

## Eph-éphrine : la fin d'une liaison

Un des processus essentiels de l'organogenèse est la mise en place coordonnée et harmonieuse des cellules destinées à former chez l'adulte les organes spécialisés. L'échange d'informations entre deux cellules est essentiel pour leur migration dans un site approprié et l'acquisition ultérieure de leur caractère différencié. Plusieurs molécules ou familles de ligands contrôlent le guidage axonal, dont A. Chédotal nous a régulièrement rendu compte dans *médecine sciences* (*m/s* 1999, n° 12, p. 1441 ; 2000, n° 6-7, p. 751) et la migration des cellules de la crête neurale [1]. Nétrines, sémaphorines (*m/s* 1999, n° 3, p. 418), slits et éphrines ont ainsi été récemment identifiées ainsi que leurs récepteurs, respectivement DCC (*deleted in colorectal cancer*), neuropiline (*m/s* 1998, n° 6-7, p. 811), robo (*m/s* 1999, n° 6-7, p. 882) et Eph. La famille Eph des récepteurs à tyrosine kinase des éphrines (Eph désigne le récepteur et éphrine le ligand selon la nomenclature internationale de 1997), est particulièrement à l'honneur dans la littérature récente. Il existe deux groupes de récepteurs Eph, EphA (8 récepteurs), qui reconnaissent les cinq ligands éphrines-A, liés à la membrane par un lien GPI (*glycosylphosphatidyl inositol*) et EphB (6 récepteurs), qui reconnaissent les trois éphrines-B, transmembranaires [2]. On connaît depuis longtemps le rôle prééminent des interactions Eph-éphrines dans les mouvements attraction-répulsion des axones : les récepteurs Eph sont répartis à la surface de l'axone et surtout sur le cône de croissance, et au cours de l'exploration de son environnement, cet axone va rencontrer les ligands éphrines exprimés sur les cellules avoisinantes. Dans certains cas, c'est l'inverse : le récepteur Eph est exprimé sur la cellule contractée, et l'axone guidé exprime les ligands éphrines. Si le message transmis par

ce contact est un message de répulsion, comment va-t-il être exécuté puisque le ligand n'est pas une molécule soluble ? Quels mécanismes vont mettre fin à cet échange et permet le détachement des cellules ? Deux articles parus dans *Science* au mois d'août dernier nous proposent une solution en faisant intervenir une métalloprotéase activée par le contact initial [3, 4]. L'importance de la succession rapide de phases d'adhérence-détachement entre deux cellules n'est pas spécifique au système nerveux. Le contact entre le lymphocyte et sa cible par l'intermédiaire des intégrines de la famille des intégrines  $\beta 2$  (LFA-1, *leukocyte function-associated*) et de leurs ligands ICAM (*intercellular adhesion molecule*) lors de la réaction immunitaire en est un autre exemple, illustré par les travaux de T. Springer [5]. P. Bongrand, dans un texte récent, a évoqué les forces physiques conduisant à l'arrêt d'une liaison entre l'intégrine et son substrat (*m/s* 2000, n° 8-9, p. 974). Dans l'étude de l'équipe de Flanagan qui nous occupe ici [3], le premier contact fait donc intervenir une liaison Eph/éphrine, multivalente, de forte affinité, et donc peu favorable à un détachement facile. Comment dans ces conditions obtenir une répulsion ? Un possible mécanisme serait d'induire une diminution d'expression des récepteurs Eph en réponse à la fixation du ligand, mais ce n'est pas le cas. On pourrait aussi imaginer une rupture de fragments membranaires portant le ligand, mécanisme décrit dans d'autres circonstances, mais il n'en est rien. En fait, le ligand est clivé de la surface extracellulaire par une protéase, Kuzbanian (Kuz), ce qui entraîne la rupture du lien entre les deux protagonistes. Ce processus de protéolyse contrôlée entraînant le relargage de protéines transmembranaires (*shedding*) vers le milieu extracellulaire est

