Nerve growth factor stimulates fibronectin-induced fibroblast migration. *J Lab Clin Med* 2002; **140**: 329-335.
- Kokaia, Z., Andsberg, G., Martinez-Serrano, A. et Lindvall, O. Focal cerebral ischemia in rats induces expression of P75 neurotrophin receptor in resistant striatal cholinergic neurons. *Neuroscience* 1998; **84**: 1113-1125.
- Kong, H., Boulter, J., Weber, J.L., Lai, C. et Chao, M.V. An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci* 2001; **21**: 176-185.
- Korhonen, J.M., Said, F.A., Wong, A.J. et Kaplan, D.R. Gab1 mediates neurite outgrowth, DNA synthesis, and survival in PC12 cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 37307-37314.
- Kraemer, R., Nguyen, H., March, K.L. et Hempstead, B. NGF activates similar intracellular signaling pathways in vascular smooth muscle cells as PDGF-BB but elicits different biological responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19**: 1041-1050.
- Krajewska, M., Krajewski, S., Zapata, J.M., Van Arsdale, T., Gascoyne, R.D., Berern, K., McFadden, D., Shabaik, A., Hugh, J., Reynolds, A., Clevenger, C.V. et Reed, J.C. TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am J Pathol* 1998; **152**: 1549-1561.
- Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Gelfand, E.W. et Brodie, C. NGF rescues human B lymphocytes from anti-IgM induced apoptosis by activation of PKCzeta. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 136-143.
- Kuruvilla, R., Ye, H. et Ginty, D.D. Spatially and functionally distinct roles of the PI3-K effector pathway during NGF signaling in sympathetic neurons. *Neuron* 2000; **27**: 499-512.
- la Sala, A., Corinti, S., Federici, M., Saragovi, H.U. et Girolomoni, G. Ligand activation of nerve growth factor receptor TrkA protects monocytes from apoptosis. *J Leukoc Biol* 2000; **68**: 104-110.
- LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G. et MacKenzie, A.E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; **17**: 3247-3259.
- Lachyankar, M.B., Condon, P.J., Daou, M.C., De, A.K., Levine, J.B., Obermeier, A. et Ross, A.H. Novel functional interactions between Trk kinase and p75 neurotrophin receptor in neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 2003; **71**: 157-172.
- Lad, S.P. et Neet, K.E. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway through p75NTR: a common mechanism for the neurotrophin family. *J Neurosci Res* 2003; **73**: 614-626.
- Ladiwala, U., Lachance, C., Simoneau, S.J., Bhakar, A., Barker, P.A. et Antel, J.P. p75 neurotrophin receptor expression on adult human oligodendrocytes: signaling without cell death in response to NGF. *J Neurosci* 1998; **18**: 1297-1304.
- Lambert, W., Agarwal, R., Howe, W., Clark, A.F. et Wordinger, R.J. Neurotrophin and neurotrophin receptor expression by cells of the human lamina cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; **42**: 2315-2323.
- Lambert, W.S., Clark, A.F. et Wordinger, R.J. Effect of exogenous neurotrophins on Trk receptor phosphorylation, cell proliferation, and neurotrophin secretion by cells isolated from the human lamina cribrosa. *Mol Vis* 2004; **10**: 289-296.
- Lambiase, A., Bonini, S., Micera, A., Rama, P., Bonini, S. et Aloe, L. Expression of nerve growth factor receptors on the ocular surface in healthy subjects and during manifestation of inflammatory diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; **39**: 1272-1275.
- Lambiase, A., Bracci-Laudiero, L., Bonini, S., Bonini, S., Starace, G., D'Elis, M.M., De Carli, M. et Aloe, L. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol* 1997; **100**: 408-414.
- Lambiase, A., Manni, L., Bonini, S., Rama, P., Micera, A. et Aloe, L. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 1063-1069.

- Lauren, J., Airaksinen, M.S., Saarna, M. et Timmusk, T. Two novel mammalian Nogo receptor homologs differentially expressed in the central and peripheral nervous systems. *Mol Cell Neurosci* 2003; **24**: 581-594.
- Lee, F.S. et Chao, M.V. Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 3555-3560.
- Lee, F.S., Rajagopal, R. et Chao, M.V. Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; **13**: 11-17.
- Lee, F.S., Rajagopal, R., Kim, A.H., Chang, P.C. et Chao, M.V. Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *J Biol Chem* 2002; **277**: 9096-9102.
- Lee, K.F., Li, E., Huber, L.J., Landis, S.C., Sharpe, A.H., Chao, M.V. et Jaenisch, R. Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell* 1992; **69**: 737-749.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K. et Hempstead, B.L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001; **294**: 1945-1948.
- Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A.J., Canuel, M. et Morales, C.R. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *Embo J* 2003; **22**: 6430-6437.
- Leon, A., Burianni, A., Dal Toso, R., Fabris, M., Romanello, S., Aloe, L. et Levi-Montalcini, R. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 3739-3743.
- Leserer, M., Gschwind, A. et Ullrich, A. Epidermal growth factor receptor signal transactivation. *IUBMB Life* 2000; **49**: 405-409.
- Levi-Montalcini, R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987; **237**: 1154-1162.
- Levi-Montalcini, R., Dal Toso, R., della Valle, F., Skaper, S.D. et Leon, A. Update of the NGF saga. *J Neurol Sci* 1995; **130**: 119-127.
- Levi-Montalcini, R. et Hamburger, V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 1951; **116**: 321-361.
- Levi-Montalcini, R., Skaper, S.D., Dal Toso, R., Petrelli, L. et Leon, A. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci* 1996; **19**: 514-520.
- Lewin, G.R. et Mendell, L.M. Regulation of cutaneous C-fiber heat nociceptors by nerve growth factor in the developing rat. *J Neurophysiol* 1994; **71**: 941-949.
- Lewin, G.R., Ritter, A.M. et Mendell, L.M. Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. *J Neurosci* 1993; **13**: 2136-2148.
- Li, X. et Wilson, J.W. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **156**: 229-233.
- Lilly, C.M., Nakamura, H., Kesselman, H., Nagler-Anderson, C., Asano, K., Garcia-Zepeda, E.A., Rothenberg, M.E., Drazen, J.M. et Luster, A.D. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997; **99**: 1767-1773.
- Lindholm, D., Castren, E., Hengerer, B., Zafra, F., Berninger, B. et Thoenen, H. Differential Regulation of Nerve Growth Factor (NGF) Synthesis in Neurons and Astrocytes by Glucocorticoid Hormones. *Eur J Neurosci* 1992; **4**: 404-410.
- Lindholm, D., Hengerer, B., Heumann, R., Carroll, P. et Thoenen, H. Glucocorticoid Hormones Negatively Regulate Nerve Growth Factor Expression In Vivo and in Cultured Rat Fibroblasts. *Eur J Neurosci* 1990; **2**: 795-801.
- Lindholm, D., Heumann, R., Hengerer, B. et Thoenen, H. Interleukin 1 increases stability and transcription of mRNA encoding nerve growth factor in cultured rat fibroblasts. *J Biol Chem* 1988; **263**: 16348-16351.
- Lindholm, D., Heumann, R., Meyer, M. et Thoenen, H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 1987; **330**: 658-659.
- Lindsay, R.M. et Harmar, A.J. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature* 1989; **337**: 362-364.
- Linggi, M.S., Burke, T.L., Williams, B.B., Harrington, A., Kraemer, R., Hempstead, B.L., Yoon, S.O. et Carter, B.D. Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) is an essential mediator of apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* 2005; **280**: 13801-13808.
- Liu, Y.Z., Boxer, L.M. et Latchman, D.S. Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 2086-2090.
- Loeb, D.M. et Greene, L.A. Transfection with trk restores "slow" NGF binding, efficient NGF uptake, and multiple NGF responses to NGF-nonresponsive PC12 cell mutants. *J Neurosci* 1993; **13**: 2919-2929.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D. et Schlessinger, J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 1992; **70**: 431-442.
- Lu, B., Pang, P.T. et Woo, N.H. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 2005; **6**: 603-614.
- MacDonald, J.I. et Meakin, S.O. Deletions in the extracellular domain of rat trkA lead to an altered differentiative phenotype in neurotrophin responsive cells. *Mol Cell Neurosci* 1996; **7**: 371-390.
- Maggirwar, S.B., Sarmiere, P.D., Dewhurst, S. et Freeman, R.S. Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998; **18**: 10356-10365.

