

## Les récepteurs à dépendance *DCC* et *UNC5H* : rôle de l'apoptose dans le contrôle de la tumorigenèse

par Patrick Mehlen & David Goldschneider

Centre Léon Bérard, Apoptose, Cancer et Développement, Laboratoire labellisé « La Ligue »,  
CNRS FRE2870, 69008 Lyon.

Correspondance : Patrick Mehlen, CNRS FRE 2870, Centre Léon Bérard, 28, rue Laennec, 69008 Lyon, France.  
Fax : 04 78 78 28 87. E-mail : mehlen@lyon.fnclcc.fr

Reçu le 31 août 2005

### RÉSUMÉ

Des études récentes ont mis en relief un nouvel aspect des récepteurs cellulaires. L'interaction ligand-récepteur était jusqu'à présent considérée comme indispensable pour permettre l'activation du récepteur. Il a cependant été suggéré que certains de ces récepteurs, appelés « récepteurs à dépendance », peuvent également être activés en l'absence de ligand et induire un signal spécifique de mort cellulaire. Par conséquent, l'expression d'un ou plusieurs de ces récepteurs rend les cellules dépendantes de la présence du ligand pour leur survie. Nous avons émis l'hypothèse que ce mécanisme permet d'inhiber la croissance tumorale en conduisant à l'apoptose les cellules « anormales » qui, en l'absence de ligand, seraient normalement amenées à proliférer – croissance cellulaire locale ou prolifération à distance du site tumoral. Dans le même ordre d'idée, au début des années 90, le groupe de Vogelstein a suggéré qu'un gène, le gène *DCC* (pour “*deleted in colorectal can-*

*cer*”), pourrait jouer un rôle de suppresseur de tumeur car il était retrouvé délété dans plus de 70 % des cancers colorectaux et de nombreux autres cancers. Les données recueillies au cours des quinze dernières années n'ont pas permis d'apaiser la controverse concernant l'implication du gène *DCC* dans la suppression tumorale. Toutefois, notre équipe a pu montrer que *DCC* agit comme un récepteur à dépendance qui induit la mort de la cellule lorsque son ligand, la nétrine-1, est absent, et que des souris modifiées pour surexprimer la nétrine-1 et bloquer ainsi l'apoptose induite par le gène *DCC* étaient prédisposées au développement de cancers colorectaux. Ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle les récepteurs à dépendance auraient un rôle de suppresseurs de tumeurs. La présente revue décrit le rôle de l'interaction nétrine-1/récepteur comme nouveau mécanisme de contrôle du développement tumoral.

### SUMMARY Dependence receptors: role of apoptosis in the control of tumorigenesis

Recent studies have led a different view about membrane receptors. While a receptor used to be considered as inactive until bound by its ligand, it has been proposed that some receptors may also be active in the absence of their ligand. These so-called dependence receptors induce a specific death signal when the ligand is absent from the cell. Therefore, the expression of one of these receptors drives the cell to become dependent on the presence of the ligand for its survival. We have hypothesized that this mechanism allows inhibition of tumor growth, by inducing apoptosis of “abnormal” cells that would usually grow when ligand are unavailable – *i.e.*, during local growth of tumor cells or growth beyond primary tumor site –. Along this line, back in the early 90s, Vogelstein and colleagues suggested that a gene cal-

led *DCC* (for “*deleted in colorectal cancer*”) could be a tumor suppressor gene because it was found to be deleted in more than 70 % of colorectal cancers, as well as in many other cancers. During the last fifteen years, controversial data have failed to firmly establish whether *DCC* is indeed a tumor suppressor gene. However, our observation that *DCC* behaves as a dependence receptor that induces cell death unless its ligand netrin-1 is present, together with the fact that mice engineered to block *DCC*-induced cell death by overexpressing netrin-1 are predisposed to develop colorectal tumors, strengthen the role of dependence receptors as tumor suppressors. In this review, we will describe the implication of the netrin-1/receptor pairs as novel negative regulators of tumor development.

