

L récepteur de l'adénosine A2b : un co-récepteur de la nétrine-1 impliqué dans le guidage axonal

La croissance et l'orientation des axones dans le système nerveux immature s'effectuent par l'intermédiaire du cône de croissance, une structure hautement spécialisée située à l'extrémité distale de l'axone [1]. C'est le neuroanatomiste espagnol Santiago Ramon y Cajal qui, au début du XX^e siècle, a le premier identifié le cône de croissance et deviné son rôle essentiel. On sait maintenant que le cheminement de l'axone résulte d'interactions moléculaires précises entre des récepteurs transmembranaires à la surface du cône de croissance et des molécules présentes dans l'environnement qu'il explore. Certains de ces signaux, dont la nétrine-1, sont diffusibles, produits par des cellules situées à distance de l'axone [2, 3]. La nétrine-1 est principalement synthétisée, chez les vertébrés et les invertébrés, par des cellules spécialisées localisées au niveau de la ligne médiane ventrale du système nerveux. Dans toutes les espèces animales, une des premières décisions que doit prendre un axone est celle de croiser (on parle alors d'axones commissuraux) ou de ne pas croiser la ligne médiane ventrale. Or, des expériences *ex-vivo* et *in vivo* ont révélé que la nétrine-1 exerce une attraction sur les axones commissuraux [3]. Par ailleurs, l'expression et le rôle de la nétrine-1 ne se limitent pas aux axones commissuraux, comme l'ont montré les profondes altérations du système nerveux des souris inactivées pour le gène codant pour la nétrine-1 [3]. Le groupe de Marc Tessier-Lavigne (UCSF, San Francisco, États-Unis) a révélé en 1996 que l'activité chimioattractrice de la nétrine-1 fait intervenir un récepteur transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines,

appelé DCC (pour *deleted in colorectal cancer*) [4].

DCC est connu depuis plus de dix ans, en raison de la délétion du gène dans plus de 70% des cancers du colon (d'où son nom) ainsi que dans un nombre considérable d'autres tumeurs, ce qui laisse suggérer un rôle possible de suppresseur de tumeur pour cette protéine [5]. Une explication possible de ces deux fonctions de DCC, guidage axonal et possible suppresseur de tumeurs, apparemment sans relation, est peut-être dans la dualité des mécanismes de fonctionnement de ce récepteur. Nous avons en effet montré que DCC appartient à une famille de récepteurs dits *dependence receptors*, terme anglais difficilement traduisible littéralement en français, qui désigne des récepteurs qui transmettent un signal différent selon

qu'ils sont ou non occupés par le ligand [6, 7]. En présence de ligand, le signal transmis est « constructif », et engage la cellule dans un processus de différenciation et/ou de prolifération, qui se traduit dans le cas des axones commissuraux et de la nétrine-1 par une attraction du cône de croissance. Au contraire, en l'absence du ligand, ces mêmes récepteurs ne sont pas inactifs, mais déclenchent un processus de mort cellulaire ou apoptose. On peut donc imaginer que des cellules tumorales exprimant DCC, qui se développeraient en dehors des zones d'expression du ligand, seraient éliminées [6]. Concernant les voies de signalisation intervenant en aval de la liaison de DCC à la nétrine, peu de choses étaient connues, hormis l'observation d'une accumulation d'AMPc et de calcium, deux messagers