- Mahadeo, D., Kaplan, L., Chao, M.V. et Hempstead, B.L. High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem* 1994; **269**: 6884-6891.
- Makkerh, J.P., Ceni, C., Auld, D.S., Vaillancourt, F., Dorval, G. et Barker, P.A. p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation. *EMBO Rep* 2005; **6**: 936-941.
- Mamidipudi, V., Li, X. et Wooten, M.W. Identification of interleukin 1 receptor-associated kinase as a conserved component in the p75-neurotrophin receptor activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 2002; **277**: 28010-28018.
- Mamidipudi, V. et Wooten, M.W. Dual role for p75(NTR) signaling in survival and cell death: can intracellular mediators provide an explanation? *J Neurosci Res* 2002; **68**: 373-384.
- Manni, L., Lundeberg, T., Fiorito, S., Bonini, S., Vigneti, E. et Aloe, L. Nerve growth factor release by human synovial fibroblasts prior to and following exposure to tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and cholecystokinin-8: the possible role of NGF in the inflammatory response. *Clin Exp Rheumatol* 2003; **21**: 617-624.
- Manning, P.T., Russell, J.H., Simmons, B. et Johnson, E.M., Jr. Protection from guanethidine-induced neuronal destruction by nerve growth factor: effect of NGF on immune function. *Brain Res* 1985; **340**: 61-69.
- Mao, Z., Bonni, A., Xia, F., Nadal-Vicens, M. et Greenberg, M.E. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* 1999; **286**: 785-790.
- Marais, R., Wynne, J. et Treisman, R. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 1993; **73**: 381-393.
- Marmor, M.D. et Yarden, Y. Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 2004; **23**: 2057-2070.
- Martin-Zanca, D., Mitra, G., Long, L.K. et Barbacid, M. Molecular characterization of the human trk oncogene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; **51 Pt 2**: 983-992.
- Matsuda, H., Coughlin, M.D., Bienenstock, J. et Denburg, J.A. Nerve growth factor promotes human hemopoietic colony growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**: 6508-6512.
- Matsuda, H., Kannan, Y., Ushio, H., Kiso, Y., Kanemoto, T., Suzuki, H. et Kitamura, Y. Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J Exp Med* 1991; **174**: 7-14.
- Mattson, M.P. NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem Res* 2005; **30**: 883-893.
- Mazella, J. Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* 2001; **13**: 1-6.
- Mazzoni, I.E., Said, F.A., Aloyz, R., Miller, F.D. et Kaplan, D. Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J Neurosci* 1999; **19**: 9716-9727.
- McCarthy, J.V., Ni, J. et Dixit, V.M. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* 1998; **273**: 16968-16975.
- McCauslin, C.S., Heath, V., Colangelo, A.M., Malik, R., Lee, S., Mallei, A., Mocchetti, I. et Johnson, P.F. C/EBPdelta and CREB mediate inducible expression of the nerve growth factor gene in the central nervous system. *J Biol Chem* 2006.
- McCormick, F. Ras-related proteins in signal transduction and growth control. *Mol Reprod Dev* 1995; **42**: 500-506.
- McDonald, N.Q. et Chao, M.V. Structural determinants of neurotrophin action. *J Biol Chem* 1995; **270**: 19669-19672.
- McInnes, C. et Sykes, B.D. Growth factor receptors: structure, mechanism, and drug discovery. *Biopolymers* 1997; **43**: 339-366.
- McMahon, S.B. NGF as a mediator of inflammatory pain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996; **351**: 431-440.
- Meakin, S.O. et Shooter, E.M. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci* 1992; **15**: 323-331.
- Metsis, M. Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**: 1014-1020.
- Metsis, M., Timmusk, T., Allikmets, R., Saarma, M. et Persson, H. Regulatory elements and transcriptional regulation by testosterone and retinoic acid of the rat nerve growth factor receptor promoter. *Gene* 1992; **121**: 247-254.
- Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., Crowell, T., Cate, R.L., McCoy, J.M. et Pepinsky, R.B. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 2004; **7**: 221-228.
- Micera, A., Puxeddu, I., Lambiase, A., Antonelli, A., Bonini, S., Aloe, L., Pe'er, J. et Levi-Schaffer, F. The pro-fibrogenic effect of nerve growth factor on conjunctival fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta. *Clin Exp Allergy* 2005; **35**: 650-656.
- Micera, A., Vigneti, E., Pickholtz, D., Reich, R., Pappo, O., Bonini, S., Maquart, F.X., Aloe, L. et Levi-Schaffer, F. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 6162-6167.
- Miller, F.D. et Kaplan, D.R. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**: 1045-1053.
- Mitra, G. Mutational analysis of conserved residues in the tyrosine kinase domain of the human trk oncogene. *Oncogene* 1991; **6**: 2237-2241.

- Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I.R. et Schwartz, M. Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J Autoimmun* 2000; **15**: 331-345.
- Mobley, W.C., Schenker, A. et Shooter, E.M. Characterization and isolation of proteolytically modified nerve growth factor. *Biochemistry* 1976; **15**: 5543-5552.
- Mocchetti, I., De Bernardi, M.A., Szekely, A.M., Alho, H., Brooker, G. et Costa, E. Regulation of nerve growth factor biosynthesis by beta-adrenergic receptor activation in astrocytoma cells: a potential role of c-Fos protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 3891-3895.
- Moore, J.B., Jr., Mobley, W.C. et Shooter, E.M. Proteolytic modification of the beta nerve growth factor protein. *Biochemistry* 1974; **13**: 833-840.
- Moser, K.V., Reindl, M., Blasig, I. et Humpel, C. Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, express NGF receptors and secrete NGF after inflammation. *Brain Res* 2004; **1017**: 53-60.
- Mukai, J., Hachiya, T., Shoji-Hoshino, S., Kimura, M.T., Nadano, D., Suvanto, P., Hanaoka, T., Li, Y., Irie, S., Greene, L.A. et Sato, T.A. NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem* 2000; **275**: 17566-17570.
- Mukai, J., Shoji, S., Kimura, M.T., Okubo, S., Sano, H., Suvanto, P., Li, Y., Irie, S. et Sato, T.A. Structure-function analysis of NADE: identification of regions that mediate nerve growth factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; **277**: 13973-13982.
- Mukai, J., Suvant, P. et Sato, T.A. Nerve growth factor-dependent regulation of NADE-induced apoptosis. *Vitam Horm* 2003; **66**: 385-402.
- Muller, D., Davidoff, M.S., Bargheer, O., Paust, H.J., Pusch, W., Koeva, Y., Jezek, D., Holstein, A.F. et Middendorff, R. The expression of neurotrophins and their receptors in the prenatal and adult human testis: evidence for functions in Leydig cells. *Histochem Cell Biol* 2006: 1-13.
- Munck Petersen, C., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Tauris, J., Jacobsen, L., Gliemann, J., Moestrup, S.K. et Madsen, P. Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *Embo J* 1999; **18**: 595-604.
- Muragaki, Y., Timothy, N., Leight, S., Hempstead, B.L., Chao, M.V., Trojanowski, J.Q. et Lee, V.M. Expression of trk receptors in the developing and adult human central and peripheral nervous system. *J Comp Neurol* 1995; **356**: 387-397.
- Murakami, M., Tada, K., Nakajima, K. et Kudo, I. Cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin D2 generation is initiated by nerve growth factor in rat peritoneal mast cells: its augmentation by extracellular type II secretory phospholipase A2. *J Immunol* 1997; **159**: 439-446.
- Murase, K., Murakami, Y., Takayanagi, K., Furukawa, Y. et Hayashi, K. Human fibroblast cells synthesize and secrete nerve growth factor in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **184**: 373-379.
- Muratani, M. et Tansey, W.P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 192-201.
- Murphy, R.A., Chlumecky, V., Smillie, L.B., Carpenter, M., Natriss, M., Anderson, J.K., Rhodes, J.A., Barker, P.A., Siminoski, K., Campenot, R.B. et al. Isolation and characterization of a glycosylated form of beta nerve growth factor in mouse submandibular glands. *J Biol Chem* 1989; **264**: 12502-12509.
- Murray, S.S., Perez, P., Lee, R., Hempstead, B.L. et Chao, M.V. A novel p75 neurotrophin receptor-related protein, NRH2, regulates nerve growth factor binding to the TrkA receptor. *J Neurosci* 2004; **24**: 2742-2749.
- Nakahashi, T., Fujimura, H., Altar, C.A., Li, J., Kambayashi, J., Tandon, N.N. et Sun, B. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 2000; **470**: 113-117.
- Nassenstein, C., Braun, A., Erpenbeck, V.J., Lommatzsch, M., Schmidt, S., Krug, N., Luttmann, W., Renz, H. et Virchow, J.C., Jr. The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma. *J Exp Med* 2003; **198**: 455-467.
- Nassenstein, C., Schulte-Herbruggen, O., Renz, H. et Braun, A. Nerve growth factor: the central hub in the development of allergic asthma? *Eur J Pharmacol* 2006; **533**: 195-206.
- Naveilhan, P., Neveu, I., Baudet, C., Funakoshi, H., Wion, D., Brachet, P. et Metsis, M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of the low-affinity neurotrophin receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; **41**: 259-268.
- Neet, K.E. et Campenot, R.B. Receptor binding, internalization, and retrograde transport of neurotrophic factors. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**: 1021-1035.
- Nemoto, K., Fukamachi, K., Nemoto, F., Miyata, S., Hamada, M., Nakamura, Y., Senba, E. et Ueyama, T. Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **245**: 284-288.
- Neuman, T., Metsis, M., Persson, H. et Gruss, P. Cell type-specific negative regulatory element in low-affinity nerve growth factor receptor gene. *Brain Res Mol Brain Res* 1993; **20**: 199-208.
- Nichols, R.A. et Shooter, E.M. Characterization of the differential interaction of the microheterogeneous forms of the gamma subunit of 7 S nerve growth factor with natural and synthetic ligands. *J Biol Chem* 1983; **258**: 10296-10303.