L'hypothèse généralement admise veut qu'un récepteur ne devient actif qu'après liaison et stimulation par son ligand. Au cours des dix dernières années, cependant, des travaux ont suggéré l'existence d'une dualité fonctionnelle, de type Dr Jeekyll et Mr Hyde, au niveau

de certains récepteurs capables de transduire deux signaux complètement différents : en présence de leur ligand, ils transduisent un signal positif de différenciation, prolifération ou migration cellulaire ; à l'inverse, en l'absence de ligand, ils deviennent des armes redou-

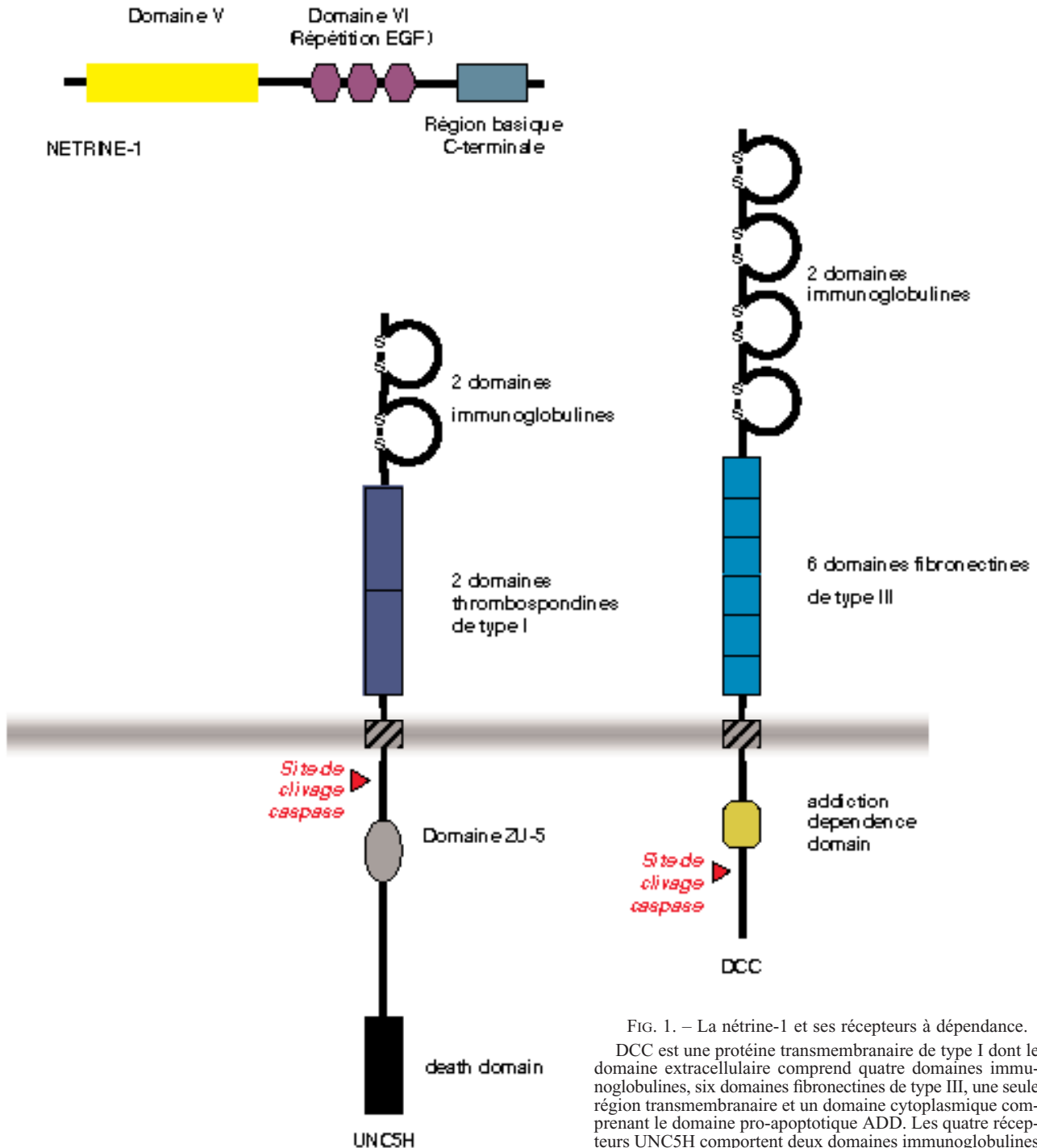


FIG. 1. – La nétrine-1 et ses récepteurs à dépendance.