très connu dans le cas de cytokines (TNF $\alpha$ , kit ligand), de récepteurs de cytokines [6], de molécules d'adhérence (ICAM, VCAM), ou encore du précurseur de la protéine amyloïde (*m/s* 1999, n° 8-9, p. 1043 ; n° 3, p. 414). Un processus en miroir existe, qui libère, vers l'intérieur de la cellule cette fois, des peptides actifs : la partie intramembranaire de Notch par exemple, qui est transportée dans le noyau où elle agit. Kuzbanian, un membre de la famille ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*) [7] (*m/s* 1998, n° 10, p. 1148), appelé aussi ADAM10, est ici responsable du clivage de l'éphrine-A2, comme il l'était de celui d'un ligand de Notch, Delta-1 [8]. Les ADAM contiennent un domaine protéase associé à un domaine désintégrine, et à d'autres domaines dont la fonction est encore inconnue, et les ADAMt ont un domaine thrombospondine supplémentaire. Ce que démontrent Hattori *et al.*, c'est le clivage par Kuz du ligand éphrine-A2 (epHA2), une fois reconnu par son récepteur EphA3, permettant ainsi le détachement des deux protagonistes. Un fragment du ligand reste toutefois accroché au récepteur, et pourrait bloquer transitoirement l'établissement d'un nouveau contact. Le mécanisme a été démontré dans un système artificiel : les cellules d'une lignée de neuroblastome (Neuro A) expriment le ligand éphrine-A2, lié à la membrane par un groupement GPI, que peut donc cliver la phosphatidyl inositol-phospholipase C (PI-PLC). Lorsque les cellules Neuro-A sont incubées en présence de molécules EphA3 couplées au fragment Fc des immunoglobulines, ce qui permet l'agrégation des molécules chimériques par des anticorps anti-Fc, on assiste à une disparition du ligand éphrine-A2 de la surface. La PI-PLC n'est pas responsable de ce clivage car les fragments de éphrine-A2 détectés dans le surna-

geant ont un poids moléculaire plus faible que celui des protéines résultant de l'action de la phospholipase. Ce même processus survient avec beaucoup d'autres lignées mais aussi avec des cellules primaires comme des neurones embryonnaires cultivés *in vitro*. Le contact entre un axone (émanant de neurones de l'hippocampe) et une cellule exprimant une protéine de fusion éphrine-A2-GFP (*green fluorescent protein*) entraîne une dispersion de la fluorescence qui devient aussi détectable sur l'axone, témoignant de l'occupation du récepteur par un fragment du ligand rompu, mais exclusivement au point de contact. L'implication de Kuz dans ce processus a été suspectée par analogie avec le rôle de cette enzyme dans le contrôle du guidage axonal chez la drosophile, et sur la similitude de la distribution, en hybridation *in situ*, des transcrits de Kuz et de éphrine-A2 dans le cerveau. En effet, le complexe Kuz-éphrine-A2 pré-existe dans la cellule, et l'utilisation d'une forme dominante négative de Kuz bloque le clivage de éphrine-A2, et le détachement de l'axone, mais ne dissocie pas le complexe éphrine/Kuz qui pré-existe à la liaison au récepteur Eph A3. En tirant parti des techniques permettant d'exprimer à façon des protéines en plaçant les ADNc sous contrôle de promoteurs inducibles, les auteurs ont pu exprimer successivement dans la même cellule la forme sauvage et une forme de éphrine-A2 mutée de telle façon qu'elle résiste à la protéolyse. Il y a dans les deux cas rétraction du cône de croissance, ou *growth cone collapse*, mais la cinétique est différente : le détachement de l'axone intervient en 20 minutes en présence de éphrine-A2 normale, mais prend plus de 75 minutes en présence du ligand muté (*figure 1*). Le mécanisme est spécifique : les activateurs connus du relargage de molécules membranaires, esters de phorbol ou ionophores, clivent éphrine-A2, mais faiblement, et de toute façon indépendamment de la liaison de EphA3, qui ne fait pas intervenir la protéine kinase C.

La nétrine – dont le récepteur est DCC (*deleted in colorectal cancer*) et A2b, un récepteur de l'adénosine – contrôle l'émergence des axones *in*