- Nielsen, M.S., Madsen, P., Christensen, E.I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R. et Petersen, C.M. The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *Embo J* 2001; **20**: 2180-2190.
- Nikolic, M. The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; **34**: 731-745.
- Nilsson, G., Forsberg-Nilsson, K., Xiang, Z., Hallbook, F., Nilsson, K. et Metcalfe, D.D. Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 2295-2301.
- Ninkina, N., Grashchuck, M., Buchman, V.L. et Davies, A.M. TrkB variants with deletions in the leucine-rich motifs of the extracellular domain. *J Biol Chem* 1997; **272**: 13019-13025.
- Nithya, M., Suguna, L. et Rose, C. The effect of nerve growth factor on the early responses during the process of wound healing. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1620**: 25-31.
- Nockher, W.A. et Renz, H. Neurotrophins in allergic diseases: from neuronal growth factors to intercellular signaling molecules. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **117**: 583-589.
- Noga, O., Englmann, C., Hanf, G., Grutzkau, A., Guhl, S. et Kunkel, G. Activation of the specific neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC influences the function of eosinophils. *Clin Exp Allergy* 2002; **32**: 1348-1354.
- Noga, O., Englmann, C., Hanf, G., Grutzkau, A., Seybold, J. et Kunkel, G. The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Clin Exp Allergy* 2003; **33**: 649-654.
- Noga, O., Hanf, G., Gorges, D., Thai Dinh, Q., Groneberg, D.A., Suttorp, N. et Kunkel, G. Regulation of NGF and BDNF by dexamethasone and theophylline in human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Regul Pept* 2005; **132**: 74-79.
- Noga, O., Hanf, G., Schaper, C., O'Connor, A. et Kunkel, G. The influence of inhalative corticosteroids on circulating Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 in allergic asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2001; **31**: 1906-1912.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., Hempstead, B.L. et Petersen, C.M. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 2004; **427**: 843-848.
- Obermeier, A., Halfter, H., Wiesmuller, K.H., Jung, G., Schlessinger, J. et Ullrich, A. Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *Embo J* 1993; **12**: 933-941.
- Obermeier, A., Lammers, R., Wiesmuller, K.H., Jung, G., Schlessinger, J. et Ullrich, A. Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J Biol Chem* 1993; **268**: 22963-22966.
- O'Connell, L., Hongo, J.A., Presta, L.G. et Tsoulfas, P. TrkA amino acids controlling specificity for nerve growth factor. *J Biol Chem* 2000; **275**: 7870-7877.
- Oefner, C., D'Arcy, A., Winkler, F.K., Eggmann, B. et Hosang, M. Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB. *Embo J* 1992; **11**: 3921-3926.
- Ohmichi, M., Decker, S.J. et Saltiel, A.R. Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by nerve growth factor involves indirect coupling of the trk proto-oncogene with src homology 2 domains. *Neuron* 1992; **9**: 769-777.
- Olgart, C. et Frossard, N. Human lung fibroblasts secrete nerve growth factor: effect of inflammatory cytokines and glucocorticoids. *Eur Respir J* 2001; **18**: 115-121.
- Olgart Hoglund, C., de Blay, F., Oster, J.P., Duvernelle, C., Kassel, O., Pauli, G. et Frossard, N. Nerve growth factor levels and localisation in human asthmatic bronchi. *Eur Respir J* 2002; **20**: 1110-1116.
- Ollerenshaw, S.L., Jarvis, D., Sullivan, C.E. et Woolcock, A.J. Substance P immunoreactive nerves in airways from asthmatics and nonasthmatics. *Eur Respir J* 1991; **4**: 673-682.
- Oren, A., Falk, K., Rotzschke, O., Bechmann, I., Nitsch, R. et Gimsa, U. Production of neuroprotective NGF in astrocyte-T helper cell cocultures is upregulated following antigen recognition. *J Neuroimmunol* 2004; **149**: 59-65.
- Otten, U., Ehrhard, P. et Peck, R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 10059-10063.
- Otten, U., Scully, J.L., Ehrhard, P.B. et Gadiant, R.A. Neurotrophins: signals between the nervous and immune systems. *Prog Brain Res* 1994; **103**: 293-305.
- Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M. et Donner, D.B. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999; **401**: 82-85.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Bubici, C., Jayawardena, S., Alvarez, K., Matsuda, S., Nguyen, D.U., Pham, C.G., Nelsbach, A.H., Melis, T., De Smaele, E., Tang, W.J., D'Adamio, L. et Franzoso, G. Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 146-153.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C.G., Bubici, C. et Franzoso, G. Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* 2004; **117**: 5197-5208.
- Park, J.A., Lee, J.Y., Sato, T.A. et Koh, J.Y. Co-induction of p75NTR and p75NTR-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat. *J Neurosci* 2000; **20**: 9096-9103.
- Patapoutian, A. et Reichardt, L.F. Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol* 2000; **10**: 392-399.

- Path, G., Braun, A., Meents, N., Kerzel, S., Quarcoo, D., Raap, U., Hoyle, G.W., Nockher, W.A. et Renz, H. Augmentation of allergic early-phase reaction by nerve growth factor. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **166**: 818-826.
- Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J. et Sturgill, T.W. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *Embo J* 1991; **10**: 885-892.
- Pearce, F.L. et Thompson, H.L. Some characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated with nerve growth factor. *J Physiol* 1986; **372**: 379-393.
- Peeraully, M.R., Jenkins, J.R. et Trayhurn, P. NGF gene expression and secretion in white adipose tissue: regulation in 3T3-L1 adipocytes by hormones and inflammatory cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **287**: E331-339.
- Peiro, S., Comella, J.X., Enrich, C., Martin-Zanca, D. et Rocamora, N. PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 37846-37852.
- Pignot, V., Hein, A.E., Barske, C., Wiessner, C., Walmsley, A.R., Kaupmann, K., Mayeur, H., Sommer, B., Mir, A.K. et Frenzel, S. Characterization of two novel proteins, NgrRH1 and NgrRH2, structurally and biochemically homologous to the Nogo-66 receptor. *J Neurochem* 2003; **85**: 717-728.
- Piiper, A., Dikic, I., Lutz, M.P., Leser, J., Kronenberger, B., Elez, R., Cramer, H., Muller-Esterl, W. et Zeuzem, S. Cyclic AMP induces transactivation of the receptors for epidermal growth factor and nerve growth factor, thereby modulating activation of MAP kinase, Akt, and neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 43623-43630.
- Pike, L.J. Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1746**: 260-273.
- Pincelli, C. Nerve growth factor and keratinocytes: a role in psoriasis. *Eur J Dermatol* 2000; **10**: 85-90.
- Pincelli, C. et Marconi, A. Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2000; **22**: 71-79.
- Plafker, S.M., Plafker, K.S., Weissman, A.M. et Macara, I.G. Ubiquitin charging of human class III ubiquitin-conjugating enzymes triggers their nuclear import. *J Cell Biol* 2004; **167**: 649-659.
- Plo, I., Bono, F., Bezombes, C., Alam, A., Bruno, A. et Laurent, G. Nerve growth factor-induced protein kinase C stimulation contributes to TrkA-dependent inhibition of p75 neurotrophin receptor sphingolipid signaling. *J Neurosci Res* 2004; **77**: 465-474.
- Pons, F., Freund, V., Kuissu, H., Mathieu, E., Olgart, C. et Frossard, N. Nerve growth factor secretion by human lung epithelial A549 cells in pro- and anti-inflammatory conditions. *Eur J Pharmacol* 2001; **428**: 365-369.
- Pshenichkin, S.P., Szekely, A.M. et Wise, B.C. Transcriptional and posttranscriptional mechanisms involved in the interleukin-1, steroid, and protein kinase C regulation of nerve growth factor in cortical astrocytes. *J Neurochem* 1994; **63**: 419-428.
- Quarcoo, D., Schulte-Herbruggen, O., Lommatzsch, M., Schierhorn, K., Hoyle, G.W., Renz, H. et Braun, A. Nerve growth factor induces increased airway inflammation via a neuropeptide-dependent mechanism in a transgenic animal model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2004; **34**: 1146-1151.
- Racke, M.M., Mason, P.J., Johnson, M.P., Brankamp, R.G. et Linnik, M.D. Demonstration of a second pharmacologically active promoter region in the NGF gene that induces transcription at exon 3. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; **41**: 192-199.
- Radeke, M.J., Misko, T.P., Hsu, C., Herzenberg, L.A. et Shooter, E.M. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* 1987; **325**: 593-597.
- Rahbek, U.L., Dissing, S., Thomassen, C., Hansen, A.J. et Tritsarlis, K. Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK-dependent migration. *Pflugers Arch* 2005; **450**: 355-361.
- Rajagopal, R., Chen, Z.Y., Lee, F.S. et Chao, M.V. Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *J Neurosci* 2004; **24**: 6650-6658.
- Rapp, G., Freudenstein, J., Klaudiny, J., Mucha, J., Wempe, F., Zimmer, M. et Scheit, K.H. Characterization of three abundant mRNAs from human ovarian granulosa cells. *DNA Cell Biol* 1990; **9**: 479-485.
- Rattenholl, A., Lilie, H., Grossmann, A., Stern, A., Schwarz, E. et Rudolph, R. The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from Escherichia coli inclusion bodies. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 3296-3303.
- Rattenholl, A., Ruoppolo, M., Flagiello, A., Monti, M., Vinci, F., Marino, G., Lilie, H., Schwarz, E. et Rudolph, R. Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *J Mol Biol* 2001; **305**: 523-533.
- Raychaudhuri, S.K., Raychaudhuri, S.P., Weltman, H. et Farber, E.M. Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Arch Dermatol Res* 2001; **293**: 291-295.
- Reichardt, L.F. et Mobley, W.C. Going the distance, or not, with neurotrophin signals. *Cell* 2004; **118**: 141-143.
- Reynolds, A.J., Bartlett, S.E. et Hendry, I.A. Signalling events regulating the retrograde axonal transport of 125I-beta nerve growth factor in vivo. *Brain Res* 1998; **798**: 67-74.

