

La notion de dépendance receptor, Dr Jekyll and M. Hyde

Patrick Mehlen, Christelle Bonod-Bidaud, Marie-Claire Bordeaux,
Christelle Forcet, Fabien Llambi

Une nouvelle famille de récepteurs cellulaires a récemment été identifiée : les dependence receptors. Ces protéines, qui ne possèdent pas nécessairement d'homologie de structure, ont toutes en commun la caractéristique de transduire deux signalisations totalement différentes : en présence de leur ligand dans le système nerveux et dans certaines tumeurs, ces récepteurs transduisent un signal classique de prolifération, de différenciation ou de migration ; à l'inverse, en l'absence de ligand, ils ne sont pas inactifs mais provoquent la mise en route d'un programme de mort cellulaire. Les cellules synthétisant ces

protéines se trouvent donc dans un état de dépendance vis-à-vis du ligand. La signalisation permettant à ces récepteurs d'induire l'apoptose reste encore largement inconnue même si elle semble passer par leur clivage protéolytique et par leur interaction avec les caspases, les protéases centrales de l'apoptose. La recherche des mécanismes moléculaires permettant cette double signalisation est alors d'autant plus importante que ces récepteurs sont à la fois impliqués dans le développement du système nerveux et dans la tumorigénèse.

Il est classique de considérer un récepteur cellulaire comme un interrupteur capable – uniquement après la liaison de son ligand – d'être activé et donc de stimuler une voie de signalisation. Pourtant, certains récepteurs impliqués dans des syndromes cancéreux jouent également un rôle important dans la mise en place du système nerveux. Il apparaît alors souvent difficile d'expliquer ces effets biologiques très différents par une simple activation ou inactivation du récepteur. C'est ainsi qu'est née la notion de *dependence receptor** [1]. Ces récepteurs, comme P75^{ntr}, le récepteur de faible affinité du NGF (*nerve growth factor*) [2], le récepteur des androgènes (AR) [3], DCC (*deleted in colorectal cancer*) [4], RET [5] et les récepteurs UNC5H [6] sont classiquement connus pour activer, après la liaison de leur ligand, des voies de signalisa-

tion impliquées dans la prolifération, la différenciation ou la migration cellulaire. On sait maintenant qu'ils sont également actifs en l'absence de leur ligand mais, dans ce cas, leur effet est totalement différent puisqu'ils transduisent alors un signal de mort cellulaire. Les cellules exprimant ces récepteurs se trouvent donc dans un état de dépendance vis-à-vis du ligand, puisque la perte de l'interaction récepteur-ligand conduit à la mort cellulaire par apoptose.

Les dependence receptors : des récepteurs à deux facettes

La notion de *dependence receptor* a été introduite pour la première fois en 1993 à la suite d'une étude effectuée dans le groupe de D.E Bredesen (San Diego, CA, États-Unis), dont l'une

des thématiques était alors l'étude du récepteur p75^{ntr}. P75^{ntr} est un récepteur des neurotrophines, un groupe de polypeptides tels que le NGF, de structure et de fonction voisines, qui règlent la survie neuronale et la différenciation [7] (*m/s 1997, n° 8-9, p. 978*). Paradoxalement, ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs Fas (Apo1) et TNFR I et II (*tumor necrosis factor receptor*), des récepteurs dits « de mort » car impliqués dans le déclenchement de l'apoptose en réponse à la fixation de leur ligand respectif. C'est ce paradoxe apparent qui a conduit l'équipe de Dale Bredesen à montrer que la présence du récepteur p75^{ntr} induit *in vitro* la mort des cellules dans lesquelles il est exprimé – en l'absence de NGF – par un mécanisme d'apoptose [2]. Au contraire, la présence de NGF est suffisante pour bloquer cette activité pro-apoptotique [2]. Ainsi,

l'expression de p75^{ntr} dans une cellule conduirait celle-ci à survivre uniquement dans un environnement où le ligand est présent. Pourtant, même si ces résultats furent confirmés par d'autres groupes [8, 9], le système de dépendance de p75^{ntr} a été critiqué car il s'est compliqué très rapidement à cause : (1) de la co-existence de multiples récepteurs du NGF au sein d'une même cellule [10]; et (2) de la mise en évidence que, dans certaines cellules, l'expression de p75^{ntr} ne conduit à la mort qu'en présence de ligand NGF [11]. Ainsi, suivant le type cellulaire, le type de récepteur du NGF exprimé, P75^{ntr}, pourrait agir soit comme un classique récepteur de mort, comme cela est démontré par le groupe de Y. Barde, en particulier dans les neurones de la rétine [12], soit comme un récepteur à dépendance.

Néanmoins, par la suite, l'observation d'autres récepteurs – tels que le récepteur des androgènes, DCC, RET et UNC5H – présentant eux aussi cette caractéristique de dépendance au ligand est venue conforter la notion de *dependence receptor* [1, 8]. A la différence des autres *dependence receptors* connus, le récepteur des androgènes n'est pas membranaire mais intracellulaire. De plus, son ligand est non peptidique puisqu'il s'agit d'hormones stéroïdes. Ce récepteur est en fait un facteur de transcription dont l'activité est contrôlée par son ligand [13]. La fixation de ce ligand (testostérone par exemple) entraîne ainsi directement l'activation de la transcription de gènes spécifiques. Il assure de ce fait de multiples fonctions sur le développement, le maintien et le contrôle du phénotype mâle ainsi que sur la physiologie de la reproduction chez l'adulte [13]. Des mutations du récepteur des androgènes sont à l'origine de différentes maladies, notamment certains cancers de la prostate. Par ailleurs, le récepteur des androgènes est impliqué dans une maladie dégénérative des neurones moteurs, la maladie de Kennedy ou SBMA (*spinal and bulbar muscular atrophy*) liée au chromosome X [14]. C'est une augmentation du nombre de triplets CAG (cytosine- adénosine-guanosine), codant pour

une série de glutamines dans le gène du récepteur des androgènes, qui semble responsable de cette dégénérescence [14]. Récemment, il a été montré que cette dégénérescence est associée à une activité pro-apoptotique de ce récepteur muté [3]. Plus la répétition est longue, plus le récepteur apparaît pro-apoptotique. Ellerby *et al.* ont récemment mis en évidence que l'activité pro-apoptotique de ce récepteur est abolie en présence d'hormone, faisant du récepteur des androgènes le second récepteur à dépendance découvert [3].