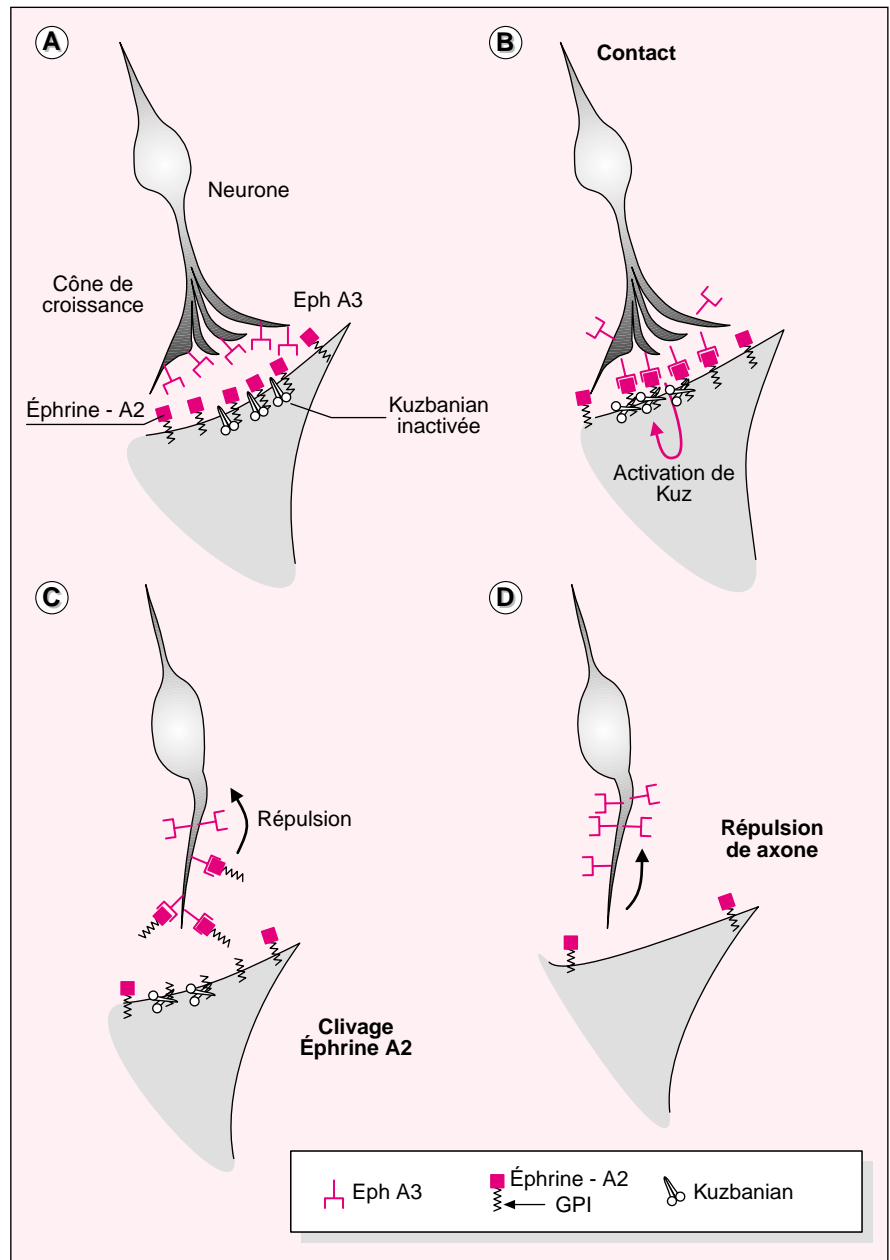


Figure 1. **Schéma résumant les différentes étapes du contrôle de la répulsion par le couple EphA3-éphrine A2.** A. Le cône de croissance à la surface duquel sont réparties de nombreuses molécules EphA3 arrive au contact de cellules exprimant l'éphrine A2, et la liaison ligand-récepteur se fait, induisant un message dans les deux cellules. B. En réponse au signal donné par cette liaison, la protéase Kuzbanian, complexée au ligand éphrine-A2 et symbolisée par une paire de ciseaux est activée et C. clive ce ligand qui reste lié au récepteur. D. Le cône de croissance s'effondre, et l'axone se libère de son contact avec la cellule exprimant éphrine-A2 et s'éloigne dans une autre direction.

*in vitro*, à partir d'explants de moelle épinière et le guidage des neurones commissuraux, comme vient de le

montrer le groupe de P. Mehlen [9] (*m/s 2001, n° 2, p. 238*). Le groupe de M. Tessier-Lavigne a identifié en

