

Coopération entre les intégrines et les récepteurs à activité tyrosine kinase

L'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire engendre de nombreux signaux intracellulaires transmis principalement par des récepteurs de la famille des intégrines. De plus, adhérence cellulaire et facteurs de croissance coopèrent dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaires [1]. De nombreux facteurs de croissance interagissent avec des récepteurs possédant une activité tyrosine kinase (RTK). Ces dernières années ont apporté des informations extrêmement intéressantes sur la façon dont les intégrines s'associent aux récepteurs à activité tyrosine kinase, modulent leur activité et interfèrent à différents niveaux des voies de signalisation activées par ces récepteurs.

Les protagonistes

• Récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont généralement constitués d'un domaine extracellulaire qui contient le site de liaison au ligand et d'un domaine cytoplasmique comprenant une région très conservée responsable de l'activité tyrosine kinase. La liaison du ligand induit la dimérisation des récepteurs, leur activation et leur autophosphorylation sur des résidus tyrosine. Les récepteurs phosphorylés peuvent alors s'associer à des protéines contenant des domaines SH2, première étape de l'activation des voies de signalisation qui règlent la survie et la croissance cellulaires. La signalisation des RTK n'étant pas le propos de cette revue, le lecteur est invité à lire celle de J. Schlessinger [2].

• Intégrines

Une intégrine est constituée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β , chacune ayant un large domaine extracellulaire, un segment transmembranaire et un domaine cytoplasmique généralement très court et dépourvu d'activité enzymatique. Quatorze isoformes α et neuf iso-

formes β s'associent de façon diverse pour donner naissance à plus de vingt récepteurs, ce qui confère une grande diversité au système [3]. Lors de l'adhérence à la matrice extracellulaire, les intégrines s'agrègent pour construire des structures périmembranaires appelées plaques d'adhérence focales (figure 1). Celles-ci sont dues à l'interaction des intégrines avec des protéines du cytosquelette comme la taline et la vinculine qui, à leur tour, s'associent à d'autres protéines dont les plus abondantes sont l'actinine- α et l'actine. Ces interactions permettent de constituer des réseaux de filaments d'actine (les fibres de stress) et d'élaborer le cytosquelette de la cellule. Les intégrines ont donc un rôle structural très important, mais pas seulement, puisque leur activation

induit aussi le recrutement de molécules de signalisation intracellulaires. Plus de 20 protéines de signalisation différentes ont été identifiées dans les plaques d'adhérence focales [4]! On y trouve des tyrosine kinases cytosoliques, comme la *focal adhesion kinase* (FAK), Src et Csk. Les plaques d'adhérence sont d'ailleurs les sites les plus importants de phosphorylation sur tyrosine dans la cellule. Une fois activée, FAK interagit avec des protéines adaptatrices comme la paxilline et Grb2, et recrute plusieurs protéines de signalisation contenant des domaines SH2, entre autres la PI 3-kinase et la phospholipase $C\gamma$. La protéine kinase FAK est notamment impliquée dans l'activation des voies de signalisation PI 3-kinase/AKT et Ras/MAP-kinase [5].