RET (*rearranged during transfection*) est lui le premier récepteur à dépendance à activité tyrosine kinase [5] mis en évidence (*m/s 1996, n° 12, p. 1408 et 1414*). Ainsi, RET est classiquement décrit comme un récepteur capable de se dimériser après la liaison du ligand, ce qui entraîne l'auto-phosphorylation réciproque des domaines kinase intracellulaires et l'interaction avec de nombreuses protéines effectrices telles que la phospholipase C γ , Shc, Enigma, Grb2, Grb7/Grb10, Src kinase ou Ras-GAP [15-17]. En fait, RET fait partie d'un complexe multimoléculaire liant un de ses quatre ligands, le GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), la neurturine, l'artémine ou la perséphine, des facteurs neurotrophiques proches de la famille du TGF- β (*transforming growth factor β*) [17]. Dans tous les cas, l'activation de RET par son ligand nécessite la présence d'un des 4 co-récepteurs (GFR α 1-4) qui sont des molécules ancrées à la face externe de la membrane par leur association au glycosylphosphatidylinositol [15]. Le rôle biologique de RET est encore peu connu même s'il est maintenant admis que l'activation du couple RET/GFR α 1 par le GDNF joue un rôle crucial dans le développement du système nerveux entérique et du rein, comme l'ont montré les phénotypes très proches des souris dont les gènes *RET*, *GFR α 1* et *GDNF* ont été invalidés [15, 17]. Des mutations du gène *RET* ont été associées à deux maladies bien distinctes reflétant deux fonctions différentes de ce récepteur : (1) un syndrome tumoral de transmission autosomique domi-

nante nommé MEN2A ou MEN2B (*multiple endocrine neoplasia*) qui semble dû à des mutations de RET responsables d'une activité kinase constitutive du récepteur [18]; (2) la maladie de Hirschsprung, dont l'incidence est de 1 naissance sur 5 000. Cette malformation congénitale de l'intestin [19] est due à la disparition de cellules dérivées de la crête neurale qui permettent normalement le développement du système nerveux entérique. Les mutations associées à la maladie de Hirschsprung sont multiples et ne sont pas toutes nécessairement responsables d'une perte de la fonction kinase du récepteur [16, 18]. C'est cette implication de RET, à la fois dans la tumorigénèse et le développement du système nerveux entérique, qui a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle ce récepteur pourrait fonctionner comme un *dependence receptor* [5]. Ainsi, il a été montré que l'expression de RET dans des cellules normalement dépourvues de ce récepteur provoque, en l'absence de ligand, la mort des cellules par apoptose. Cet effet est potentialisé par l'expression conjointe du co-récepteur GFR α 1. En revanche, l'ajout du ligand, le GDNF, inhibe la mort cellulaire provoquée par l'expression de RET [5]. Enfin, DCC et les protéines UNC5H sont des récepteurs impliqués dans le guidage et la migration neuronale. DCC (*deleted in colorectal cancer*) code pour un récepteur transmembranaire de type I de la superfamille des immunoglobulines [20]. Il présente, dans son domaine extracellulaire, une forte homologie de séquence avec les protéines de la famille NCAM (*neural cell adhesion molecule*). Ce récepteur montre lui aussi plusieurs facettes. Il présente tout d'abord les caractéristiques d'un suppresseur de tumeurs [21] : le locus qu'il occupe sur le chromosome 18q est délété dans plus de 50 % des tumeurs colorectales et dans de nombreux autres cancers [21]. Pourtant, même si différentes études ont montré que la « ré-expression » de DCC dans des cellules tumorales conduit à une perte de la tumorigénicité *in vivo*, le rôle de DCC en tant que suppresseur de tumeur reste sujet à controverse [22, 23]. En effet, l'inactivation du

gène *DCC* ne conduit pas à une augmentation des tumeurs (même si l'étude a été réalisée chez des souris hétérozygotes) [23] et, par ailleurs, d'autres gènes situés dans la région de délétion comme *smad4* pourraient apparaître comme les véritables gènes suppresseurs [24]. *DCC* est par ailleurs impliqué dans une toute autre fonction : le guidage axonal. En effet, *DCC* est un récepteur de la nétrine-1 [25] (*m/s* 1995, n° 3, p. 336). Les nétrines (nétrine 1, 2, 3 et β -nétrine) constituent une famille de protéines apparentées à la laminine [26]. Elles jouent un rôle crucial dans le développement du système nerveux en exerçant un effet chimioattractif ou chimiorépulsif sur le guidage des axones en croissance et sur la migration des neurones [26]. Cette dualité de fonction – attraction-répulsion – résulte probablement du fait que les nétrines sont les ligands de deux familles de récepteurs : *DCC* et *UNC5*. Les protéines de la famille *DCC*, comportant *DCC* et la néogénine chez les vertébrés, *UNC 40* chez le nématode *C. elegans* et *Frazzled* chez la drosophile, semblent relayer les effets attractifs de la nétrine-1 [27]. La famille *UNC5* comporte *UNC-5* chez *C. elegans* et ses trois homologues chez les vertébrés, *UNC5H1*, *UNC5H2* et *UNC5H3*. Chez *C. elegans*, *UNC-5* semble relayer l'action répulsive de *UNC-6* (l'homologue de la nétrine-1 chez *C. elegans*) alors que, chez les mammifères, la répulsion semble liée à la co-expression et à l'interaction des récepteurs *UNC5H* (définissant l'ensemble des trois récepteurs *UNC5H1*, *UNC5H2* et *UNC5H3*) et de *DCC* [28]. Ces deux types de récepteurs jouent donc un rôle fondamental dans le développement et la mise en place du système nerveux [27]. Or, *DCC* et les récepteurs *UNC5H* sont tous des *dependence receptors* [4, 6]. En effet, exprimés en l'absence de nétrine-1, ces récepteurs induisent la mort des cellules alors que la présence de nétrine-1 suffit pour bloquer cette activité pro-apoptotique. La nétrine-1 apparaît donc non seulement comme une molécule de guidage mais aussi comme un facteur de survie *via* ses récepteurs *DCC* et *UNC5H*.