1998 une activité potentialisant celle de la nétrine, d'où son nom de NSA (*netrin synergizing activity*) qui n'avait pu être assimilée à une protéine connue. Or, Galko et Tessier-Lavigne [4] démontrent aujourd'hui qu'un inhibiteur chimique des métalloprotéases, IC-3, a une activité de type NSA. L'inhibiteur agit en s'opposant au clivage des molécules de récepteur DCC qui, spontanément, sont clivées de la surface axonale. L'enzyme responsable du clivage de DCC, présente dans les explants de moelle épinière, n'est pas identifiée et l'importance physiologique de ces résultats est encore peu claire. Qu'il s'agisse d'un effet direct sur DCC ou indirect par l'intermédiaire d'un autre protagoniste n'est pas encore déterminé. On peut cependant rapprocher ces données de celles d'une autre étude chez la drosophile, démontrant que UNC-6, l'orthologue de la nétrine chez la drosophile, est sous le contrôle d'une métallopro-

téase, MIG 17, indispensable à la migration correcte des cellules germinales. L'exemple décrit aujourd'hui pour la migration axonale sera certainement vrai demain pour d'autres systèmes cellulaires. On peut comprendre l'importance des processus protéolytiques: ils sont rapides, agissant en quelques minutes, indépendants de la machinerie transcriptionnelle, font intervenir de multiples enzymes, ce qui permet une extrême spécificité vis-à-vis du ligand, tous ces facteurs concourant à l'adaptation rapide du comportement des cellules à l'environnement qu'elles traversent.

1. Holder N, Klein R. Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development* 1999; 126: 2033-44.
2. Duband JL. La longue marche des crêtes neurales. *Med Sci* 2000; 16: 776-83.
3. Hattori M, Osterfield M, Flanagan JG. regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 2000; 289: 1360-4.

4. Galko MJ, Tessier-Lavigne M. Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. *Science* 2000; 289: 1365-7.
5. Springer TA. Adhesion receptors in the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-31.
6. Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 515-41.
7. Schlondorff J, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 1999; 112: 3603-17.
8. Qi H, Rand MD, Wu X, et al. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 1999; 283: 91-4.
9. Corset V, Nguyen-Ba-Charvet KT, Forcet C, Moysse E, Chedotal A, Mehlen P. Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature* 2000; 407: 747-50.

Je remercie A. Chédotal de sa relecture du texte.

**Laure Coulombel**

*Inserm U. 474, Maternité Port-Royal, 123, boulevard de Port-Royal, 75014 Paris, France.*

## ■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Cappucino, moka, et oreille pâle.** Le syndrome de Hermansky-Pudlak, de transmission autosomique récessive, associe des altérations de trois organites cellulaires, mélanosomes, granules denses des plaquettes et lysosomes. Leur atteinte explique l'albinisme oculocutané, la thrombopathie, responsable de syndromes hémorragiques, et l'élévation des enzymes lysosomiales (*m/s 2000, n° 6-7 p. 745*). Cette affection se distingue de la maladie de Chediak-Higashi, qui résulte aussi d'un défaut de transport intracellulaire, et ces pathologies sont en plein démembrement car les mêmes conséquences phénotypiques et fonctionnelles traduisent de multiples atteintes des organites intracellulaires. Dans le cas de l'Hermansky-

Pudlak, les 16 mutants existants de souris qui miment la maladie humaine facilitent l'identification des gènes impliqués. C'est la couleur anormale de leur poil, souvent révélatrice, qui donne ces noms évocateurs aux mutants (*subtle gray, mocha, pale ear...*). Le petit dernier que nous décrit l'équipe du Jackson Laboratory se prénomme *Cappucino* [1]. La particularité de cette mutation est qu'elle n'atteint aucun des 7 gènes précédemment associés aux mutants Hermansky-Pudlak, et que l'anomalie se situe sur le chromosome 5, qui ne contient aucun des autres gènes incriminés dans d'autres mutants. Le gène est localisé mais pas encore cloné. Notamment, le complexe adaptateur AP-3, qui a un rôle actif dans le routage endosome-lysosome,

et qui est atteint dans les mutants *pearl* et *mocha*. n'est pas en cause dans le mutant *Cappucino*, ce que confirme l'internalisation normale des protéines lysosomiales de surface, CD63 et LAMP-1 (nous avons récemment rapporté le phénotype des souris *LAMP-1<sup>-/-</sup>, m/s 2001, n° 1 p. 94*). Les taux d'enzymes lysosomiales ( $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ - et  $\beta$ -galactosidase) sont élevées dans le rein, ce qui est habituel, mais aussi dans le foie, ce qui est unique à ce mutant. La palette de la peinture sera-t-elle assez riche de nuances de gris et de marron pour pouvoir nommer tous les mutants de pigmentation témoins de maladies lysosomiales ?

[1. Gwynn B, et al. *Blood* 2000; 96: 4227-35.]