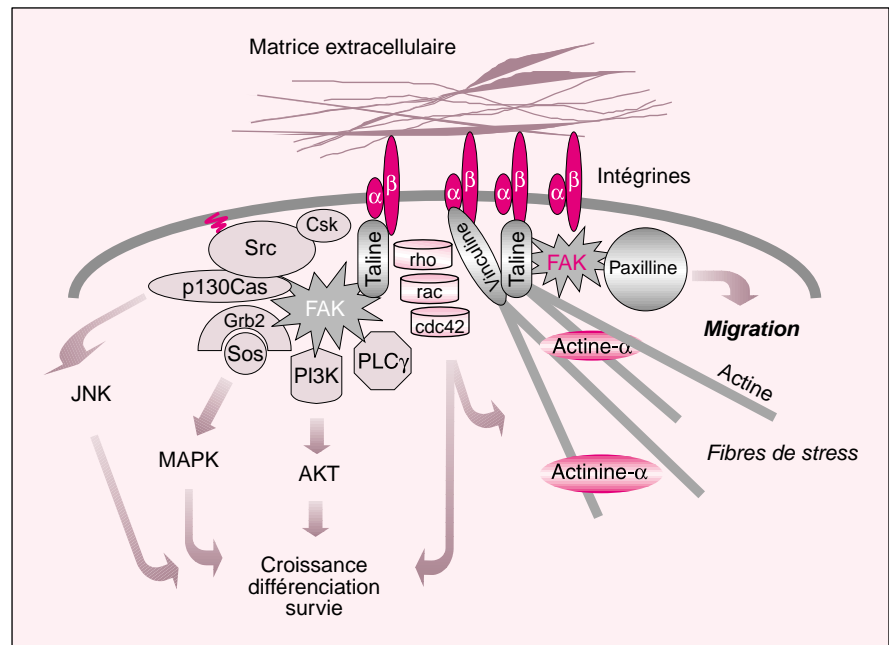


Figure 1. **Structure des plaques d'adhérence focales.** Après leur interaction avec les protéines de la matrice extracellulaire, les intégrines s'associent à des protéines structurales comme la taline et la vinculine. Ces protéines interagissent avec l'actinine- α et l'actine pour former les fibres de stress. L'activation des intégrines induit également le recrutement de tyrosine kinases cytosoliques et de GTPases, qui activent de nombreuses voies de signalisation et participent à l'organisation du cytosquelette.

L'activation de certaines intégrines ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$) stimule la tyrosine kinase fyn qui s'associe à la protéine adaptatrice Shc et la phosphoryle. Celle-ci recrute le complexe Grb2/Sos et contribue de façon significative à l'activation de la cascade des MAP-kinases [6].

Par ailleurs, les intégrines activent les petites GTPases Rho, Rac et cdc42, impliquées dans la réorganisation du cytosquelette et dans l'activation de voies de signalisation participant à la régulation de la croissance cellulaire [7, 8].

Les intégrines recrutent les RTK, modulent leur activité...

Le mécanisme de coopération entre les intégrines et les RTK serait – au moins en partie – structural. L'organisation du cytosquelette et des plaques d'adhérence par les intégrines semble promouvoir l'assemblage de larges complexes multi-protéiques qui faciliteraient la transmission des signaux intracellulaires. La présence des RTK dans les plaques d'adhérence est en faveur de cette hypothèse.

En effet, le récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) est localisé dans les plaques d'adhérence focales lorsque les intégrines $\alpha_v\beta_3$ sont activées par la tenascine-C [9]. Les récepteurs du PDGF (*platelet-derived growth factor*), de l'insuline, du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et de la MSP (*macrophage stimulating protein*) sont observés dans des complexes de co-immunoprécipitation avec les intégrines [10-12]. Le plus souvent, le recrutement des récepteurs au niveau des plaques d'adhérence se fait après leur activation par le facteur de croissance correspondant. Ce n'est pourtant pas toujours le cas puisque par exemple le récepteur de la MSP s'associe avec les intégrines en l'absence de ligand [12].

Il a souvent été proposé que l'agrégation des RTK au niveau des plaques d'adhérence optimiserait la transactivation et la phosphorylation des récepteurs. Cette hypothèse est corroborée par le fait que l'autophosphorylation des récepteurs de l'EGF, du PDGF, de l'insuline, du VEGF et de la MSP induite par le ligand est

amplifiée par l'adhérence cellulaire [10, 11, 13-16]. Cependant, il n'y a pas toujours de corrélation entre l'association des RTK avec les intégrines et l'augmentation de leur phosphorylation. En effet, les récepteurs de l'insuline et de l'EGF sont préférentiellement associés à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [9, 10], mais l'amplification de l'autophosphorylation a été observée avec l'intégrine β_1 [13-15].