Les dépendance receptors comme amplificateurs de l'activité des caspases

Tous ces récepteurs, s'ils possèdent des structures radicalement différentes, partagent des mécanismes généraux de fonctionnement et certaines propriétés clés qui les définissent. La première similitude est l'importance des caspases pour la mise en route de leur activité pro-apoptotique. Les caspases, protéines centrales de l'apoptose, sont des protéases à cystéine qui s'activent en cascade dans les phases de déclenchement de l'apoptose et qui clivent leurs substrats (c'est-à-dire, soit d'autres caspases, soit des protéines clés pour la mise en route de l'apoptose) après des séquences consensus se terminant par un acide aspartique [29]. Or, la plupart des *dependence receptors* sont des substrats pour les caspases (seul le clivage de *p75^{nr}* n'a pas encore été démontré de façon certaine) [3-6]. La figure 1 montre la position des sites de clivage des différents récepteurs. Ce clivage est essentiel pour l'activité pro-apoptotique de ces récepteurs car la mutation des sites de clivage suffit à abolir complètement leur capacité d'induire la mort cellulaire. Ainsi, l'étape préliminaire pour l'activation de ces récepteurs pro-apoptotiques est leur clivage par les caspases.

Le second point commun est le fait que tous ces récepteurs possèdent une région dans leur domaine intracellulaire qui est essentielle pour l'induction de l'apoptose. Cette région est responsable de l'état de dépendance cellulaire vis-à-vis du ligand. C'est pourquoi, elle a été appelée *ADD* pour *addiction/dependence domain* [8].

Le premier et le plus étudié des *ADD* est celui de *p75^{nr}* [8, 30]. Chez *p75^{nr}*, cette région est nécessaire et suffisante pour induire la mort cellulaire. Elle est de plus incluse un sein d'une région nommée *death domain* (*DD*), située à l'extrémité carboxyterminale du domaine intracellulaire de la protéine *p75^{nr}*. Le *death domain*, qui existe au sein de diverses protéines comme les récepteurs *Fas* et *TNFR* [32], est classiquement le

médiateur d'un signal pro-apoptotique à travers des interactions avec des protéines effectrices possédant souvent elles-mêmes un *death domain*. Cela suggère qu'à l'image de *Fas* et de *TNFR*, les *dependence receptors* en général, et *p75^{nr}* en particulier, pourraient induire un signal de mort cellulaire à travers l'action de toute une cascade de protéines adaptatrices et effectrices. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le petit domaine intracytoplasmique de *p75^{nr}* ne possède aucune activité catalytique connue. La structure tridimensionnelle en RMN (résonance magnétique nucléaire) du *death domain* de *p75^{nr}* révèle qu'il se compose de deux séries perpendiculaires de 3 hélices α rassemblées en une structure globulaire [31]. Au sein de ce domaine, un peptide de 14 acides aminés (résidus 368 à 381) correspondant à la cinquième hélice de *p75^{nr}* est nécessaire et suffisant pour induire la mort et est donc considéré comme l'*ADD* de cette protéine [30]. De plus, une mutation ponctuelle (*L373K*) suffit à bloquer la formation de l'hélice et à abolir sa capacité d'induire la mort cellulaire [33], suggérant que c'est une structure clé pour l'induction de l'apoptose.

Le récepteur des androgènes possède, comme *p75^{nr}*, une région *ADD* qui est essentielle pour son action lors de l'induction de l'apoptose. Cette région est comprise dans le court fragment relargué lors du clivage par les caspases [3]. Elle contient une répétition de plusieurs glutamines. Ce fragment clivé est capable d'induire l'apoptose s'il est exprimé seul, et son activité pro-apoptotique varie en fonction du nombre des glutamines [3]. Cependant, le fragment résultant du clivage du récepteur des androgènes peut avoir un effet pro-apoptotique même en l'absence de la région polyglutamine, ce qui indique que cette région n'est pas la seule à jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose.

Dans le cas de *RET*, le fragment libéré par clivage (de l'acide aminé 708 à 1017) est aussi capable d'induire la mort cellulaire. Ainsi, le domaine pro-apoptotique de *RET* semble se trouver entre ces deux sites de clivage par les caspases [5].

