

## Les récepteurs à activité tyrosine kinase et le développement embryonnaire

Le développement des organismes multicellulaires associe une restriction progressive de la totipotence, caractéristique des cellules embryonnaires, à l'acquisition de fonctions différenciées spécifiques d'un ou de plusieurs lignages cellulaires. Ce processus complexe met en jeu plusieurs stratégies différentes y compris des mécanismes d'activation sélective d'un nombre limité de gènes, et d'émission et de réception de signaux moléculaires émanant ou destinés aux cellules voisines. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) constituent une famille de protéines qui jouent un rôle clé dans la transmission des signaux moléculaires responsables de la détermination cellulaire au cours de l'embryogenèse. Les RTK ont des structures moléculaires semblables (figure 1) : un domaine extracellulaire hydrophile de fixation au ligand, une région transmembranaire hydrophobe unique et un domaine cytoplasmique qui porte une activité catalytique kinase. Les RTK fonctionnent comme des kinases allostériques associées à la membrane cytoplasmique : la fixation du ligand et les changements conformationnels du domaine extracellulaire qui y sont associés induisent une oligomérisation du récepteur qui stabilise les interactions entre les domaines cytoplasmiques adjacents et conduit à l'activation de la fonction kinase par interaction moléculaire [1]. Ainsi, l'oligomérisation permet la transmission d'un changement conformationnel extracellulaire au domaine cytoplasmique. La structure et le fonctionnement des RTK prédisent l'existence de deux types de mutations susceptibles d'affecter l'activité de ces récepteurs : (1) des mutations responsables de l'activation constitutive du domaine catalytique (en l'absence de ligand), conduisant à un gain de fonction phénotypique ; (2) des mutations res-

ponsables de la synthèse d'une protéine incapable de fixer le ligand, de transmettre le signal de sa fixation ou de phosphoryler les protéines intracellulaire, conduisant à une perte de fonction. Les deux types de mutations ont été caractérisés dans cette famille de gènes.

**La dominance négative, une conséquence de la dimérisation des RTK**  
Il a souvent été observé qu'un individu hétérozygote (+/-) qui porte

deux allèles d'un gène codant pour un RTK, l'allèle sauvage et un allèle muté, est plus sévèrement atteint que l'individu +/0, qui ne porte qu'un seul allèle sauvage, à la suite par exemple de la perte de l'autre allèle. Autrement dit, le phénotype associé à la coexpression de la protéine normale et d'une protéine mutée est plus sévère que le phénotype de l'hétérozygote pour la mutation nulle. Ce paradoxe apparent a reçu une explication.