Des résultats publiés récemment apportent un éclairage nouveau sur la question en proposant un rôle pour Src dans ce phénomène d'amplification. En effet, Src activée par les intégrines lors de l'adhérence cellulaire semble phosphoryler directement les récepteurs de l'EGF et de la MSP, induisant une augmentation de leur autophosphorylation et éventuellement une augmentation de leur activité kinase [16]. Cette hypothèse est illustrée par la *figure 2*.

Il n'existe encore aucune preuve que l'interaction entre les intégrines et les RTK est directe. Il est donc tout à fait possible qu'elle fasse intervenir une protéine intermédiaire. Dans le cas du récepteur de l'insuline par exemple, la protéine adaptatrice *insulin receptor substrate-1* (IRS-1) interagit avec le récepteur activé et phosphorylé sur tyrosine. IRS-1 et le récepteur sont tous les deux retrouvés associés à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ après

stimulation par l'insuline [10, 17]. On sait aussi que IRS-1 interagit avec FAK [18]. Comme FAK est recrutée par les intégrines, il est tentant de proposer que le complexe IRS-1/FAK serve d'intermédiaire entre le récepteur de l'insuline activé et les intégrines au niveau des plaques d'adhérence.

Indépendamment de leur effet coopératif, les intégrines stimulent les RTK en l'absence du facteur de croissance correspondant. Il ne s'agit plus ici d'une véritable collaboration, mais plutôt d'une utilisation par les intégrines de l'activité kinase des récepteurs comme vecteur de signalisation. Par exemple, l'adhérence de fibroblastes sur des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou le collagène induit une oligomérisation et une activation du récepteur du PDGF- β en absence de PDGF [19]. De même, le récepteur de la MSP est phosphorylé dans des cellules épithéliales mises en culture sur du collagène [16].

Dans des lignées dérivées de mélanomes ou de carcinomes, l'adhérence cellulaire stimule le récepteur Met. De façon intéressante, l'activation de Met par les intégrines n'est pas observée dans des cellules non transformées [20]. Dans une autre étude, l'activation des intégrines dans des fibroblastes et des cellules

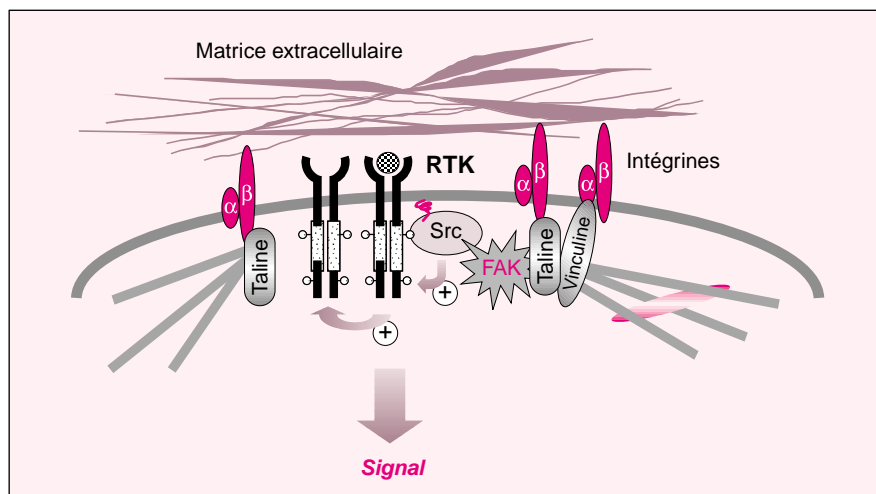


Figure 2. **Coopération entre les intégrines et les récepteurs à activité tyrosine kinase.** Dans les cellules adhérentes, les RTK activés sont localisés dans les plaques d'adhérence focales. L'adhérence à la matrice extracellulaire amplifie le niveau de phosphorylation des RTK (•) en favorisant leur agrégation et/ou en permettant leur phosphorylation par Src.