- Reynolds, A.J., Heydon, K., Bartlett, S.E. et Hendry, I.A. Evidence for phosphatidylinositol 4-kinase and actin involvement in the regulation of 125I-beta-nerve growth factor retrograde axonal transport. *J Neurochem* 1999; **73**: 87-95.
- Ricci, A., Felici, L., Mariotta, S., Mannino, F., Schmid, G., Terzano, C., Cardillo, G., Amenta, F. et Bronzetti, E. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; **30**: 12-19.
- Ricci, A., Greco, S., Mariotta, S., Felici, L., Amenta, F. et Bronzetti, E. Neurotrophin and neurotrophin receptor expression in alveolar macrophages: an immunocytochemical study. *Growth Factors* 2000; **18**: 193-202.
- Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C.M., Blendy, J.A. et Ginty, D.D. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 1999; **286**: 2358-2361.
- Robinson, R.C., Radziejewski, C., Spraggon, G., Greenwald, J., Kostura, M.R., Burtnick, L.D., Stuart, D.I., Choe, S. et Jones, E.Y. The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. *Protein Sci* 1999; **8**: 2589-2597.
- Robinson, R.C., Radziejewski, C., Stuart, D.I. et Jones, E.Y. Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry* 1995; **34**: 4139-4146.
- Roche, W.R., Beasley, R., Williams, J.H. et Holgate, S.T. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989; **1**: 520-524.
- Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., Gotz, R. et Barde, Y.A. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *Embo J* 1992; **11**: 917-922.
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D. et Downward, J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 1994; **370**: 527-532.
- Rosini, P., De Chiara, G., Bonini, P., Lucibello, M., Marcocci, M.E., Garaci, E., Cozzolino, F. et Torcia, M. Nerve growth factor-dependent survival of CESS B cell line is mediated by increased expression and decreased degradation of MAPK phosphatase 1. *J Biol Chem* 2004; **279**: 14016-14023.
- Ross, A.H., Daou, M.C., McKinnon, C.A., Condon, P.J., Lachyankar, M.B., Stephens, R.M., Kaplan, D.R. et Wolf, D.E. The neurotrophin receptor, gp75, forms a complex with the receptor tyrosine kinase TrkA. *J Cell Biol* 1996; **132**: 945-953.
- Ross, G.M., Shamovsky, I.L., Lawrance, G., Solc, M., Dostaler, S.M., Weaver, D.F. et Riopelle, R.J. Reciprocal modulation of TrkA and p75NTR affinity states is mediated by direct receptor interactions. *Eur J Neurosci* 1998; **10**: 890-898.
- Rost, B., Hanf, G., Ohnemus, U., Otto-Knapp, R., Groneberg, D.A., Kunkel, G. et Noga, O. Monocytes of allergics and non-allergics produce, store and release the neurotrophins NGF, BDNF and NT-3. *Regul Pept* 2005; **124**: 19-25.
- Roux, P.P. et Barker, P.A. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 2002; **67**: 203-233.
- Roux, P.P., Bhakar, A.L., Kennedy, T.E. et Barker, P.A. The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 2001; **276**: 23097-23104.
- Roux, P.P., Colicos, M.A., Barker, P.A. et Kennedy, T.E. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *J Neurosci* 1999; **19**: 6887-6896.
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P.G. et al. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 1992; **360**: 689-692.
- Ryden, M. et Ibanez, C.F. Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC. *J Biol Chem* 1996; **271**: 5623-5627.
- Sacristan, M.P., de Diego, J.G., Bonilla, M. et Martin-Zanca, D. Molecular cloning and characterization of the 5' region of the mouse trkA proto-oncogene. *Oncogene* 1999; **18**: 5836-5842.
- Safieh-Garabedian, B., Poole, S., Allchorne, A., Winter, J. et Woolf, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1995; **115**: 1265-1275.
- Salehi, A.H., Roux, P.P., Kubu, C.J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L.L., Verdi, J.M. et Barker, P.A. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 2000; **27**: 279-288.
- Salehi, A.H., Xanthoudakis, S. et Barker, P.A. NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**: 48043-48050.
- Samina Riaz, S. et Tomlinson, D.R. Pharmacological modulation of nerve growth factor synthesis: a mechanistic comparison of vitamin D receptor and beta(2)-adrenoceptor agonists. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; **85**: 179-188.
- Samuels, I.S., Seibenhener, M.L., Neidigh, K.B. et Wooten, M.W. Nerve growth factor stimulates the interaction of ZIP/p62 with atypical protein kinase C and targets endosomal localization: evidence for regulation of nerve growth factor-induced differentiation. *J Cell Biochem* 2001; **82**: 452-466.
- Sanico, A.M., Stanisz, A.M., Gleeson, T.D., Bora, S., Proud, D., Bienenstock, J., Koliatsos, V.E. et Togias, A. Nerve growth factor expression and release in allergic inflammatory disease of the upper airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**: 1631-1635.

- Santambrogio, L., Benedetti, M., Chao, M.V., Muzaffar, R., Kulig, K., Gabellini, N. et Hochwald, G. Nerve growth factor production by lymphocytes. *J Immunol* 1994; **153**: 4488-4495.
- Saxena, S., Bucci, C., Weis, J. et Kruttgen, A. The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neurotogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *J Neurosci* 2005; **25**: 10930-10940.
- Saxena, S., Howe, C.L., Cosgaya, J.M., Hu, M., Weis, J. et Kruttgen, A. Differences in the surface binding and endocytosis of neurotrophins by p75NTR. *Mol Cell Neurosci* 2004; **26**: 292-307.
- Saxena, S., Howe, C.L., Cosgaya, J.M., Steiner, P., Hirling, H., Chan, J.R., Weis, J. et Kruttgen, A. Differential endocytic sorting of p75NTR and TrkA in response to NGF: a role for late endosomes in TrkA trafficking. *Mol Cell Neurosci* 2005; **28**: 571-587.
- Schatteman, G.C., Langer, T., Lanahan, A.A. et Bothwell, M.A. Distribution of the 75-kD low-affinity nerve growth factor receptor in the primate peripheral nervous system. *Somatosens Mot Res* 1993; **10**: 415-432.
- Schlessinger, J. SH2/SH3 signaling proteins. *Curr Opin Genet Dev* 1994; **4**: 25-30.
- Schlunegger, M.P. et Grutter, M.G. Refined crystal structure of human transforming growth factor beta 2 at 1.95 Å resolution. *J Mol Biol* 1993; **231**: 445-458.
- Segal, R.A. et Greenberg, M.E. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 1996; **19**: 463-489.
- Sehgal, A., Patil, N. et Chao, M. A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 3160-3167.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., Chretien, M. et Murphy, R.A. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* 1996; **314** (Pt 3): 951-960.
- Selby, M.J., Edwards, R., Sharp, F. et Rutter, W.J. Mouse nerve growth factor gene: structure and expression. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 3057-3064.
- Server, A.C. et Shooter, E.M. Nerve growth factor. *Adv Protein Chem* 1977; **31**: 339-409.
- Settanni, G., Cattaneo, A. et Carloni, P. Molecular dynamics simulations of the NGF-TrkA domain 5 complex and comparison with biological data. *Biophys J* 2003; **84**: 2282-2292.
- Shamovsky, I.L., Ross, G.M., Riopelle, R.J. et Weaver, D.F. The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study. *Protein Sci* 1999; **8**: 2223-2233.
- Shao, Y., Akmentin, W., Toledo-Aral, J.J., Rosenbaum, J., Valdez, G., Cabot, J.B., Hilbush, B.S. et Halegoua, S. Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes. *J Cell Biol* 2002; **157**: 679-691.
- Shcherbik, N. et Haines, D.S. Ub on the move. *J Cell Biochem* 2004; **93**: 11-19.
- Sheng, M. et Sala, C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 2001; **24**: 1-29.
- Sherer, T.B., Neff, P.S., Hankins, G.R. et Tuttle, J.B. Mechanisms of increased NGF production in vascular smooth muscle of the spontaneously hypertensive rat. *Exp Cell Res* 1998; **241**: 186-193.
- Shimamura, A., Ballif, B.A., Richards, S.A. et Blenis, J. Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Curr Biol* 2000; **10**: 127-135.
- Shinagawa, K. et Kojima, M. Mouse model of airway remodeling: strain differences. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; **168**: 959-967.
- Shishodia, S. et Aggarwal, B.B. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J Biochem Mol Biol* 2002; **35**: 28-40.
- Shonukan, O., Bagayogo, I., McCrea, P., Chao, M. et Hempstead, B. Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin. *Oncogene* 2003; **22**: 3616-3623.
- Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P.P. et Polo, S. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 2760-2765.
- Silverman, R.E. et Bradshaw, R.A. Nerve growth factor: subunit interactions in the mouse submaxillary gland 7S complex. *J Neurosci Res* 1982; **8**: 127-136.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M. et Stenmark, H. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 1998; **394**: 494-498.
- Sin, A.Z., Roche, E.M., Togias, A., Lichtenstein, L.M. et Schroeder, J.T. Nerve growth factor or IL-3 induces more IL-13 production from basophils of allergic subjects than from basophils of nonallergic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2001; **108**: 387-393.
- Skaper, S.D., Pollock, M. et Facci, L. Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; **97**: 177-185.
- Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A. et Barbacid, M. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 1994; **368**: 246-249.
- Smith, C.A., Farrah, T. et Goodwin, R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994; **76**: 959-962.
- Smith, P.G., Warn, J.D., Steinle, J.J., Krizsan-Agbas, D. et Hasan, W. Modulation of parasympathetic neuron phenotype and function by sympathetic innervation. *Auton Neurosci* 2002; **96**: 33-42.
- Snapper, C.M., Finkelman, F.D., Stefany, D., Conrad, D.H. et Paul, W.E. IL-4 induces co-expression of intrinsic membrane IgG1 and IgE by murine B cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol* 1988; **141**: 489-498.