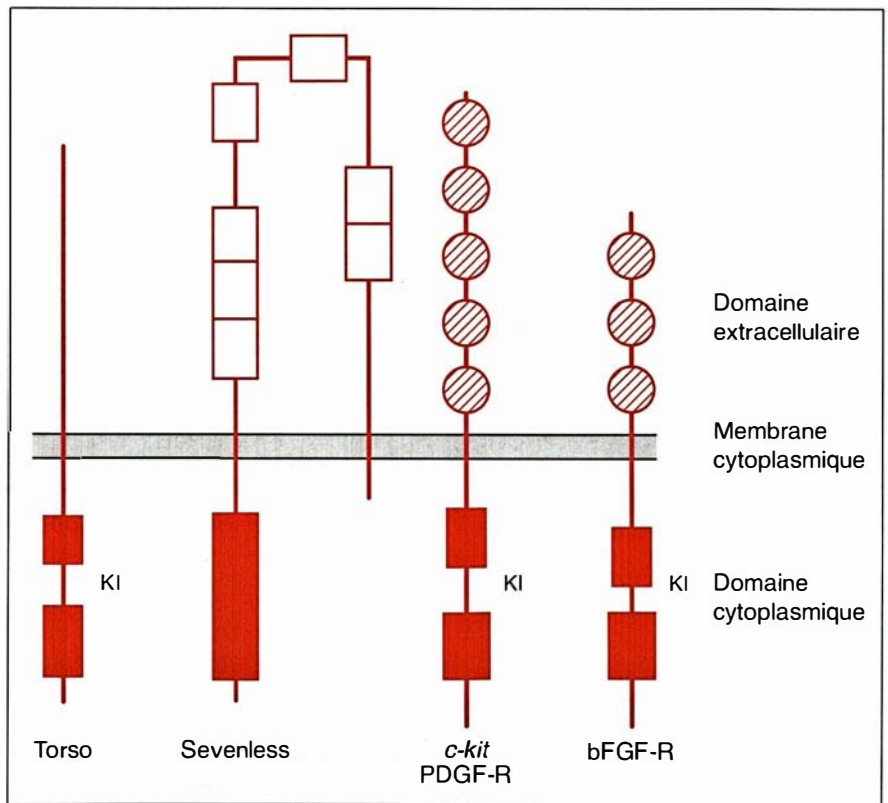


Figure 1. **Structure des récepteurs tyrosine kinase.** Le domaine kinase cytoplasmique est figuré par un ou deux rectangles rouges selon que la région catalytique est scindée ou non en deux parties par une région de taille différente, spécifique de chaque RTK, appelée KI (kinase insérée). Le domaine extracellulaire de fixation du ligand comprend parfois des régions de type immunoglobuline « Ig-like » représentées par des sphères hachurées (c-kit, récepteur au PDGF [PDGF-R] et récepteur au bFGF [bFGF-R] ou des domaines fibronectine de type III, figurés par des rectangles vides (sevenless).

Chez l'hétérozygote  $+/0$ , une seule copie du gène code pour un polypeptide fonctionnel exprimé à la surface de la cellule. Si la moitié du nombre des molécules de récepteur normalement exprimées dans une cellule suffit pour que les fonctions du récepteur soient totalement assurées, le phénotype de l'hétérozygote  $+/0$  sera identique à celui de l'homozygote sauvage  $+/+$ , et la mutation nulle du gène codant pour le RTK sera récessive. En revanche, si la moitié du nombre des molécules de récepteur normalement exprimées dans une cellule normale ne suffit pas, la cellule sera déficiente et le phénotype de l'hétérozygote  $+/0$  sera différent de celui de l'homozygote  $+/+$ . La mutation nulle sera alors dominante, puisque son phénotype est décelable en présence de l'allèle sauvage, tandis que le gène codant pour le RTK sera haplo-insuffisant, une seule copie du gène du RTK par génome diploïde ne permettant pas d'assurer toutes ses fonctions biologiques normales. Chez le mutant hétérozygote  $+/-$  portant un gène muté codant pour un RTK défectueux, mais capable d'interagir avec le polypeptide sauvage, la situation est encore plus grave : le polypeptide muté peut former des hétérodimères inactifs avec le polypeptide produit par l'allèle sauvage, ce qui se traduit alors par une réduction supplémentaire du nombre des RTK fonctionnels à la surface de la cellule. La mutation est dominante et, comme elle empêche le fonctionnement du polypeptide exprimé par l'allèle sauvage, elle est dite « dominante négative » [2]. La validité de ce modèle est bien documentée. Ainsi, le récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) est un RTK exprimé dans de nombreux types cellulaires, et il a été montré que la coexpression dans une cellule du récepteur sauvage et d'un récepteur muté de l'EGF permet la formation d'hétérodimères dépourvus d'activité catalytique et incapables d'assurer les fonctions biologiques normales du récepteur [3].