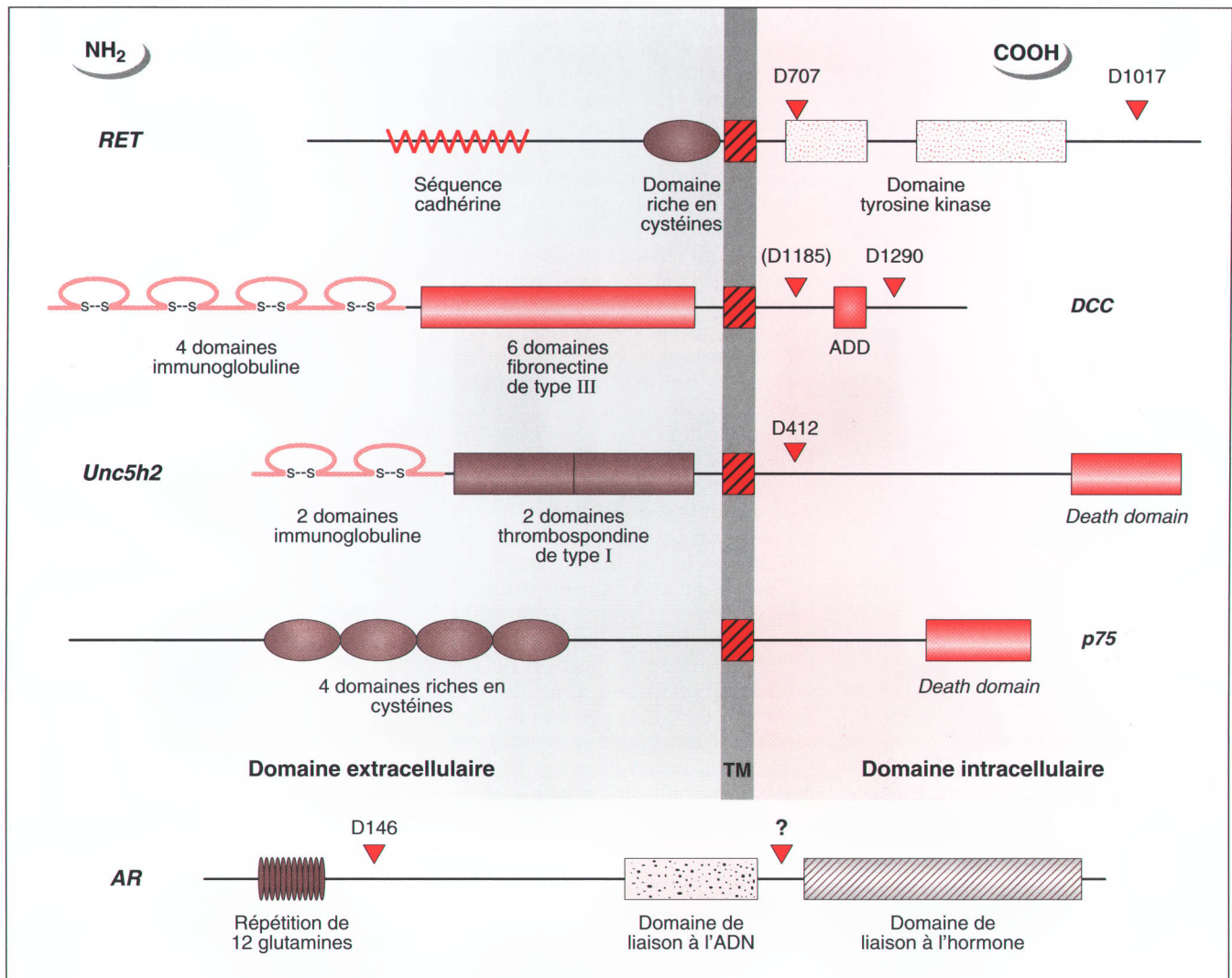


Figure 1. **Structure et sites de clivage des différents dépendance récepteurs.** Le clivage par les caspases est indispensable aux récepteurs à dépendance pour déclencher l'apoptose. En effet, la plupart de ces récepteurs possèdent un ou plusieurs sites de clivages reconnu(s) pour les caspases (indiqués par un triangle rouge sur la figure) et la mutation de ces sites supprime toute activité pro-apoptotique de ces dépendance récepteurs. TM: segment membranaire; ADD: addiction/dépendance domaine.

Cependant, sa structure et sa localisation précise restent inconnues. Le cas des récepteurs UNC5H se rapproche de celui de p75^{nr} puisqu'ils possèdent eux aussi un *death domain*. Ce domaine est compris dans le fragment relargué lors du clivage par les caspases [6]. Il est intéressant de noter que ce fragment clivé, exprimé seul, n'induit pas la mort des cellules à la différence de RET, DCC et AR. Pour être actif, ce fragment doit en effet être couplé artificiellement à une séquence signal de myristylation qui lui permet de rester ancré dans la

membrane plasmique. Afin d'induire l'apoptose, ce fragment clivé doit donc probablement interagir avec un ou plusieurs partenaires qui lui permettent de rester sous la membrane [6]. Pour DCC, l'ADD correspond à une région comprise entre les acides aminés 1243 et 1364 qui contient une pseudo-hélice α [4]. Si ce domaine est délété, DCC perd sa capacité d'induire la mort cellulaire. Cet ADD est encadré du côté carboxy-terminal par le site majeur de clivage par les caspases (D1290) et dans la partie

amino-terminale par le site de clivage de la caspase 7 *in vitro* (D1185). Pourtant, il n'existe aucune preuve que ce dernier site soit reconnu *in vivo*. Il y a donc deux possibilités quant au devenir de l'ADD lors du processus de clivage par les caspases: (1) soit DCC est clivé sur ses deux sites, l'ADD se désolidarise alors du reste de la protéine (processus similaire à celui de RET) et il y a alors relargage d'un fragment pro-apoptotique; (2) soit DCC est clivé seulement au niveau du site majeur et l'ADD reste sur la protéine tronquée. Dans ce second cas,

le clivage conduirait à l'exposition de l'ADD.

Ainsi, tous ces récepteurs présentent des caractéristiques communes: (1) la mort cellulaire induite par les *dependence receptors* nécessite l'activation des caspases; (2) les *dependence receptors* sont des substrats des caspases et la mutation du site de clivage supprime leur activité pro-apoptotique; et (3) le clivage par les caspases libère ou révèle un fragment pro-apoptotique qui est capable d'induire l'apoptose et donc l'activation d'un nombre important de caspases (directement ou indirectement). Il pourrait donc apparaître que ces récepteurs induisent une boucle d'amplification de caspases actives comme cela est schématisé sur la *figure 2*.

Cependant, ce mécanisme peut sembler paradoxal puisqu'on considère généralement que les caspases ne sont pas actives dans les cellules à l'état physiologique. Or, il apparaît que les *dependence receptors* ont besoin d'être clivés pour induire l'apoptose. En conséquence, comment un *dependence receptor* peut-il induire l'apoptose dans une cellule si aucune caspase n'est activée au préalable pour

le cliver? Cette question pose alors le problème clé du rôle des *dependence receptors* puisqu'ils pourraient alors n'apparaître que comme des amplificateurs de signaux pro-apoptotiques déclenchés par d'autres stimulus. Schématiquement, on pourrait imaginer qu'un autre stimulus d'apoptose conduise à l'activation de caspases et que l'absence du ligand de certains *dependence receptors* ne permette que d'amplifier l'effet d'activation des caspases et donc l'effet du premier stimulus. Pourtant, plusieurs arguments militent, au contraire, en faveur du rôle des *dependence receptors* comme déclencheurs de l'apoptose.