endothéliales induit la phosphorylation du récepteur de l'EGF, ce qui est corrélé à la stimulation de la cascade des MAP-kinases par les intégrines [21]. On notera que cet effet a été observé dans des cellules ayant un nombre artificiellement élevé de récepteurs de l'EGF. Cela dit, ce phénomène pourrait avoir de l'importance dans le cas d'une surexpression du récepteur de l'EGF, par exemple dans certaines cellules transformées. L'effet de l'adhérence sur la phosphorylation des RTK en l'absence de facteur de croissance est transitoire, et les RTK de cellules attachées depuis longtemps ne sont pas activés. Par ailleurs, l'effet des intégrines sur l'activation des RTK est toujours considérablement plus faible que celui qui est observé en réponse au facteur de croissance. Le rôle physiologique de ce phénomène pourrait donc être relativement limité.

... et coopèrent à différents niveaux de la signalisation intracellulaire des RTK

La régulation de la croissance ou de la différenciation cellulaires fait intervenir des protéines dont l'activation dépend à la fois des facteurs de croissance et de l'adhérence à la matrice extracellulaire [1, 22, 23]. Il est admis qu'un niveau minimal d'activité intracellulaire doit être atteint en réponse à un stimulus pour que le signal soit efficace (c'est la notion de « seuil »). Cela ne pourrait être réalisé que grâce à l'action concertée de la matrice extracellulaire et des facteurs de croissance. Un effet synergique a effectivement été observé lorsque les réponses combinées des RTK et des intégrines ont été étudiées, notamment pour l'activation des petites GTPases de la famille Rho, des MAP-kinases, de la PI 3-kinase, et de la phospholipase C γ .

Par exemple, dans la plupart des cellules, l'activation des MAP-kinases par les facteurs de croissance dépend strictement de l'adhérence cellulaire [14, 24, 25]. Les deux études qui ont étudié le mécanisme de la coopération s'accordent sur le fait que l'activation de Ras par les facteurs de croissance n'est pas affectée par l'adhérence. En revanche, elles sont en désaccord pour

désigner la cible de la régulation par les intégrines. Pour l'une, l'inactivation des intégrines interrompt la transmission du signal au niveau de Raf [25] alors que pour l'autre c'est au niveau de la MAP-kinase kinase que tout se joue [24].

Généralement, les intégrines et les RTK contribuent de façon équivalente à l'activation d'une voie de signalisation, mais la convergence peut s'opérer par des mécanismes distincts. Cela est joliment illustré par l'exemple de l'hydrolyse des phosphatidylinositols, dont l'activation par le PDGF est accrue par l'adhérence des cellules à la fibronectine (figure 3). Après liaison du PDGF, le récepteur phosphorylé sur tyrosine recrute la phospholipase C γ , phosphoryle la protéine et stimule son activité enzymatique. Les intégrines de leur côté stimulent la phosphatidylinositol 5-kinase, ce qui augmente la synthèse de phosphatidylinositol bisphosphate qui est le substrat de la phospholipase C γ . Dans cet exemple, le RTK active l'enzyme et les intégrines fournissent le substrat, l'activation concomitante des deux signaux permettant d'obtenir l'effet optimal [26].

Le cas de la petite GTPase Rac est un peu différent. Rac est une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et de la prolifération. Elle est activée par les RTK et recrutée du compartiment cytosolique vers la membrane plasmique. Ce recrutement dépend de l'adhérence: dans

des cellules mises en suspension, la translocation n'a pas lieu et de fait, l'adhérence semble contrôler des sites d'interaction membranaires pour Rac [27]. Ce n'est que lorsque Rac est à la membrane qu'elle peut activer son effecteur PAK. Dans les cellules en suspension stimulées par un facteur de croissance, Rac est donc active, mais elle reste dans le cytosol, n'interagit pas avec PAK, et n'induit pas de signal intracellulaire (figure 4).