### Le système *torso/torso-like*, morphogène des extrémités terminales de la drosophile

Le gène *torso* (*tor*) est un gène à effet maternel dont le produit, un RTK,

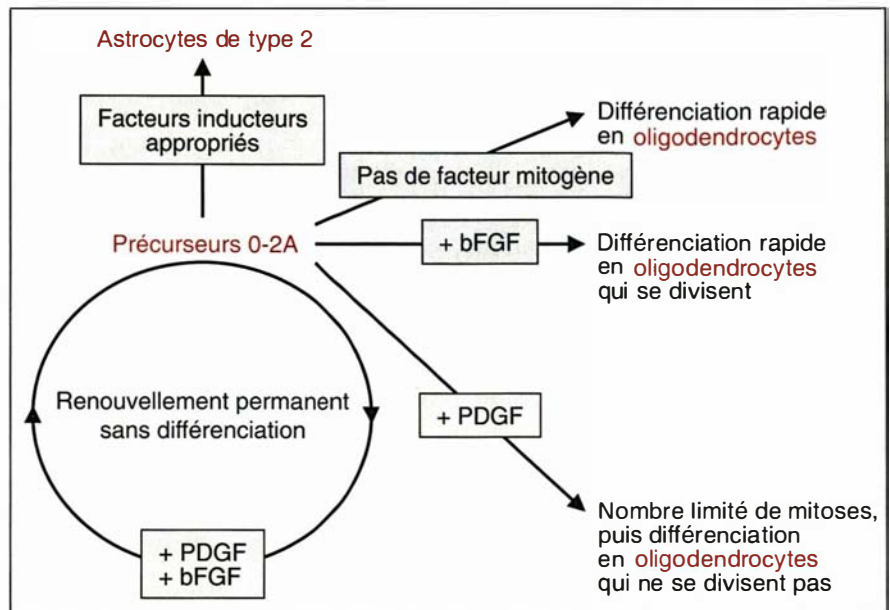


Figure 2. **Résumé de la relation entre prolifération et différenciation au niveau des cellules O-2A.** En l'absence de mitogène, les précurseurs O-2A se différencient sans proliférer. Une prolifération limitée précédant la différenciation en oligodendrocytes est observée en présence de PDGF. Le bFGF induit une prolifération et une différenciation en oligodendrocytes, la prolifération des oligodendrocytes se poursuit après la différenciation. Enfin, une coopération entre le PDGF et le bFGF inhibe la différenciation et permet une prolifération illimitée des précurseurs O-2A.

agit dans l'embryon de drosophile pour induire l'expression de gènes zygotiques nécessaires au développement des structures terminales. Les mutations-perte de fonction du gène *tor* sont responsables de la disparition des extrémités non segmentées de l'organisme (l'acron\* antérieur et le telson\* postérieur), tandis que la partie segmentée de l'embryon s'étend jusqu'aux extrémités. En revanche, les mutations-gain de fonction de *torso* produisent le phénotype inverse : la moitié antérieure de l'embryon est convertie en acron, la moitié postérieure en telson, tandis que la segmentation du thorax et de l'abdomen est supprimée. Pourtant, la protéine *torso* est exprimée de façon ubiquitaire à la surface des cellules de l'embryon précoce, sans localisation préférentielle dans les régions terminales. Le modèle le plus simple qui permet d'expliquer le rôle de *torso* est le suivant : l'activité tyrosine kinase

\* Acron et telson : les extrémités non segmentées de l'embryon de drosophile (acron, extrémité antérieure et telson, extrémité postérieure).

de *torso* est dépendante de la fixation d'un ligand dont la distribution est restreinte aux régions terminales de l'embryon, la protéine *torso* présente dans la partie centrale de l'embryon étant inactive parce que son domaine extracellulaire ne rencontre pas le ligand. Ce modèle permet de formuler au moins deux prédictions. Premièrement, le phénotype associé aux mutations-perte de fonction du ligand de *torso* doit être le même que celui qui est associé aux mutations-perte de fonction du gène *torso* lui-même. Deuxièmement, le phénotype des mutations-gain de fonction de *torso* ne doit pas être affecté par la présence d'une mutation-perte de fonction du ligand : le phénotype d'un mutant exprimant *torso* de façon constitutive ne saurait être influencé par une mutation dans un gène en amont, responsable de la production du signal ; autrement dit, les mutations-gain de fonction de *torso* doivent être épistatiques sur les mutations-perte de fonction du ligand.

Les mutations du gène *torso-like* (*tls*) remplissent ces conditions et *tls* est le

E N U O I X E 7

meilleur gène candidat à la fonction de ligand de Torso [4].