- Solomon, A., Aloe, L., Pe'er, J., Frucht-Pery, J., Bonini, S., Bonini, S. et Levi-Schaffer, F. Nerve growth factor is preformed in and activates human peripheral blood eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1998; **102**: 454-460.
- Sommerfeld, M.T., Schweigreiter, R., Barde, Y.A. et Hoppe, E. Down-regulation of the neurotrophin receptor TrkB following ligand binding. Evidence for an involvement of the proteasome and differential regulation of TrkA and TrkB. *J Biol Chem* 2000; **275**: 8982-8990.
- Stan, R.V. Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1746**: 334-348.
- Stark, B., Risling, M. et Carlstedt, T. Distribution of the neurotrophin receptors p75 and trkB in peripheral mechanoreceptors; observations on changes after injury. *Exp Brain Res* 2001; **136**: 101-107.
- Steinle, J.J. et Granger, H.J. Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation. *Auton Neurosci* 2003; **108**: 57-62.
- Stempelj, M., Carman-Krzan, M. et Ferjan, I. Regulatory role of extracellular Na⁺ and Ca²⁺ ions in nerve growth factor induced histamine secretion from rat mast cells. *Inflamm Res* 2003; **52**: 74-78.
- Stempelj, M. et Ferjan, I. Signaling pathway in nerve growth factor induced histamine release from rat mast cells. *Inflamm Res* 2005; **54**: 344-349.
- Stephens, R.M., Loeb, D.M., Copeland, T.D., Pawson, T., Greene, L.A. et Kaplan, D.R. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 1994; **12**: 691-705.
- Stewart, A.G. Airway wall remodelling and hyperresponsiveness: modelling remodelling in vitro and in vivo. *Pulm Pharmacol Ther* 2001; **14**: 255-265.
- Sugiyama, K., Suzuki, Y. et Furuta, H. Histamine-release induced by 7S nerve-growth factor of mouse submandibular salivary glands. *Arch Oral Biol* 1985; **30**: 93-95.
- Susaki, Y., Shimizu, S., Katakura, K., Watanabe, N., Kawamoto, K., Matsumoto, M., Tsudzuki, M., Furusaka, T., Kitamura, Y. et Matsuda, H. Functional properties of murine macrophages promoted by nerve growth factor. *Blood* 1996; **88**: 4630-4637.
- Suter, U., Heymach, J.V., Jr. et Shooter, E.M. Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *Embo J* 1991; **10**: 2395-2400.
- Sutter, A., Riopelle, R.J., Harris-Warrick, R.M. et Shooter, E.M. Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J Biol Chem* 1979; **254**: 5972-5982.
- Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Gulino, A. et Mackay, A.R. Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. *Fut Oncol* 2005; **1**: 689-698.
- Takahashi, H., Uno, S., Watanabe, Y., Arakawa, K. et Nakagawa, S. Expression of nerve growth factor-induced type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) mRNA is inhibited by genistein and wortmannin. *Neuroreport* 2000; **11**: 1111-1115.
- Tal, M. et Liberman, R. Local injection of nerve growth factor (NGF) triggers degranulation of mast cells in rat paw. *Neurosci Lett* 1997; **221**: 129-132.
- Tam, S.Y., Tsai, M., Yamaguchi, M., Yano, K., Butterfield, J.H. et Galli, S.J. Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood* 1997; **90**: 1807-1820.
- Tanaka, H., Masuda, T., Tokuoka, S., Komai, M., Nagao, K., Takahashi, Y. et Nagai, H. The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Inflamm Res* 2001; **50**: 616-624.
- Taniuchi, M., Johnson, E.M., Jr., Roach, P.J. et Lawrence, J.C., Jr. 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* 1986; **261**: 13342-13349.
- Tanner, R., Chambers, P., Khadra, M.H. et Gillespie, J.I. The production of nerve growth factor by human bladder smooth muscle cells in vivo and in vitro. *BJU Int* 2000; **85**: 1115-1119.
- 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., Kraemer, R.T., Nykjaer, A. et Hempstead, B.L. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 2005; **25**: 5455-5463.
- Thoenen, H., Barde, Y.A., Davies, A.M. et Johnson, J.E. Neurotrophic factors and neuronal death. *Ciba Found Symp* 1987; **126**: 82-95.
- Thoenen, H. et Stockel, K. Ortho- and retrograde axonal transport: importance for the function of adrenergic neurones. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1975; **Suppl 2**: 1-5.
- Thomas, K.A., Baglan, N.C. et Bradshaw, R.A. The amino acid sequence of the gamma-subunit of mouse submaxillary gland 7 S nerve growth factor. *J Biol Chem* 1981; **256**: 9156-9166.
- Thome, M., Hofmann, K., Burns, K., Martinon, F., Bodmer, J.L., Mattmann, C. et Tschoopp, J. Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol* 1998; **8**: 885-888.
- Thorpe, L.W. et Perez-Polo, J.R. The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes. *J Neurosci Res* 1987; **18**: 134-139.
- Thorpe, L.W., Werrbach-Perez, K. et Perez-Polo, J.R. Effects of nerve growth factor on the expression of interleukin-2 receptors on cultured human lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1987; **496**: 310-311.
- Tibbles, L.A., Ing, Y.L., Kiefer, F., Chan, J., Iscove, N., Woodgett, J.R. et Lassam, N.J. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *Embo J* 1996; **15**: 7026-7035.