Conclusions

Les cellules utilisent un nombre relativement restreint de voies de signalisation intracellulaires pour assurer leur progression dans le cycle cellulaire ou leur survie. En revanche, il existe une pléthore de facteurs extérieurs qui agissent sur ces voies de signalisation, souvent de façon concomitante. La réponse finale d'une cellule dépendra donc à la fois du type de matrice extracellulaire, de l'intégrine engagée, et des facteurs de croissance environnants. Ainsi, l'angiogenèse stimulée par le FGF (*fibroblast growth factor*) *in vivo* dépend de l'activation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ alors qu'elle dépend des intégrines $\alpha_5\beta_1$ lorsqu'elle est stimulée par le VEGF [28].

Les intégrines et les facteurs de croissance jouent un rôle fondamental dans la régulation de la prolifération cellulaire et ont souvent été impliqués dans des pathologies liées à une proli-

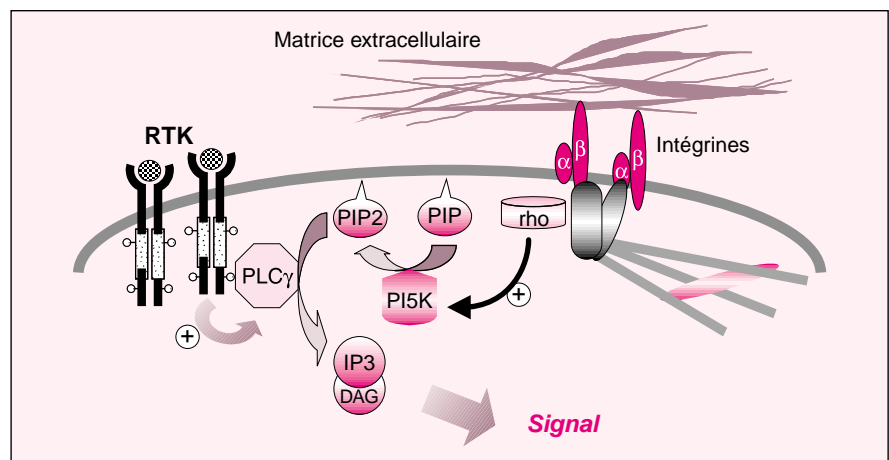


Figure 3. **Coopération entre les intégrines et les RTK pour l'activation de la PLC γ .** Les intégrines stimulent la phosphatidylinositol 5-kinase (PI5K), ce qui augmente la synthèse de phosphatidylinositol bisphosphate (PIP2), substrat de la phospholipase C γ qui est elle-même activée par certains RTK.

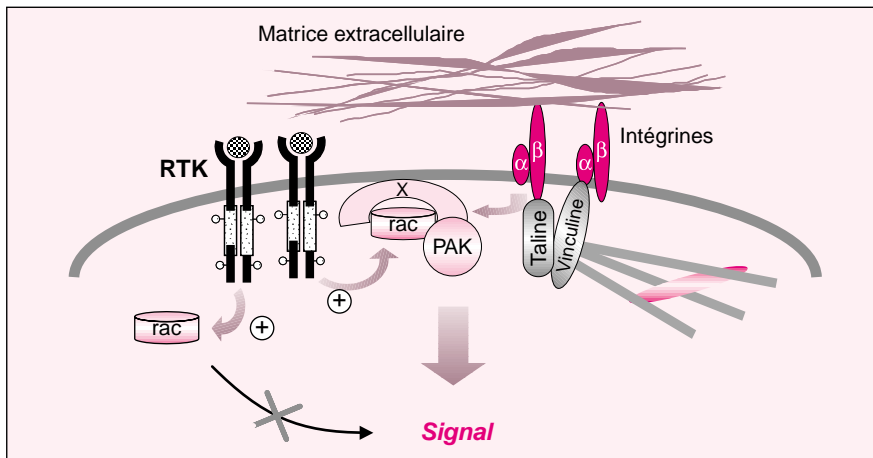


Figure 4. **Effet permissif des intégrines sur l'activation des voies de signalisation dépendant de la GTPase Rac par les facteurs de croissance.** Le recrutement de la protéine Rac - activée par les RTK - du cytosol vers la membrane plasmique est une condition nécessaire à l'activation de sa voie de signalisation et dépend de l'adhérence des cellules.

fération anormale. Nul doute donc que l'élucidation des mécanismes de coopération contribuera de façon effective à une meilleure compréhension de processus pathologiques comme la transformation cellulaire ■

Remerciements

Nous souhaitons remercier le Dr Nancy Cattani pour les précieux conseils apportés lors de l'élaboration du manuscrit.