### Le système *sevenless/bride of sevenless* induit la différenciation d'une cellule unique de l'ommatidie

La rétine de drosophile est composée de 800 unités ou ommatidies\*\*. Chaque ommatidie comprend 20 cellules et chacune d'entre elles acquiert une fonction spécifique selon la position qu'elle occupe et les signaux moléculaires qu'elle reçoit des cellules voisines. L'expression du gène *sevenless*, qui code pour un RTK au domaine extracellulaire spécialement étendu (figure 1), est nécessaire pour que le précurseur du photorécepteur numéro 7 (R7) acquière un phénotype neuronal : les mutations-perte de fonction de *sevenless* sont associées à une non-induction du précurseur R7, qui devient alors une cellule du cristallin. La différenciation du précurseur R7 en photorécepteur nécessite que R7 exprime l'allèle sauvage de *sevenless* et que la cellule voisine (R8) exprime une protéine codée par l'allèle sauvage du gène *bride of sevenless*. La protéine Bride of sevenless est selon toute vraisemblance le ligand du RTK *sevenless* [5].

### Le système *c-kit/Steel* permet la survie des cellules souches.

Le facteur Steel, produit du gène *Steel* (*Sl*), est le ligand du RTK *c-kit*, codé par le locus *W* de la souris. Les mutations-perte de fonction dans les gènes du ligand (*Sl*) et du récepteur (*W*) sont caractérisées par des phénotypes semblables : une réduction de la fertilité, une absence partielle ou totale de pigmentation et une anémie macrocytique plus ou moins sévère. Ce phénotype est la conséquence d'un défaut cellulaire des cellules primordiales germinales, des précurseurs des mélanocytes et des cellules souches hématopoïétiques. Comme prédit, les mutations de *W* affectent les cellules cibles *per se*, tandis que les mutations de *Sl* affectent leur microenvironnement. Les cellules primordiales germinales (PGC) sont détectées — parce que

riches en phosphatase alcaline — au jour 7 (J7) de l'embryogenèse de la souris dans le mésoderme extra-embryonnaire, en arrière de la ligne primitive, d'où elles migrent, le long de l'intestin postérieur, pour atteindre à J11,5 les crêtes génitales. Les PGC prolifèrent rapidement pendant cette migration : de 100 cellules à J 7, la population atteint 25 000 cellules à J 13,5 où elles cessent de se diviser. Les PGC expriment *c-kit* tout le long de cette migration-prolifération, jusqu'à l'arrêt des divisions cellulaires. Des PGC prélevées sur des embryons à J 8,5 ont été mises en culture sur des fibroblastes embryonnaires en présence et en l'absence de Steel. Après 3 à 5 jours de culture dans ces conditions, les PGC forment des colonies séparées que l'on peut compter, tandis que leur rythme de division est évalué en mesurant l'incorporation de bromodésoxyuridine. Cette expérience a montré que le facteur Steel favorise la survie des PGC, mais ne stimule pas leur prolifération [6]. En revanche, en présence d'une forme associée à la membrane du facteur Steel, de LIF (*leukemia inhibitory factor*) et de bFGF (*basic fibroblast growth factor*) les PGC prolifèrent indéfiniment en culture et donnent naissance à des colonies de cellules qui ressemblent aux cellules non différenciées pluripotentiellées embryonnaires souches (ES) [7]. Lorsque ces descendants de PGC en culture sont injectés à des blastocystes, ils contribuent à la formation d'animaux chimères, ce qui indique que des cellules souches pluripotentiellées peuvent être obtenues à partir de PGC [8]. Il reste à déterminer si ces cellules ES dérivées de PGC sont capables de coloniser la lignée germinale de la souris. Le système *c-kit/Steel* est un facteur de survie qui facilite la réponse mitotique des PGC aux facteurs de croissance. On comprend dès lors comment les mutations-perte de fonction de *W* et de *Sl* affectent la fertilité des souris : si, pendant leur migration, l'apport de Steel aux PGC est insuffisant (dans le cas des mutants *Sl*) ou si la réponse catalytique à la fixation de Steel sur le récepteur est réduite ou absente (dans le cas des mutants *W*), les PGC ne survivent pas. Cette