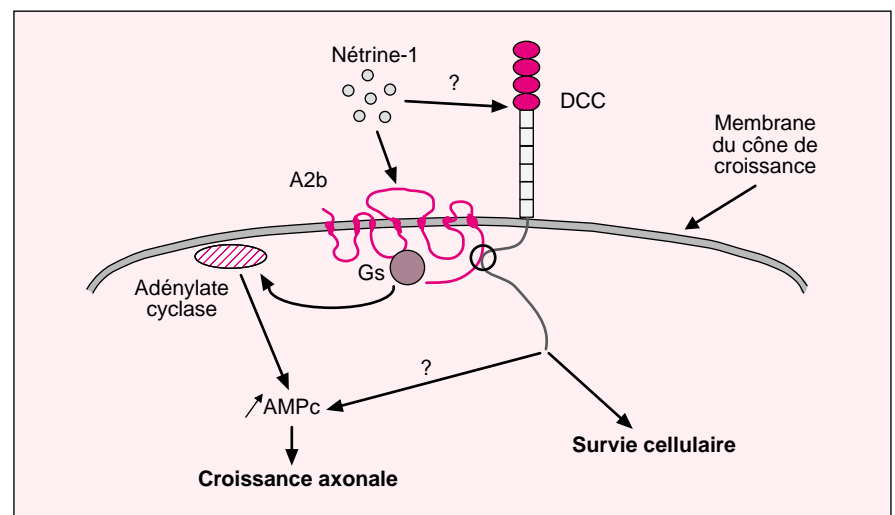


Figure 1. **A2b** est un récepteur de la nétrine-1 et un co-récepteur de DCC. La présence de la nétrine-1 conduit à l'interaction d'A2b avec DCC. A2b, après avoir fixé la nétrine-1, stimule via la fixation d'une protéine Gs une production d'AMPc, qui pourrait être à la base d'une modulation du cytosquelette et favoriser la croissance axonale.

intracellulaires cruciaux pour l'extension du cône de croissance [8].

La recherche, par la technique du double hybride, d'autres partenaires de DCC nous a alors conduits à identifier des partenaires très intéressants à la fois pour la signalisation de la mort cellulaire et pour le guidage axonal [9]. Ainsi, le crible a mis en évidence l'interaction de DCC avec la caspase-3, et DCC représente la base d'un complexe multi-protéique permettant le recrutement de caspases et leur activation directe indépendamment des voies décrites jusqu'ici [10]. Un autre résultat surprenant de notre crible a été la découverte d'un probable co-récepteur de la nétrine-1: il existe en effet une interaction entre le domaine intracellulaire de DCC et les 23 derniers acides aminés d'A2b, un récepteur de l'adénosine identifié il y a plus de dix ans. Les récepteurs de l'adénosine appartiennent à la superfamille des récepteurs à «sept domaines transmembranaires», et comprennent quatre sous-types, A1, A2a, A2b et A3 [11]. L'activation d'A2b entraîne un relargage de calcium *via* un recrutement de protéines Gq [11], ainsi qu'une stimulation de l'adénylate cyclase *via* des protéines Gs conduisant à une élévation de la concentration cytoplasmique en AMPc. L'existence d'une interaction entre DCC et A2b, confirmée par immuno-précipitation, nous a semblé particulièrement intéressante pour

plusieurs raisons: (1) L'identification de DCC comme récepteur de la nétrine-1 est fondée essentiellement sur des observations indirectes et l'existence d'un co-récepteur de DCC était suggérée. Or, l'interaction de DCC avec A2b est très fortement augmentée en présence de nétrine-1, et la nétrine-1 est en fait un ligand d'A2b, le couple A2b/nétrine-1 ayant une constante de dissociation d'environ 11 nM (figure 1). Ce résultat est particulièrement surprenant car il suggère que les récepteurs de l'adénosine ont d'autres ligands que l'adénosine. (2) La similitude mentionnée ci-dessus entre les deux messagers (l'AMPc et le calcium) modulés lors de l'activation de A2b et lors d'une stimulation par la nétrine-1 [8]. Or la fixation de la nétrine-1 sur A2b stimule, dans les cellules qui expriment ce récepteur, une accumulation d'AMPc qui peut être bloquée par des antagonistes connus d'A2b.

Ces observations nous ont conduits à examiner plus en détail le rôle possible d'A2b dans la croissance axonale dépendante de la nétrine-1. On sait en effet que la nétrine-1 est nécessaire à la croissance *in vitro* des axones commissuraux issus d'explants de moelle épinière dorsale embryonnaire de rat. Nous avons montré que ces axones expriment le récepteur A2b, et que l'ajout d'inhibiteurs de ce récepteur aux cultures de moelle dorsale inhibe l'action stimu-