- Tokuoka, S., Takahashi, Y., Masuda, T., Tanaka, H., Furukawa, S. et Nagai, H. Disruption of antigen-induced airway inflammation and airway hyper-responsiveness in low affinity neurotrophin receptor p75 gene deficient mice. *Br J Pharmacol* 2001; **134**: 1580-1586.
- Tong, X., Xie, D., Roth, W., Reed, J. et Koeffler, H.P. NADE (p75NTR-associated cell death executor) suppresses cellular growth in vivo. *Int J Oncol* 2003; **22**: 1357-1362.
- Torcia, M., Bracci-Laudiero, L., Lucibello, M., Nencioni, L., Labardi, D., Rubartelli, A., Cozzolino, F., Aloe, L. et Garaci, E. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 1996; **85**: 345-356.
- Torcia, M., De Chiara, G., Nencioni, L., Ammendola, S., Labardi, D., Lucibello, M., Rosini, P., Marlier, L.N., Bonini, P., Dello Sbarba, P., Palamara, A.T., Zambrano, N., Russo, T., Garaci, E. et Cozzolino, F. Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release. *J Biol Chem* 2001; **276**: 39027-39036.
- Toyoda, M., Nakamura, M., Makino, T. et Morohashi, M. Localization and content of nerve growth factor in peripheral blood eosinophils of atopic dermatitis patients. *Clin Exp Allergy* 2003; **33**: 950-955.
- Treisman, R., Marais, R. et Wynne, J. Spatial flexibility in ternary complexes between SRF and its accessory proteins. *Embo J* 1992; **11**: 4631-4640.
- Tsuchiya, T., Nishimura, Y., Nishiura, T., Kotani, Y., Funada, Y., Yoshimura, S. et Yokoyama, M. Airway remodeling of murine chronic antigen exposure model. *J Asthma* 2003; **40**: 935-944.
- Tsuda, T., Wong, D., Dolovich, J., Bienenstock, J., Marshall, J. et Denburg, J.A. Synergistic effects of nerve growth factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on human basophilic cell differentiation. *Blood* 1991; **77**: 971-979.
- Tsui-Pierchala, B.A. et Ginty, D.D. Characterization of an NGF-P-TrkA retrograde-signaling complex and age-dependent regulation of TrkA phosphorylation in sympathetic neurons. *J Neurosci* 1999; **19**: 8207-8218.
- Tsui-Pierchala, B.A., Milbrandt, J. et Johnson, E.M., Jr. NGF utilizes c-Ret via a novel GFL-independent, inter-RTK signaling mechanism to maintain the trophic status of mature sympathetic neurons. *Neuron* 2002; **33**: 261-273.
- Ueyama, T., Hamada, M., Hano, T., Nishio, I., Masuyama, Y. et Furukawa, S. Production of nerve growth factor by cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens* 1993; **11**: 1061-1065.
- Ullrich, A., Gray, A., Berman, C., Coussens, L. et Dull, T.J. Sequence homology of human and mouse beta-NGF subunit genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983; **48 Pt 1**: 435-442.
- Ullrich, A., Gray, A., Wood, W.I., Hayflick, J. et Seeburg, P.H. Isolation of a cDNA clone coding for the gamma-subunit of mouse nerve growth factor using a high-stringency selection procedure. *DNA* 1984; **3**: 387-392.
- Ultsch, M.H., Wiesmann, C., Simmons, L.C., Henrich, J., Yang, M., Reilly, D., Bass, S.H. et de Vos, A.M. Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J Mol Biol* 1999; **290**: 149-159.
- Undem, B.J., Hunter, D.D., Liu, M., Haak-Frendscho, M., Oakragly, A. et Fischer, A. Allergen-induced sensory neuroplasticity in airways. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; **118**: 150-153.
- Ure, D.R. et Campenot, R.B. Retrograde transport and steady-state distribution of 125I-nerve growth factor in rat sympathetic neurons in compartmented cultures. *J Neurosci* 1997; **17**: 1282-1290.
- Urfer, R., Tsoulfas, P., O'Connell, L., Hongo, J.A., Zhao, W. et Presta, L.G. High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. *J Biol Chem* 1998; **273**: 5829-5840.
- Urfer, R., Tsoulfas, P., O'Connell, L., Shelton, D.L., Parada, L.F. et Presta, L.G. An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *Embo J* 1995; **14**: 2795-2805.
- Vaillant, A.R., Mazzoni, I., Tudan, C., Boudreau, M., Kaplan, D.R. et Miller, F.D. Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J Cell Biol* 1999; **146**: 955-966.
- Valdez, G., Akmentin, W., Philippidou, P., Kuruvilla, R., Ginty, D.D. et Halegoua, S. Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors. *J Neurosci* 2005; **25**: 5236-5247.
- Varilek, G.W., Neil, G.A., Bishop, W.P., Lin, J. et Pantazis, N.J. Nerve growth factor synthesis by intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 1995; **269**: G445-452.
- Vedder, H., Affolter, H.U. et Otten, U. Nerve growth factor (NGF) regulates tachykinin gene expression and biosynthesis in rat sensory neurons during early postnatal development. *Neuropeptides* 1993; **24**: 351-357.
- Veenstra, T.D., Fahnstock, M. et Kumar, R. An AP-1 site in the nerve growth factor promoter is essential for 1, 25-dihydroxyvitamin D3-mediated nerve growth factor expression in osteoblasts. *Biochemistry* 1998; **37**: 5988-5994.
- Verdi, J.M., Birren, S.J., Ibanez, C.F., Persson, H., Kaplan, D.R., Benedetti, M., Chao, M.V. et Anderson, D.J. p75LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron* 1994; **12**: 733-745.
- Verge, V.M., Riopelle, R.J. et Richardson, P.M. Nerve growth factor receptors on normal and injured sensory neurons. *J Neurosci* 1989; **9**: 914-922.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. et Kolesnick, R.N. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996; **380**: 75-79.

- Vetter, M.L., Martin-Zanca, D., Parada, L.F., Bishop, J.M. et Kaplan, D.R. Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the *trk* protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 5650-5654.
- Vieira, A.V., Lamaze, C. et Schmid, S.L. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 1996; **274**: 2086-2089.
- Vige, X., Costa, E. et Wise, B.C. Mechanism of nerve growth factor mRNA regulation by interleukin-1 and basic fibroblast growth factor in primary cultures of rat astrocytes. *Mol Pharmacol* 1991; **40**: 186-192.
- Vilar, M., Murillo-Carretero, M., Mira, H., Magnusson, K., Besset, V. et Ibanez, C.F. Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle. *Embo J* 2006; **25**: 1219-1230.
- Virchow, J.C., Julius, P., Lommatzsch, M., Luttmann, W., Renz, H. et Braun, A. Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **158**: 2002-2005.
- Wajant, H., Henkler, F. et Scheurich, P. The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal* 2001; **13**: 389-400.
- Walton, M., Woodgate, A.M., Muravlev, A., Xu, R., During, M.J. et Dragunow, M. CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. *J Neurochem* 1999; **73**: 1836-1842.
- Wang, D., Bode, W. et Huber, R. Bovine chymotrypsinogen A X-ray crystal structure analysis and refinement of a new crystal form at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1985; **185**: 595-624.
- Wang, K.C., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Segal, R. et He, Z. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 2002; **420**: 74-78.
- Wang, S.I. et Mukhtar, H. Gene expression profile in human prostate LNCaP cancer cells by (-) epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Lett* 2002; **182**: 43-51.
- Wang, Y.M., Seibenhener, M.L., Vandenplas, M.L. et Wooten, M.W. Atypical PKC zeta is activated by ceramide, resulting in coactivation of NF-kappaB/JNK kinase and cell survival. *J Neurosci Res* 1999; **55**: 293-302.
- Watson, F.L., Heerssen, H.M., Bhattacharyya, A., Klesse, L., Lin, M.Z. et Segal, R.A. Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci* 2001; **4**: 981-988.
- Watson, J.J., Fahey, M.S., van den Worm, E., Engels, F., Nijkamp, F.P., Stroemer, P., McMahan, S., Allen, S.J. et Dawbarn, D. TrkAd5: A novel therapeutic agent for treatment of inflammatory pain and asthma. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **316**: 1122-1129.
- Weier, H.U., Rhein, A.P., Shadravan, F., Collins, C. et Polikoff, D. Rapid physical mapping of the human *trk* protooncogene (*NTRK1*) to human chromosome 1q21-q22 by P1 clone selection, fluorescence in situ hybridization (FISH), and computer-assisted microscopy. *Genomics* 1995; **26**: 390-393.
- Weis, C., Wiesenhofer, B. et Humpel, C. Nerve growth factor plays a divergent role in mediating growth of rat C6 glioma cells via binding to the p75 neurotrophin receptor. *J Neurooncol* 2002; **56**: 59-67.
- Wen, C.J., Xue, B., Qin, W.X., Yu, M., Zhang, M.Y., Zhao, D.H., Gao, X., Gu, J.R. et Li, C.J. hNRAGE, a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation. *FEBS Lett* 2004; **564**: 171-176.
- Whitfield, J., Neame, S.J., Paquet, L., Bernard, O. et Ham, J. Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* 2001; **29**: 629-643.
- Wiese, S., Metzger, F., Holtmann, B. et Sendtner, M. The role of p75NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Eur J Neurosci* 1999; **11**: 1668-1676.
- Wiesmann, C. et de Vos, A.M. Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**: 748-759.
- Wiesmann, C., Ultsch, M.H., Bass, S.H. et de Vos, A.M. Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* 1999; **401**: 184-188.
- Wilde, A., Beattie, E.C., Lem, L., Riethof, D.A., Liu, S.H., Mobley, W.C., Soriano, P. et Brodsky, F.M. EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* 1999; **96**: 677-687.
- Wiley, H.S. et Burke, P.M. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* 2001; **2**: 12-18.
- Wiley, H.S., Herbst, J.J., Walsh, B.J., Lauffenburger, D.A., Rosenfeld, M.G. et Gill, G.N. The role of tyrosine kinase activity in endocytosis, compartmentation, and down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1991; **266**: 11083-11094.
- Wilfong, E.R. et Dey, R.D. Nerve growth factor and substance P regulation in nasal sensory neurons after toluene diisocyanate exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; **30**: 793-800.
- Wilson, J.W. et Bamford, T.L. Assessing the evidence for remodelling of the airway in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2001; **14**: 229-247.
- Wilson, J.W. et Li, X. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy* 1997; **27**: 363-371.
- Wolf, D.E., McKinnon-Thompson, C., Daou, M.C., Stephens, R.M., Kaplan, D.R. et Ross, A.H. Mobility of TrkA is regulated by phosphorylation and interactions with the low-affinity NGF receptor. *Biochemistry* 1998; **37**: 3178-3186.