interprétation est confortée par le fait que, chez les mutants *W* et chez les mutants *Sl*, le nombre des PGC qui atteignent la crête génitale est très faible. Il semble que *c-kit/Steel* assure également la survie des mélanoblastes [9] et des cellules hématopoïétiques du lignage myéloïde [10]. Les effets pléiotropes des mutations *W* et *Sl* sur les lignages mélanocytaire et hématopoïétique s'expliqueraient alors d'une façon similaire. Plus surprenant, *c-kit/Steel* a également un effet sur la survie des précurseurs lymphocytaires [11]. Ce dernier résultat était imprévisible, aucune atteinte du système lymphocytaire n'ayant été observée à ce jour chez les souris portant des mutations *W* ou *Sl*.

### Plusieurs récepteurs peuvent coopérer pour le renouvellement de cellules souches et bloquer leur différenciation

Les précurseurs O-2A (*oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cells*) dérivés du nerf optique de l'embryon de rat sont bipotentiels : ils donnent naissance *in vivo* à des populations d'oligodendrocytes, qui myélinisent les grands axones du système nerveux central, et à des astrocytes de type 2, qui enveloppent les axones dénudés au niveau des nœuds de Ranvier. Les précurseurs gliaux O-2A sont l'un des quelques types cellulaires dont la différenciation et la prolifération ont pu être étudiées *in vitro* : cultivés en présence de facteurs inducteurs appropriés, les précurseurs O-2A se différencient en astrocytes de type 2, tandis qu'en l'absence de facteur de croissance, dans un milieu défini, ils se différencient rapidement en oligodendrocytes. Lorsque des cellules O-2A sont cultivées dans un milieu défini en présence de PDGF (*platelet-derived growth factor*), on observe qu'après un nombre limité de divisions cellulaires, résultant d'un effet mitogène du PDGF, elles se différencient en oligodendrocytes et cessent de se diviser [12]. Le bFGF ajouté seul dans le milieu défini a un effet différent : les cellules O-2A se différencient rapidement en oligodendrocytes, qui continuent de se diviser et d'exprimer les marqueurs spécifiques des oligodendrocytes. Le point essentiel est qu'en présence de

\*\* Ommatidie : Chacune des unités élémentaires dont l'ensemble constitue l'œil composé des arthropodes.

PDGF et de bFGF ensemble, les pré-curseurs O-2A se divisent indéfiniment sans ce différencier (figure 2) [13]. Ces expériences révèlent l'existence d'une coopération entre plusieurs RTK, les deux récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  des isoformes A et B du PDGF, et le récepteur du bFGF, pour assurer le renouvellement continu, sans différenciation, de cellules pré-curseurs, alors même que chacun des systèmes pris isolément, récepteur du PDGF/PDGF et récepteur du bFGF/bFGF, induit une différenciation et a des effets inverses sur la prolifération cellulaire.

### Les voies cytoplasmiques de transduction du signal pourraient être communes à plusieurs systèmes RTK/ligand

Les ligands et leurs récepteurs transmettent et reçoivent les signaux extracellulaires. Il doit exister dans la cellule d'autres protéines qui convertissent ces signaux en termes de survie, de division cellulaire ou de différenciation. Les régions autophosphorylées des RTK représentent des sites de fixation spécifiques des protéines cytoplasmiques cibles impliquées dans la transmission du signal, et la caractérisation des protéines qui sont phosphorylées en réponse à la fixation du ligand est en cours [1]. Cependant, il existe d'ores et déjà des arguments génétiques qui suggèrent que certaines voies de transmission des signaux en aval des RTK pourraient être communes à plusieurs récepteurs.