1. Certaines caspases peuvent être faiblement actives sous leur forme zymogène (c'est-à-dire non clivée); on parle du concept de zymogénicité [34]. C'est le cas par exemple de la pro-caspase-9 qui présente une activité seulement 10 fois inférieure à celle de sa forme clivée. En comparaison, le même rapport est de 1 000 pour la pro-caspase-3. Il est donc possible que certaines pro-caspases puissent cliver les *dependence receptors* dans des cellules non apoptotiques.

2. Une concentration locale de caspases inactives peut, dans certaines

conditions, conduire à l'autoactivation de celles-ci [35]. C'est, le cas, semble-t-il, pour la caspase-8 qui est activée par dimérisation lors du recrutement par le complexe formé autour des récepteurs de mort.

3. Il apparaît de plus en plus qu'une petite proportion de caspases est activée constitutivement. La preuve biologique de ce phénomène est apportée par l'existence même des protéines inhibitrices des caspases (IAP) dont le rôle dans la cellule est de bloquer constitutivement l'effet létal de l'activation spontanée des caspases [36]. Ces caspases activées, incapables de déclencher à elles seules un processus d'apoptose, pourraient déclencher la boucle d'amplification des caspases par l'intermédiaire des *dependence receptors*.

Les *dependence receptors* comme inducteurs de l'activation des caspases

S'il est clair que les *dependence receptors* ont besoin d'être clivés pour induire l'apoptose, les événements moléculaires consécutifs à ce clivage et qui permettent le déclenchement de l'apoptose sont encore peu connus. Récemment, il a pu être observé que la signalisation « pro-apoptotique » empruntée par DCC est indépendante des deux voies classiques d'apoptose décrites jusqu'ici [37]. Schématiquement, il est généralement admis que l'apoptose dépend du déclenchement de deux voies reposant sur l'activation de caspases déclenchantes (caspase-8 ou -9) qui, une fois stimulées, activeront en aval des caspases effectrices comme la caspase-3 qui vont alors cliver des cibles cellulaires [38]. La première voie est celle des récepteurs de mort, qui permet le recrutement de la caspase-8, puis son activation autour d'un complexe nommé DISC (*death-inducing signaling complex*). La seconde est la voie dite mitochondriale, dans laquelle des stimulus variés conduisent au relargage du cytochrome c de la mitochondrie, phénomène déclenchant la formation d'un complexe – l'apoptosome – qui permet le recrutement et l'activation de la caspase-9.

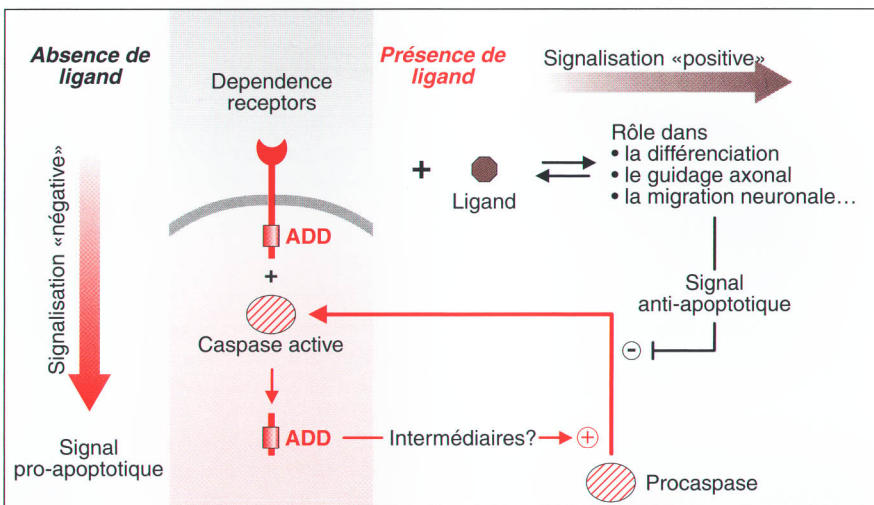


Figure 2. **Modèle mécanistique des dependence receptors.** Les dependence receptors induisent deux signalisations. En présence de leur ligand, ils transduisent un signal « positif » responsable de leur rôle dans la différenciation, le guidage axonal ou la migration neuronale. En l'absence de ce ligand, ils sont clivés par des caspases actives, ce qui libère ou expose un domaine pro-apoptotique: l'ADD (addiction/dependence domain). Ils déclencheraient ainsi une boucle d'amplification des caspases qui conduirait au démarrage du processus apoptotique.

Pourtant, DCC n'emprunte ni la voie des récepteurs de mort, ni la voie mitochondriale. En effet, la mort induite par DCC est toujours détectée en présence d'inhibiteurs de la caspase-8 (dominant négatif de la caspase-8, crmA), ou dans des contextes dans lesquels la voie mitochondriale est bloquée (surexpression de Bcl-2, inactivation de Apaf-1) [37]. Cependant, la mort induite par DCC requiert la présence de la caspase-9 puisque DCC n'induit plus la mort cellulaire dans des cellules inactivées pour la caspase-9. De plus, une recherche de partenaires par les techniques de double hybride et/ou de co-immunoprécipitation a permis de montrer que DCC interagit avec les caspases-3 et -9 [37]. L'interaction DCC/caspase-3 est seulement observée lorsque DCC est exprimé en présence du ligand ou quand le site de clivage par la caspase-3 (Asp1290) est muté, c'est-à-dire quand DCC est incapable d'induire la mort cellulaire. Au contraire, c'est principalement quand DCC est sous sa forme pro-apoptotique que l'interaction DCC/caspase-9 est détectée. La région pro-apoptotique/ADD (1121/1290) est essentielle pour cette interaction DCC/caspase-9 alors que la caspase-3 interagit avec la région distale du site de clivage. Ainsi, DCC recrute alternativement, en situation pro-apoptotique ou non apoptotique, une caspase initiateur, la caspase-9, ou une caspase exécuteur, la caspase-3. De plus, DCC permet l'activation de la caspase-3 *via* la caspase-9 *in vitro* dans un système «acellulaire». Ainsi, DCC, une fois clivé, pourrait apparaître comme un support nécessaire à la formation d'un complexe recrutant des caspases et permettant l'activation de caspases effectrices comme la caspase-3 [37].