- Wong, S.T., Henley, J.R., Kanning, K.C., Huang, K.H., Bothwell, M. et Poo, M.M. A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* 2002; **5**: 1302-1308.
- Woolf, C.J., Safieh-Garabedian, B., Ma, Q.P., Crilly, P. et Winter, J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience* 1994; **62**: 327-331.
- Wooten, M.W. Function for NF- κ B in neuronal survival: regulation by atypical protein kinase C. *J Neurosci Res* 1999; **58**: 607-611.
- Wooten, M.W., Seibenhener, M.L., Mamidipudi, V., Diaz-Meco, M.T., Barker, P.A. et Moscat, J. The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF- κ B activation by nerve growth factor. *J Biol Chem* 2001; **276**: 7709-7712.
- Wooten, M.W., Seibenhener, M.L., Neidigh, K.B. et Vandenplas, M.L. Mapping of atypical protein kinase C within the nerve growth factor signaling cascade: relationship to differentiation and survival of PC12 cells. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 4494-4504.
- Wooten, M.W., Zhou, G., Seibenhener, M.L. et Coleman, E.S. A role for zeta protein kinase C in nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Cell Growth Differ* 1994; **5**: 395-403.
- Wu, C., Lai, C.F. et Mobley, W.C. Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J Neurosci* 2001; **21**: 5406-5416.
- Wu, Z., Nagata, K. et Iijima, T. Immunohistochemical study of NGF and its receptors in the synovial membrane of the ankle joint of adjuvant-induced arthritic rats. *Histochem Cell Biol* 2000; **114**: 453-459.
- Wu, Z.X. et Dey, R.D. Nerve Growth Factor (NGF)-enhanced Airway Responsiveness Involves Substance P (SP) in Ferret Intrinsic Airway Neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006.
- Xu, Z., Maroney, A.C., Dobrzanski, P., Kukekov, N.V. et Greene, L.A. The MLK family mediates c-Jun N-terminal kinase activation in neuronal apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 4713-4724.
- Xue, B., Wen, C., Shi, Y., Zhao, D. et Li, C. Human NUAGE disrupts E-cadherin/beta-catenin regulated homotypic cell-cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **336**: 247-251.
- Yaar, M., Zhai, S., Pilch, P.F., Doyle, S.M., Eisenhauer, P.B., Fine, R.E. et Gilchrist, B.A. Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2333-2340.
- Yamashita, T., Fujitani, M., Yamagishi, S., Hata, K. et Mimura, F. Multiple signals regulate axon regeneration through the nogo receptor complex. *Mol Neurobiol* 2005; **32**: 105-111.
- Yamashita, T., Higuchi, H. et Tohyama, M. The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol* 2002; **157**: 565-570.
- Yamashita, T. et Tohyama, M. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 2003; **6**: 461-467.
- Yamashita, T., Tucker, K.L. et Barde, Y.A. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 1999; **24**: 585-593.
- Yamauchi, J., Chan, J.R. et Shooter, E.M. Neurotrophins regulate Schwann cell migration by activating divergent signaling pathways dependent on Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 8774-8779.
- Yan, H. et Chao, M.V. Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J Biol Chem* 1991; **266**: 12099-12104.
- Yanai, S., Sugiyama, Y., Iga, T., Fuwa, T. et Hanano, M. Kinetic analysis of the downregulation of epidermal growth factor receptors in rats in vivo. *Am J Physiol* 1990; **258**: C593-598.
- Yano, H., Lee, F.S., Kong, H., Chuang, J., Arevalo, J., Perez, P., Sung, C. et Chao, M.V. Association of Trk neurotrophin receptors with components of the cytoplasmic dynein motor. *J Neurosci* 2001; **21**: RC125.
- Yao, R. et Cooper, G.M. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 1995; **267**: 2003-2006.
- Yardley, G., Relf, B., Lakshmanan, J., Reinshagen, M. et Moore, G.P. Expression of nerve growth factor mRNA and its translation products in the anagen hair follicle. *Exp Dermatol* 2000; **9**: 283-289.
- Yarski, M.A., Bax, B.D., Hogue-Angeletti, R.A. et Bradshaw, R.A. Nerve growth factor alpha subunit: effect of site-directed mutations on catalytic activity and 7S NGF complex formation. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1477**: 253-266.
- Yasui, H., Katoh, H., Yamaguchi, Y., Aoki, J., Fujita, H., Mori, K. et Negishi, M. Differential responses to nerve growth factor and epidermal growth factor in neurite outgrowth of PC12 cells are determined by Rac1 activation systems. *J Biol Chem* 2001; **276**: 15298-15305.
- Ye, H., Kuruvilla, R., Zweifel, L.S. et Ginty, D.D. Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron* 2003; **39**: 57-68.
- Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J.J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C.A., Reed, J.C. et Bredesen, D.E. TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* 1999; **274**: 30202-30208.
- Yee, N.S., Hsiao, C.W., Serve, H., Vosseller, K. et Besmer, P. Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J Biol Chem* 1994; **269**: 31991-31998.

- Yi, J.S., Lee, S.K., Sato, T.A. et Koh, J.Y. Co-induction of p75(NTR) and the associated death executor NADE in degenerating hippocampal neurons after kainate-induced seizures in the rat. *Neurosci Lett* 2003; **347**: 126-130.
- Yoon, S.O., Casaccia-Bonnel, P., Carter, B. et Chao, M.V. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 1998; **18**: 3273-3281.
- York, R.D., Molliver, D.C., Grewal, S.S., Stenberg, P.E., McCleskey, E.W. et Stork, P.J. Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 8069-8083.
- York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W. et Stork, P.J. Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 1998; **392**: 622-626.
- Yoshida, H., Imaizumi, T., Tanji, K., Sakaki, H., Metoki, N., Hatakeyama, M., Yamashita, K., Ishikawa, A., Taima, K., Sato, Y., Kimura, H. et Satoh, K. Platelet-activating factor enhances the expression of nerve growth factor in normal human astrocytes under hypoxia. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; **133**: 95-101.
- You, L., Kruse, F.E. et Volcker, H.E. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 692-702.
- Yu, G. et Fahnstock, M. Differential expression of nerve growth factor transcripts in glia and neurons and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; **105**: 115-125.
- Zabel, B.U., Eddy, R.L., Lalley, P.A., Scott, J., Bell, G.I. et Shows, T.B. Chromosomal locations of the human and mouse genes for precursors of epidermal growth factor and the beta subunit of nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**: 469-473.
- Zapata, J.M., Pawlowski, K., Haas, E., Ware, C.F., Godzik, A. et Reed, J.C. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J Biol Chem* 2001; **276**: 24242-24252.
- Zapf-Colby, A. et Olefsky, J.M. Nerve growth factor processing and trafficking events following TrkA-mediated endocytosis. *Endocrinology* 1998; **139**: 3232-3240.
- Zhang, Y., Moheban, D.B., Conway, B.R., Bhattacharyya, A. et Segal, R.A. Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci* 2000; **20**: 5671-5678.
- Zheng, M. et Heinrich, G. Structural and functional analysis of the promoter region of the nerve growth factor gene. *Brain Res* 1988; **427**: 133-140.
- Zupan, A.A., Osborne, P.A., Smith, C.E., Siegel, N.R., Leimgruber, R.M. et Johnson, E.M., Jr. Identification, purification, and characterization of truncated forms of the human nerve growth factor receptor. *J Biol Chem* 1989; **264**: 11714-11720.
- Zweifel, L.S., Kuruvilla, R. et Ginty, D.D. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci* 2005; **6**: 615-625.

PUBLICATIONS
&
COMMUNICATIONS

Publications

Publications internationales

- Freund-Michel V., Frossard N. Trafficking of the TrkA receptor after activation by NGF in human airway smooth muscle cells. *Cell Mol Biol* ; soumis.
- Chaabi M., Freund-Michel V., Frossard N., Randriantsoa A., Andriantsitohaina R., Lobstein A. Anti-proliferative effect of Euphorbia stenoclada in human airway smooth muscle cells in culture. *J Ethnopharmacol* 2006 ; Jul 21 [Epub].
- Freund-Michel V., Frossard N. Inflammatory conditions increase expression of protease-activated receptor-2 (PAR-2) by human airway smooth muscle cells in culture. *Fund Clin Pharmacol* 2006 ; 20 : 351-357.
- Freund-Michel V., Bertrand C., and Frossard N. TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle proliferation. *Cell Signal* 2006 ; 18 : 621-627.
- Freund V., Pons F., Joly V., Mathieu E., Martinet N., Frossard N. Upregulation of NGF expression by human airway smooth muscle in inflammatory conditions. *Eur Respir J* 2002 ; 20 : 458-463.
- Pons F., Freund V., Kuissu H., Mathieu E., Olgart C., Frossard N. Nerve growth factor secretion by human lung epithelial A549 cells in pro- and anti-inflammatory conditions. *Eur J Pharmacol* 2001 ; 428 : 365-369.

Revue internationale

- Freund-Michel V., Frossard N. Nerve growth factor and its receptors: structure, function and possible role in allergic diseases and asthma. *Inflammation & Allergy - Drug Targets* ; soumis.
- Frossard N., Freund V., Advenier C. Nerve growth factor and its receptors in asthma and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004 ; 500 : 453-465.
- Freund V., Frossard N. Nerve growth factor (NGF) expression in the airways and potential role in asthma. *Progr Brain Res* 2004 ; 146 : 335-346.
- Duvernelle C., Freund V., Frossard N. Transforming growth factor-beta and its role in asthma. *Pulm Pharm Ther* 2003 ; 16 : 181-196.