La mutation  $W^v$  est une mutation-perte de fonction dans le domaine catalytique du RTK *c-kit* et les souris homozygotes  $W^v/W^v$  sont totalement dépourvues de pigmentation. Cependant, on observe que les souris  $W^v/W^v$  transgéniques pour l'oncogène *ret* ont 20 à 50 % de leur pelage pigmenté [14]. L'oncogène *ret* (un gène de fusion entre le proto-oncogène *c-ret*, qui code pour un RTK, et *rfp*, qui code pour une protéine à doigt de zinc) est donc capable de compenser partiellement le défaut de *c-kit* dans les mélanoblastes des souris  $W^v/W^v$ , ce qui indique que *ret* et *c-kit* pourraient utiliser les mêmes voies intracellulaires de transduction du signal. De même, il a été montré que *c-fms*, le RTK du CSF-1

(*macrophage growth factor colony-stimulating factor 1*) peut, lorsqu'il est introduit dans des mastocytes cultivés *in vitro*, compenser les défauts associés à des mutations-perte de fonction de *c-kit* [5]. *ret*, *c-fms* et *c-kit* partageraient certains éléments effecteurs en aval de la réception du signal.

Il est clair aujourd'hui qu'un couple RTK/ligand peut induire seul la différenciation de cellules isolées (*sevenless/bride of sevenless*) ou d'un groupe de cellules (*torso/torso-like*). Cependant, les études récentes montrent en outre que : (1) certaines associations de RTK permettent le maintien dans un état de différenciation donné de cellules souches ; et que (2) l'association de plusieurs paires RTK/ligand a des effets biologiques différents de ceux de chacune des paires considérée séparément. Il apparaît que le développement embryonnaire utilise non seulement les propriétés individuelles des différents RTK, mais aussi les propriétés de combinaisons de RTK (et d'autres récepteurs). Dans ce contexte, le partage par plusieurs systèmes RTK/ligand d'éléments cytoplasmiques effecteurs, en aval de la réception du signal, ne constituerait pas une surprise ; les organismes multicellulaires nous ont déjà montré à plusieurs reprises comment ils tirent parti de la combinatoire pour engendrer une grande diversité de réponses cellulaires en utilisant un nombre limité de formes moléculaires ■

#### J.-J. Panthier

Inra, URA de génétique moléculaire, École nationale vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général-de-Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex.

#### TIRÉS A PART

J.-J. Panthier

#### RÉFÉRENCES

- Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signalling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 1992 ; 9 : 383-91.
- Herskowitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 1987 ; 329 : 219-22.
- Kashles O, Yarden Y, Fischer R, Ullrich A, Schlessinger J. A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 1454-63.
- Stevens IM, Frohnhöfer HG, Klingler M, Nüsslein-Volhard C. Localized requirement for *torso-like* expression in follicle cells for development of terminal anlagen of the *Drosophila* embryo. *Nature* 1990 ; 346 : 660-2.
- Reinke R, Zipursky SL. Cell-cell interaction in the *Drosophila* retina : the *bride-of-sevenless* gene is required in photoreceptor cell R8 for R7 cell development. *Cell* 1988 ; 55 : 321-30.
- Godin I, Deed R, Cooke J, Zsebo K, Dexter M, Wylie CC Effects of the *steel* gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1991 ; 352 : 807-9.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992 ; 359 : 550-1.
- Matsui Y, Zsebo K, Hogan BLM. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992 ; 70 : 841-7.
- Steel K, Davidson DR, Jackson IJ. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (*c-kit* ligand) is a survival factor. *Development* 1992 ; 115 : 1111-9.
- Ogawa M, Matsutaki Y, Sudo T, Kira T, Nakauchi H, Nishikawa SI. Expression and function of *c-kit* in hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1991 ; 174 : 63-71.
- Palacios R, Nishikawa SI. Developmentally regulated cell surface expression and function of *c-kit* receptor during lymphocyte ontogeny in the embryo and adult mice. *Development* 1992 ; 115 : 1133-47.
- Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF, Noble MD. Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocytes development in culture. *Nature* 1988 ; 333 : 562-5.
- Bögler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M. Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type 2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 6368-72.
- Iwamoto T, Takahashi M, Ohbayashi M, Nakashima I. The *ret* oncogene can induce melanogenesis and melanocyte development in  $W^v/W^v$  mice. *Exp Cell Research* 1992 ; 200 : 410-5.
- Dubreuil P, Forrester L, Rottapel R, Reedijk M, Fujita J, Bernstein A. The *c-fms* gene complements the mitogenic defect in mast cells derived from mutant *W* mice but not *mi* (microphthalmia) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 2341-5.