Le modèle proposé, détaillé dans la figure 3, est le suivant : en l'absence de nétrine-1, DCC adopterait une conformation particulière qui conduirait au clivage de DCC. Le clivage entraînerait la «révélation» du fragment pro-apoptotique (ADD), ce qui conduirait au recrutement de la caspase-9, permettant alors le clivage de la caspase-3. Cela pourrait avoir deux effets : l'amplification du clivage de DCC (augmentant le nombre

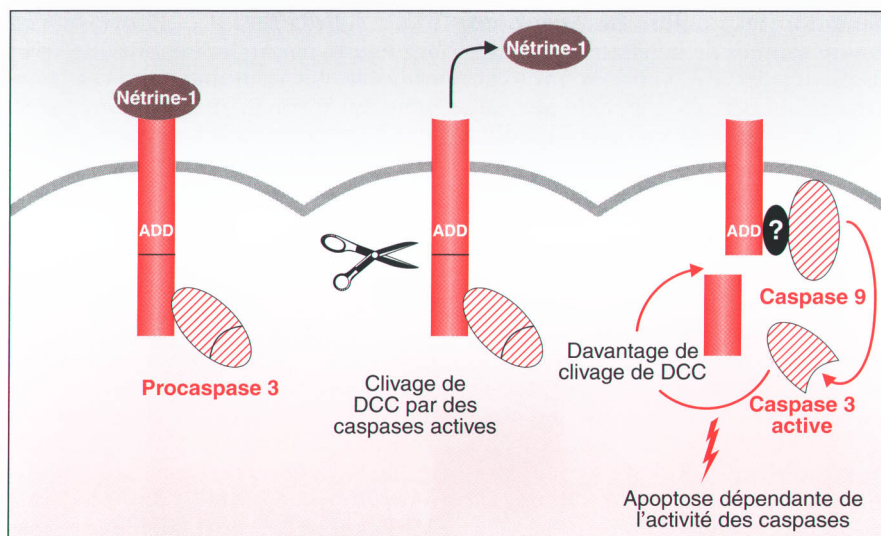


Figure 3. **Mécanisme hypothétique du recrutement d'un complexe d'activation des caspases par DCC.** Le retrait du ligand nétrine-1 conduit au clivage de DCC et à la fixation, sans doute indirecte, de la caspase-9. Cette interaction permettrait alors l'activation de la caspase-3 de manière dépendante de la caspase-9. Cette activation aurait deux conséquences, le clivage de quantités plus importantes de DCC et la mise en route du programme d'apoptose dépendant des caspases.

de récepteurs actifs) et le démarrage d'un processus apoptotique classique dépendant des caspases effectrices. Un tel modèle conduit à faire un parallèle entre le complexe engendré autour des récepteurs de mort, l'apoptosome, et le nouveau complexe mis en évidence autour de DCC. Les deux premiers complexes ont une base (le récepteur de mort et le cytochrome c), une protéine adaptatrice (FADD et APAF-1) et une caspase initiateur qui active une caspase effectrice. Le complexe DCC/caspase possède toutes les caractéristiques d'un tel complexe, excepté l'existence de la protéine adaptatrice qui reste à vérifier.

L'interaction avec des caspases apparaît de plus en plus comme un mécanisme d'action commun des *dependence receptors*. En effet, le récepteur des androgènes est capable d'interagir avec la caspase-7 et induit une mort dépendante de la caspase-7. Des observations similaires ont été faites avec p75^{ntr} et la caspase-8. De plus, des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire suggèrent que RET et UNC5H interagissent avec la caspase-9. Pourtant, la capacité de l'ensemble de ces récepteurs de per-

mettre l'activation d'autres caspases *via* un complexe d'activation centré sur l'ADD, comme cela a été suggéré pour DCC, reste à démontrer.

Signification biologique des *dependence receptors*

Le contrôle de la survie des cellules par les *dependence receptors* dépend étroitement du taux d'expression de chaque récepteur, de la concentration du ligand, de la présence de co-récepteurs et de l'état physiologique de la cellule. Il peut donc y avoir de grandes différences dans l'influence d'un *dependence receptor* sur des cellules en culture et son implication réelle dans un organisme. Récemment, pourtant, l'étude de modèles animaux dont les gènes codant pour certains de ces récepteurs ou leur ligand ont été invalidés est venue conforter la notion de *dependence receptor*.

Par exemple, p75^{ntr} semble avoir un rôle extrêmement important sur le contrôle de la mortalité de certains neurones cholinergiques [39, 40]. En effet, des souris dont le gène p75^{ntr} a été invalidé présentent une forte aug-

mentation du nombre des neurones cholinergiques de la bande diagonale de Broca et du septum médian (structures du télencéphale servant en particulier à la mémoire à court terme) [39]. Cette augmentation pourrait s'expliquer par une diminution de la mortalité cellulaire, confirmant ainsi que $p75^{\text{nt}}r$ est un inducteur de mort cellulaire *in vivo*. Parallèlement, des souris hétérozygotes pour le gène codant pour le NGF (donc partiellement déficientes en NGF) présentent une atrophie et une hyperplasie de ces mêmes neurones [40]. Enfin, des souris issues du croisement des deux lignées précédentes, présentent un phénotype analogue à celui des souris $p75^{\text{nt}}r^{-/-}$ [40], ce qui démontre l'importance du couple NGF/ $p75^{\text{nt}}r$ dans le contrôle de la survie de ces neurones.