latrice de la croissance axonale exercée par la nétrine-1 (figure 2). A2b est donc un élément essentiel de la voie de signalisation de la nétrine-1 dans les cônes de croissance. Ils suggèrent également que DCC n'est peut-être qu'un co-récepteur d'A2b, ou ne lie la nétrine-1 que s'il y a interaction avec A2b. Toutefois, l'expression ubiquitaire d'A2b dans le système nerveux contraste avec celle de DCC qui est presque restreinte aux seuls neurones qui répondent à la nétrine-1. L'effet chimio-attractif de la nétrine-1 nécessite donc probablement une interaction de ces deux récepteurs. On pourrait alors considérer la triade A2b/DCC/nétrine-1 comme la base d'un complexe dans lequel A2b transduit le signal dépendant de l'AMPc alors que DCC joue un rôle de régulateur de la survie neuronale. Pour compléter l'histoire, il faut souligner que le groupe de Marc Tessier-Lavigne a montré que DCC peut interagir *in cis* avec d'autres récepteurs de la nétrine-1, les récepteurs de la famille UNC5, et que cette interaction est déterminante à l'activité, répulsive cette fois, qu'exerce la nétrine-1 sur certains axones [12]. Il reste à déterminer si A2b peut interagir avec les récepteurs UNC5 et si les autres récepteurs de l'adénosine sont eux aussi impliqués dans le guidage axonal. Dans tous les cas, comprendre comment A2b lie la nétrine-1 et transduit une accumulation d'AMPc, quel est le rôle de DCC dans cette signalisation et quelle est la place d'A2b dans la mise en place du réseau neuronal au cours du développement, sont autant de questions qu'il nous reste à résoudre.

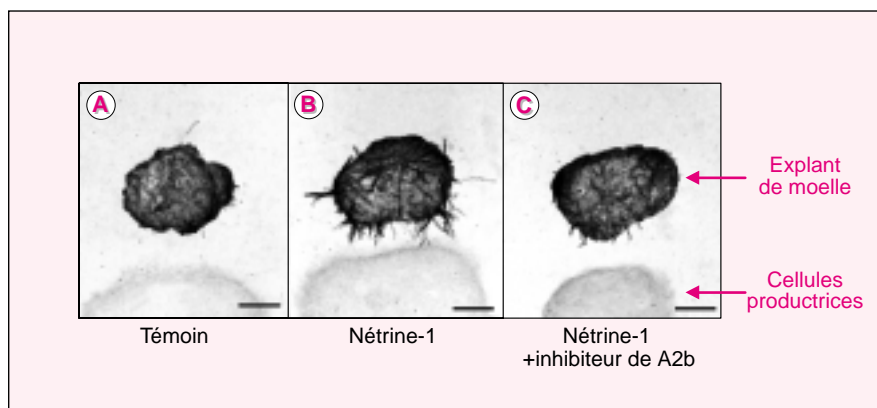


Figure 2. **Illustration du rôle fonctionnel de la nétrine-1 sur la croissance axonale.** Reproduction de l'expérience montrant qu'un explant de moelle dorsale montre une forte croissance axonale lorsqu'il est placé en présence de cellules produisant de la nétrine-1. Dans les mêmes conditions, l'ajout d'un inhibiteur d'A2b inhibe cette croissance dépendante de la nétrine-1. La coloration des axones a été effectuée par immunohistochimie de la β 3-tubuline [9].

Patrick Mehlen
Véronique Corset

Apoptose/Différenciation. Équipe labellisée «La ligue». Centre de génétique moléculaire et cellulaire CNRS UMR 5534, Université Lyon 1, 69622 Villeurbanne, France.

Alain Chédotal

Inserm U. 106, Hôpital de la Salpêtrière, 75651 Paris Cedex 13, France.

1. Hynes RO, Lander AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 1992; 68: 303-22.

2. Chédotal A, Tessier-Lavigne M. Attraction et répulsion sont les deux moteurs du guidage axonal. *Med Sci*. 2000; 16: 751-6.

3. Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, et al. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 1996; 87: 1001-14.

4. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, et al. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 1996; 87: 175-85.

5. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al. Identifica-

tion of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247: 49-56.

6. 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.

7. Mehlen P, Bredesen DE. Dependence receptors as links between apoptosis, nervous system development and control of tumorigenesis. *Bull. Cancer* 2000; 87: 537-41.