RÉFÉRENCES

- Meredith JE Jr., Winitz S, Lewis JM, *et al.* The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocrinol Rev* 1996; 17: 207-20.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103: 211-25.
- Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 549-99.
- Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, *et al.* Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 1995; 131: 791-805.
- Schlaepfer DD, Hunter T. Integrin signaling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol* 1998; 8: 151-7.
- Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 1996; 87: 733-43.
- Ridley A. Rho GTPases. Integrating integrin signaling. *J Cell Biol* 2000; 150: F107-9.
- Schwartz MA, Shattil SJ. Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 388-91.
- Jones PL, Crack J, Rabinovitch M. Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha v beta 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J Cell Biol* 1997; 139: 279-93.
- Schneller M, Vuori K, Ruoslahti E. alpha-v beta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J* 1997; 16: 5600-7.
- Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. Role of alphav beta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J* 1999; 18: 882-92.
- Danilkovitch A, Skeel A, Leonard EJ. Macrophage stimulating protein-induced epithelial cell adhesion is mediated by a PI 3-K-dependent, but FAK-independent mechanism. *Exp Cell Res* 1999; 248: 575-82.
- Cybulsky AV, McTavish AJ, Cyr MD. Extracellular matrix modulates epidermal growth factor receptor activation in rat glomerular epithelial cells. *J Clin Invest* 1994; 94: 68-78.
- Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 1996; 135: 1633-42.
- Guilherme A, Torres K, Czech MP. Cross-talk between insulin receptor and integrin alpha5 beta1 signaling pathways. *J Biol Chem* 1998; 273: 22899-903.
- Danilkovitch MA, Angeloni D, Skeel A, Donley S, Lerman M, Leonard EJ. Integrin-mediated RON growth factor receptor phosphorylation requires tyrosine kinase activity of both the receptor and c-Src. *J Biol Chem* 2000; 275: 14783-6.
- Vuori K, Ruoslahti E. Association of insulin receptor substrate-1 with integrins. *Science* 1994; 266: 1576-8.
- Lebrun P, Mothe I, Delahaye L, Van Obberghen E, Baron V. Insulin receptor substrate-1 as a signaling molecule for focal adhesion kinase pp125FAK and pp60Src. *J Biol Chem* 1998; 273: 32244-53.
- Sundberg C, Rubin K. Stimulation of beta1 integrins on fibroblasts induces PDGF independent tyrosine phosphorylation of PDGF beta-receptors. *J Cell Biol* 1996; 132: 741-52.
- Wang R, Kobayashi R, Bishop JM. Cellular adherence elicits ligand-independent activation of the Met cell-surface receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8425-30.
- Moro L, Venturino M, Bozzo C, *et al.* Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J* 1998; 17: 6622-32.
- Howe A, Aplin AE, Alahari SK, Juliano RL. Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 220-31.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285: 1028-32.
- Renshaw MW, Ren XD, Schwartz MA. Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *EMBO J* 1997; 16: 5592-9.
- Lin TH, Chen Q, Howe A, Juliano RL. Cell anchorage permits efficient signal transduction between ras and its downstream kinases. *J Biol Chem* 1997; 272: 8849-52.
- McNamee HP, Ingber DE, Schwartz MA. Adhesion to fibronectin stimulates inositol lipid synthesis and enhances PDGF-induced inositol lipid breakdown. *J Cell Biol* 1993; 121: 673-8.
- Del Pozo MA, Price LS, Alderson NB, Ren XD, Schwartz MA. Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J* 2000; 19: 2008-14.
- Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 1995; 270: 1500-2.

TIRÉS À PART

V. Baron.

**Véronique Baron
Patricia Lebrun**

Inserm U. 145/IFR50, Faculté de médecine, avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 02, France.