Plus encore, il est clair aujourd'hui que les couples UNC5H/nétrine-1 et DCC/nétrine-1 sont importants pour le guidage axonal et la migration neuronale. Une question clé était alors de connaître le rôle de la « dépendance » à la nétrine-1 des neurones exprimant les récepteurs DCC ou UNC5H. Or, chez les embryons de souris dont le gène de la nétrine-1 a été invalidé (l'invalidation est létale du fait de profondes anomalies du système nerveux), il y a non seulement des erreurs de migration, mais aussi une forte augmentation du nombre de cellules en apoptose [6, 41, 42]. Cette augmentation est particulièrement visible dans certaines régions du tronc cérébral (zones ventriculaire et sub-ventriculaire). Or, ces régions correspondent à des précurseurs neuronaux qui expriment soit UNC5H, soit DCC, soit l'ensemble de ces récepteurs. Il y a donc une forte corrélation entre la présence de ces deux récepteurs et la localisation de l'apoptose induite en absence de nétrine-1 [6]. Cependant, on pourrait penser que l'augmentation de la mortalité chez ces souris n'est pas un effet direct de la « dépendance » mais la conséquence d'erreurs de migration. Ainsi, un mauvais adressage des axones ou des neurones dans des régions dépourvues de « vrais facteurs trophiques » conduirait à une augmentation de la

mort cellulaire [42]. Pourtant cet argument paraît limité puisque, par exemple, les neurones olivaires commencent normalement à migrer vers le 12^e jour de développement alors que l'augmentation d'apoptose dans ces cellules est antérieure à cette migration [6]. Cela suggère fortement qu'en l'absence de leur ligand, UNC5H et DCC induisent la mort des cellules qui les expriment. Cet effet *in vivo* pourrait alors être rapproché de l'effet d'induction d'apoptose classique observé lors du retrait de facteurs de croissance ou de cytokines. Pourtant, dans ce dernier cas, la mort est liée à la perte de signalisation anti-apoptotique (voie PI-3kinase/Akt, MAP kinase...) normalement transduite par les récepteurs de ces facteurs lorsque ces derniers sont présents [43]. Or, la signalisation des couples UNC5H/nétrine-1 ou DCC/nétrine-1, bien que non élucidée, ne semble passer ni par la voie des MAP kinases ni par celle impliquant PI-3k. Ainsi, la nétrine-1, *via* ses récepteurs DCC et UNC5H, semble jouer un double rôle de facteur chimiotropique et de « facteur de survie ». Il faut alors envisager que, lors du développement du système nerveux, la nétrine-1 exerce un double contrôle sur le guidage axonal et la migration des cellules exprimant un récepteur dépendant de la nétrine-1 : (1) un contrôle positif classique dans lequel les axones en croissance ou les cellules en migration sont guidées par la nétrine-1 ; mais aussi (2) le blocage d'un effet « négatif » qui permettrait là aussi de spécifier des territoires de migration puisqu'une cellule qui « s'égarerait » hors de la zone d'action de la nétrine-1 serait éliminée par apoptose [6].

Il est alors très curieux d'observer que DCC, UNC5H, $p75^{\text{nt}}r$ et RET ont tous été identifiés comme des acteurs de la migration neuronale. Si l'observation du contrôle de l'apoptose sur le phénomène de guidage *via* DCC et UNC5H est transposable aux autres récepteurs, une hypothèse séduisante serait alors de rapprocher l'activité pro-apoptotique de RET et le défaut de développement des neurones entériques de la maladie de Hirschsprung [5] (*m/s* 1998, n° 3, p. 331). En effet, il est

aujourd'hui classiquement admis que le récepteur RET est impliqué dans le guidage des cellules dérivées de la crête neurale vers leurs localisations entériques [17]. On peut alors envisager que le couple récepteur/ligand soit aussi responsable de la survie des cellules en cours de migration. Ainsi, une cellule de la crête neurale exprimant RET, mais s'égarant dans sa migration, serait détruite grâce à l'action pro-apoptotique de RET en l'absence de son ligand. Dans ce sens, les souris dont le gène *GDNF* a été invalidé ont un phénotype proche de celui observé pour la maladie de Hirschsprung [17]. De plus, nous avons montré que certaines formes mutées de RET associées à la maladie de Hirschsprung (R231H, C609W, S767R, K907E, et P1039L) présentent toutes une activité pro-apoptotique non modulable par la présence de GDNF [5]. Ainsi, les neuroblastes entériques issus de la crête neurale, exprimant la forme mutée du récepteur, seraient conduits au suicide malgré la présence de GDNF. Il est pourtant clair que la démonstration du rôle du couple RET/GDNF dans le maintien de la survie des cellules des crêtes neurales lors de leur migration vers leur localisation entérique reste encore à faire *in vivo*. Si cette hypothèse se révèle exacte *in vivo*, la maladie de Hirschsprung pourrait ainsi être la conséquence de deux effets biologiques totalement différents : (1) la perte de fonction de RET, ce qui est clairement montré pour certaines mutations faux sens ou inactivant complètement un allèle [16, 19], qui conduit à un défaut de migration des neuroblastes entériques ; et (2) le gain d'une fonction « négative » – jamais recherchée *in vivo* – qui aboutirait à l'élimination des neuroblastes entériques par apoptose malgré la présence de GDNF [5].

Conclusions et perspectives

Cette notion de récepteurs rendant les cellules dépendantes de la présence de ligand n'en est qu'à ses balbutiements. En effet, de nombreuses questions restent ouvertes, tant sur la mécanistique

de l'induction de la mort et du blocage de la mort par le ligand, que sur le poids biologique de ces récepteurs. Par exemple, DCC est considéré, pour certains, comme un suppresseur de tumeur même s'il ne semble pas agir de manière classique. Une question importante, et en cours d'analyse, est de savoir si cet effet suppresseur de tumeur ne serait pas lié à l'activité pro-apoptotique de DCC en l'absence de ligand. Le couple DCC/ligand pourrait apparaître alors comme un moyen d'éliminer des cellules qui se développent hors d'un contexte extracellulaire normal, et la délétion de DCC dans une majorité de cancers comme la visualisation des tumeurs ayant « échappé » à ce mécanisme d'élimination. Il est alors assez intéressant d'observer que, pour au moins trois de ces récepteurs, p75^{NTR}, AR et DCC, une baisse du niveau d'expression ou l'accumulation de mutations est associée à des phases tardives du développement tumoral, en particulier dans la prostate [4, 8].