8. Song HJ, Poo MM. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9: 355-63.

9. Corset V, Tuyen Nguyen-Ba-Charvet K, Forcet C, Moysse E, Chédotal A, Mehlen P. Netrin-1 indu-

ced growth cone attraction and cAMP production is mediated *via* interaction with the Adenosine A2b receptor. *Nature* 2000; 407: 747-50.

10. Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE, Mehlen P. The dependence receptor DCC defines a new mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 (sous presse).

11. Feoktistov I, Biaggioni I. Adenosine A2B receptors. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 381-402.

12. 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.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Caractérisation des lymphocytes TH folliculaires.** La migration lymphocytaire et la compartimentalisation des lymphocytes T et des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes est largement dépendante des chimiokines et de leurs récepteurs. SLC et ELC, deux chimiokines produites dans les zones T des ganglions et absentes des follicules B, jouent un rôle important dans le trafic lymphocytaire en se liant à leur récepteur spécifique CCR7 exprimé par les lymphocytes T et les cellules dendritiques mûres. Les souris ayant un gène inactivé pour CCR7 ont des anomalies sévères de l'architecture des organes lymphoïdes secondaires. La chimiokine BCA-1 est responsable de l'organisation folliculaire au niveau de la rate et des plaques de Peyer en favorisant la migration des lymphocytes B qui expriment le récepteur CXCR5 spécifique de cette chimiokine. Deux articles récents [1, 2] rapportent la caractérisation d'une population minoritaire des lymphocytes T du sang et des amygdales qui expriment également le récepteur CXCR5. Dans le sang, ces cellules co-expriment CR45RO et CCR7, deux marqueurs de cellules

mémoires. Dans les organes lymphoïdes, les cellules T CXCR5⁺ perdent le marqueur CCR7 et sont localisées dans le manteau et les follicules B des centres germinatifs. Ces cellules expriment fortement le CD40 ligand, molécule de co-stimulation importante pour l'induction de la commutation isotypique des lymphocytes B. Les autres molécules exprimées à la surface de ces cellules sont essentiellement des antigènes d'activation (CD69, HLA-DR, ICOS pour *inducible costimulator*, une nouvelle molécule de la famille CD28). Comparés aux cellules CD4 CXCR5⁻, les lymphocytes T CD4⁺/CD45RO⁺/CXCR5⁺ isolés des amygdales stimulent fortement (environ 10 fois) la production d'IgA et d'IgG. Ces cellules synthétisent peu de cytokines, notamment d'interféron γ , d'IL-5 et d'IL-4 après activation *in vitro*. Ainsi, l'expression de CXCR5 par les lymphocytes T les rend sensibles au gradient de synthèse de BCA-1, maximale dans les centres germinatifs, et leur fait perdre la sensibilité aux chimiokines ELC et SLC synthétisées principalement dans les zones T-dépendantes. La perte de sensibilité à ces chimiokines expliquerait le passage

des lymphocytes T CD4 spécifiques des zones T vers les centres germinatifs. L'interaction des molécules CD40 ligand et ICOS des lymphocytes CD4⁺/CXCR5⁺, avec leurs ligands CD40 et CD80 sur les lymphocytes B, favorisent l'interaction T/B. L'observation qu'une forte proportion de cellules CD4⁺/CXCR5⁺ expriment la molécule CD95 (Fas) suggère que ces cellules disparaissent par apoptose lors de l'évanescence des centres germinatifs à la fin de la réponse T-B et que ces cellules ne participent pas au compartiment des lymphocytes T mémoires à longue durée de vie. Ces résultats suggèrent que cette population T CXCR5⁺ représente une nouvelle catégorie de lymphocytes T CD4 sensibles à l'action de chimiokines attractives (BCA-1) du centre germinatif et impliquées dans l'induction des réponses anticorps aux antigènes T dépendants. Cela justifie pleinement leur dénomination de lymphocytes T *helper* folliculaires.

[1. Breitfeld D, et al. *J Exp Med* 2000; 192: 1545-52.]

[2. Schaerli P, et al. *J Exp Med* 2000; 192: 1553-62.]