Publications nationales

- Freund-Michel V., Frossard N. Le facteur de croissance des nerfs (NGF) : nouveau rôle d'un médiateur du système nerveux dans le système bronchique. *Pathol Biol* 2006 ; 54 : 122-124. (Editorial)
- Freund V., Frossard N. Le facteur de croissance des nerfs (NGF) dans l'inflammation et l'asthme. *Rev Mal Respir* 2004 ; 21 : 328-342. (Revue)
- Freund V., Lieutier-Colas F., Ott M., Verot A., Pauli G., de Blay F. Concentration en allergènes majeurs d'acariens du groupe 1 dans la moquette : comparaison entre des chambres à coucher et des bureaux. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2002 ; 42 : 355-357.
- Freund V., Kassel O., Olgart C., Frossard N. Le Facteur de croissance des nerfs : un nouveau médiateur de l'inflammation ? *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2001 ; 41 : 571-578. (Revue)

Communications

Communications orales

- Freund V., Bertrand C., Zuany C., Frossard N. NGF activation of the TrkA receptor induces airway smooth muscle proliferation. Congrès annuel de l'European Respiratory Society (ERS), Glasgow, 2004. *Eur Respir J* 2004 ; 24 (Suppl 48) :1383. (Poster-discussion)
- Freund V., Bertrand C., Zuany C., Frossard N. NGF induces proliferation of the human airway smooth muscle cells through activation of the TrkA receptor. 8^{ème} congrès annuel de la Société Française de Pharmacologie (SFP), Strasbourg 2004. *Fund Clin Pharmacol* 2004 ; 18 : 217. (Présentation orale)
- Freund V., Diop L., Bertrand C., Frossard N. Neurotrophins involved in the NGF-induced proliferation of airway smooth muscle cells. Conférence internationale de l'American Thoracic Society (ATS), Seattle 2003. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 ; 167 : A30. (Poster-discussion)
- Freund V., Frossard N. Effet prolifératif du facteur de croissance des nerfs (NGF) sur les cellules musculaires lisses bronchiques humaines en culture. Lungstorming 2003, St Jean Cap Ferrat. (Présentation orale)
- Freund V., Frossard N. Induction of proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) expression by IL-1 β and tryptase in human airway smooth muscle cells in culture. Congrès annuel de l'European Respiratory Society (ERS), Stockholm, 2002. *Eur Respir J* 2002 ; 20 (Suppl 38) : 170S, 1105. (Présentation orale)

- Frossard N., Olgart C., Naline E., Freund V., Pons F., Joly V., Emonds-Alt X., Advenier C. Increased production of NGF by IL-1 β and bronchial hyperresponsiveness. 3^{ème} meeting de la Fédération des Sociétés Européennes de Pharmacologie (EPHAR), Lyon 2001. *Fund Clin Pharmacol* 2001 ; 15 : 60. (Présentation orale)

Posters

- Freund-Michel V., Frossard N. Internalisation, dégradation et resynthèse du récepteur TrkA dans les cellules musculaires lisses bronchiques humaines après activation par le NGF. 2^{èmes} journées de Recherche Respiratoire, Tours 2006.
- Freund-Michel V., Frossard N. Internalisation, degradation and resynthesis of the TrkA receptor in human airway smooth muscle cells in culture after activation by NGF. NGF2006, Lyon 2006.
- Freund-Michel V., Frossard N. Trafficking of the TrkA receptor in human airway smooth muscle cells in culture. Conférence internationale de l'American Thoracic Society (ATS), San Diego 2006. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2006 ; 3 : A709.
- Freund-Michel V., Bertrand C., Frossard N. Voies de signalisation du récepteur TrkA du NGF impliquées dans la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques humaines. 1^{ères} journées de Recherche Respiratoire, Reims 2005. *Rev Mal Respir* 2005 ; 22 : 883.
- Freund-Michel V., Bertrand C., Frossard N. TrkA signalling pathways in airway smooth muscle proliferation. Annual Congress of the European Respiratory Society, Copenhagen 2005. *European Respiratory Journal* 2005 ; 26 (Suppl 49) : 579s.
- Freund V., Lieutier-Colas F., Babic A., Verot A., Pauli G., de Blay F. Conséquences de la granulométrie d'une poussière standardisée dans l'évaluation des capacités de rétention de l'allergène majeur de chat (Fel d 1) par un aspirateur. 6^{ème} congrès de la Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF), Nice-Acropolis 2002. *Rev Mal Respir* 2002 ; 19 : 1S100, 137.
- Freund V., Lieutier-Colas F., Ott M., Verot A., Pauli G., de Blay F. Concentration en allergènes majeurs d'acariens du groupe 1 dans les moquettes : comparaison entre les chambres à coucher et les bureaux. 6^{ème} congrès de la Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF), Nice-Acropolis 2002. *Rev Mal Respir* 2002 ; 19 : 1S99, 135.
- Freund V., Pons F., Joly V., Mathieu E., Martinet N., Frossard N. Nerve Growth factor expression by human airway smooth muscle cells in culture. Effect of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β . 3^{ème} meeting de la Fédération des Sociétés Européennes de Pharmacologie (EPHAR), Lyon 2001. *Fund Clin Pharmacol* 2001 ; 15 : 119.

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1

Le facteur de croissance des nerfs : un nouveau médiateur de l'inflammation ?

Véronique Freund, Olivier Kassel, Caroline Olgart et Nelly Frossard

Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique 2001 ; 41 : 571-578

Annexe 2

Expression of nerve growth factor in the airways and its possible role in asthma

Véronique Freund and Nelly Frossard

Progress in Brain Research 2004 ; 146 : 335-346

Annexe 3

Le facteur de croissance des nerfs (NGF) dans l'inflammation et l'asthme

Véronique Freund et Nelly Frossard

Revue des Maladies Respiratoires 2004 ; 21 : 328-342

Annexe 4

Nerve growth factor and its receptors in asthma

Nelly Frossard, Véronique Freund et Charles Advenier

European Journal of Pharmacology 2004 ; 500 : 453-465

Annexe 5

Le facteur de croissance des nerfs (NGF) : nouveau rôle d'un médiateur du système nerveux dans le système bronchique

Véronique Freund-Michel et Nelly Frossard

Pathologie Biologie 2006 ; 54 : 122-124 (Editorial)

ANNEXE 1

« Le facteur de croissance des nerfs : un nouveau médiateur de l'inflammation ? »

Véronique Freund, Olivier Kassel, Caroline Olgart et Nelly Frossard

Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique 2001 ; 41 : 571-578

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Le facteur de croissance des nerfs : un nouveau médiateur de l'inflammation ?

V. Freund, O. Kassel, C. Olgart and N. Frossard

Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, 2001, Vol.41, Pages 571-578

Pages 571 à 578 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
[http://dx.doi.org/10.1016/S0335-7457\(01\)00072-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0335-7457(01)00072-7)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

ANNEXE 2

« Expression of nerve growth factor in the airways and its possible role in asthma »

Véronique Freund et Nelly Frossard

Progress in Brain Research 2004 ; 146 : 335-346

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Expression of nerve growth factor in the airways and its possible role in asthma

Véronique Freund et Nelly Frossard

Progress in Brain Research, 2004, Vol.146, Pages 335-346

Pages 335 à 346 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

ANNEXE 3

« Le facteur de croissance des nerfs (NGF) dans l'inflammation et l'asthme »

Véronique Freund et Nelly Frossard

Revue des Maladies Respiratoires 2004 ; 21 : 328-342

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Le facteur de croissance des nerfs (NGF) dans l'inflammation et l'asthme »

Véronique Freund et Nelly Frossard

Revue des Maladies Respiratoires, 2004, Vol.21, Pages 328-342

Pages 328 à 342 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://www.masson.fr/masson/portal/editorialproduct/ARTICLE.pdf?CodeRevue=RMR&ProductCode=715&PathXML=REVUE/RMR/2004/21/2/ARTICLE111953645212.xml&path=REVUE/RMR/2004/21/2/328/index.pdf>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

ANNEXE 4

« Nerve growth factor and its receptors in asthma »

Nelly Frossard, Véronique Freund et Charles Adevénier

European Journal of Pharmacology 2004 ; 500 : 453-465

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Nerve growth factor and its receptors in asthma

Nelly Frossard, **Véronique Freund** et Charles Adevenier

European Journal of Pharmacology 2004, Vol. 500, Pages 453-465

Pages 453-465 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.044>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

ANNEXE 5

« Le facteur de croissance des nerfs (NGF) : nouveau rôle d'un médiateur du système nerveux dans le système bronchique »

Véronique Freund-Michel et Nelly Frossard

Pathologie Biologie 2006 ; 54 : 122-124 (Editorial)

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Le facteur de croissance des nerfs (NGF) : nouveau rôle d'un médiateur du système nerveux dans le système bronchique »

Véronique Freund-Michel et Nelly Frossard

Pathologie Biologie, 2006, Vol. 54, Pages 122-124 (Editorial)

Pages 122 à 124 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2005.09.003>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