Une seconde question clé concerne la généralisation de la notion de *dependence receptors*: s'agit-il d'un concept applicable à un nombre restreint de récepteurs ayant des propriétés spécifiques dans la migration des neurones et dans la tumorigénèse, ou est-ce un mécanisme plus global touchant un grand nombre de récepteurs ? Une telle question reste pour l'instant sans réponse ■

P. Mehlen
C. Bonod-Bidaud
M.C. Bordeaux
C. Forcet
F. Llambi

Apoptose/Différenciation. Équipe labellisée « La ligue contre le cancer », Centre de génétique moléculaire et cellulaire, Cnrs UMR 5534, Université Lyon1, 43, boulevard du 11-Novembre 1918, 69100 Villeurbanne, France.

RÉFÉRENCES

- Mehlen P, Bredesen DE. Dependence receptors as links between apoptosis, nervous system development and control of tumorigenesis. *Bull Cancer* 2000; 87: 537-41.
- Rabizadeh S, Oh J, Zhong L, et al. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 1993; 261: 345-8.
- Ellerby LM, Hackam AS, Propp SS, et al. Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity. *J Neurochem* 1999; 72: 185-95.
- Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998; 395: 801-4.
- Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, et al. The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschprung disease. *EMBO J* 2000; 19: 4056-63.
- Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J* 2001 (sous presse).
- Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 381-91.
- Bredesen DE, Ye X, Tasinato A, Sperandio S, Assa-Munt N, Rabizadeh S. p75^{NTR} and the concept of cellular dependence: seeing how the other half die. *Cell Death Differ* 1998; 5: 365-71.
- Barrett GL, Bartlett P. The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6501-5.
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75^{NTR}. *EMBO J* 1999; 18: 616-22.
- Frade JM, Barde YA. Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays* 1998; 20: 137-45.
- Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 1996; 383: 166-8.
- Kemppainen JA, Lane MV, Sar M, Wilson EM. Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones. *J Biol Chem* 1992; 267: 968-74.
- Fischbeck KH. Kennedy disease. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 152-8.
- Robertson K, Mason I. The GDNF-RET signalling partnership. *Trends Genet* 1997; 13: 1-3.
- Pelet A, Geneste O, Edery P, et al. Various mechanisms cause RET-mediated signaling defects in Hirschsprung's disease. *J Clin Invest* 1998; 101: 1415-23.
- Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors: implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 103-10.
- Pasini B, Ceccherini I, Romeo G. RET mutation in human disease. *Trends Genet* 1996; 12: 138-44.
- Edery P, Lyonnet S, Mulligan LM, et al. Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 1994; 367: 378-80.
- Cho KR, Fearon ER. DCC: linking tumor suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer? *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 72-8.
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247: 49-56.
- Klingelhutz AJ, Hedrick L, Cho KR, McDougall JK. The DCC gene suppresses the malignant phenotype of transformed human epithelial cells. *Oncogene* 1995; 10: 1581-6.
- Fazeli A, Dickinson SL, Herminston ML, et al. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (DCC) gene. *Nature* 1997; 386: 796-804.
- Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, et al. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 1996; 13: 343-6.
- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, et al. Deleted in colorectal cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 1996; 87: 175-85.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996; 274: 1123-33.
- Chédotal A, Tessier-Lavigne M. Attraction et répulsion sont les deux moteurs du guidage axonal. *Med Sci* 2000; 16: 751-6.
- Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 1999; 97: 927-41.
- Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997; 91: 443-6.

RÉFÉRENCES

30. Rabizadeh S, Ye X, Sperandio S, *et al.* Neurotrophin dependence domain: a domain required for mediation of apoptosis by the p75 neurotrophin receptor. *J Mol Neurosci* 2000; 15: 215-30.
31. Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* 1997; 16: 4999-5005.
32. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-8.
33. Hileman MR, Chapman BS, Rabizadeh S, *et al.* A cytoplasmic peptide of the neurotrophin receptor p75^{NTR}: induction of apoptosis and NMR determined helical. *FEBS Lett* 1997; 415: 145-54.
34. Stennicke HR, Salvesen GS. Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1054-9.
35. Yang X, Chang HY, Baltimore D. Auto-proteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell* 1998; 1: 319-25.
36. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; 388: 300-4.
37. Forcet C, Ye X, Granger L, *et al.* The dependence receptor DCC defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3416-21.
38. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-12.
39. Yeo TT, Chua-Couzens J, Butcher LL, *et al.* Absence of p75^{NTR} causes increased basal forebrain cholinergic neuron size, choline acetyltransferase activity, and target innervation. *J Neurosci* 1997; 17: 7594-605.
40. Sauer H, Nishimura MC, Phillips HS. Deletion of the p75^{NTR} gene attenuates septal cholinergic cell loss in mice heterozygous for a deletion of the *NGF* gene. *Soc Neurosci Abstr* 1996; 22: 513.
41. Bloch-Gallego E, Ezan F, Tessier-Lavigne M, Sotelo C. Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J Neurosci* 1999; 19: 4407-20.
42. Yee KT, Simon HH, Tessier-Lavigne M, O'Leary DDM. Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron* 1999; 24: 607-22.
43. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999; 15: 2905-27.

Summary

The dependence receptor family, Dr. Jekyll and Mr. Hyde

P75^{NTR} (the common neurotrophin receptor), the androgen receptor, RET (REarranged during Transfection), DCC (Deleted in Colorectal Cancer) and UNC5H are members of the growing list of dependence receptors. Such receptors, by inducing apoptosis when expressed in setting where their ligands are unavailable, create a cellular state of dependence for their ligands. Of interest all this receptors are involved in cancer progression, nervous system associated diseases and/or development of the nervous system. As an example, DCC encodes for a potential tumor suppressor but in the same time is a key receptor in mediating axon guidance induced by the cue netrin-1. These receptors show two distinct forms of signal transduction depending on their respective ligand availability: in the presence of their ligands, they transduce a signal for either proliferation, differentiation or neuronal migration; however, they are not inactive in the absence of their ligands, but rather induce an active signal for cell death. This new concept is reviewed here enlightening the molecular mechanisms of these receptors and their potential relevance *in vivo* in the development of the nervous system and in the control of tumorigenesis.

TIRÉS À PART

P. Mehlen.