DCC est une protéine transmembranaire de type I dont le domaine extracellulaire comprend quatre domaines immunoglobulines, six domaines fibronectines de type III, une seule région transmembranaire et un domaine cytoplasmique comprenant le domaine pro-apoptotique ADD. Les quatre récepteurs UNC5H comportent deux domaines immunoglobulines et deux domaines thrombospondines dans leur région extracellulaire, et un domaine ZU-5 (homologue aux protéines Zona Occlusens-1 et UNC5). Leur ligand, la nétrine-1, est une protéine sécrétée apparentée à la laminine et constituée de deux domaines (V et VI) homologues aux domaines des lamines et d'un domaine C-terminal chargé positivement.

tables conduisant les cellules au suicide. Ainsi, les cellules exprimant ces protéines se retrouvent dans un état de dépendance vis-à-vis du ligand pour leur survie.

Un nombre de plus en plus important de ces récepteurs à dépendance ont été identifiés : le récepteur de faible affinité aux neutrophines P75<sup>NTR</sup> (Rabizadeh *et al.*, 1993), le récepteur aux androgènes AR (Ellerby *et al.*, 1999), *DCC* (Mehlen *et al.*, 1998), RET (pour "REarranged during Transfection") (Bordeaux *et al.*, 2000), les récepteurs UNC5H (Llambi *et al.*, 2001), Patched (Thibert *et al.*, 2003), la néogénine (Matsunaga *et al.*, 2004), et les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_5\beta_1$  (Stupack *et al.*, 2001). De manière intéressante, alors que ces récepteurs sont connus pour leur rôle dans le développement du système nerveux lorsqu'ils sont activés par leur ligand, ils ont tous la capacité de déclencher la mort cellulaire par apoptose en l'absence du ligand. Nous nous intéresserons ici particulièrement à certains récepteurs dont l'étude a déjà fait l'objet de nombreux travaux : les récepteurs à dépendance qui fixent la nétrine-1. La nétrine-1, molécule de guidage axonal apparentée à la laminine, a été initialement décrite comme une protéine diffusible produite par les cellules de la ligne médiane ventrale du système nerveux central (aussi appelée plaque du plancher) attirant les axones commissuraux (Serafini *et al.*, 1994). Elle appartient à une famille de molécules homologues comprenant également la nétrine-2, la nétrine-3, la nétrine-G1, la nétrine-G2 et la nétrine-4/ $\beta$  nétrine. Si ces dernières molécules sont encore peu connues, la nétrine-1 a, pour sa part, fait l'objet de nombreux travaux, en particulier par le groupe de Tessier-Lavigne. Ces chercheurs ont montré, par exemple, que la nétrine-1 est une molécule d'orientation grâce à son effet à la fois chimio-attractif et chimio-répulsif pour de nombreux types d'axones et de neurones. On suppose que cet effet s'exerce par l'intermédiaire de deux familles principales de récepteurs transmembranaires de type 1 : le récepteur *DCC* (pour "*Deleted in Colorectal Cancer*") et son homologue la néogénine, et les récepteurs de type UNC5H (homologues de UNC5), UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3 et UNC5H4 (Fig. 1). L'implication de la nétrine-1 et de ses récepteurs dans le contrôle du guidage neuronal ayant déjà fait l'objet de plusieurs études (Mehlen & Fearon, 2004; Mehlen & Furne, 2005; Tessier-Lavigne & Goodman, 1996), nous nous intéresserons ici essentiellement au rôle de ces molécules dans l'apoptose et à leur dysfonctionnement dans le contexte pathologique de l'échappement tumoral.

## **DCC ET UNC5H COMME RÉCEPTEURS À DÉPENDANCE**

Le rôle de *DCC* et UNC5H, deux récepteurs de la nétrine-1 connue pour son implication dans le guidage axonal et la migration neuronale, suggère que la transduction du signal est fonction de la présence du ligand. Toutefois, nous avons montré, de même que d'autres équipes, que les récepteurs *DCC* et UNC5H obéissaient

à un mécanisme beaucoup plus complexe. Nous avons en effet suggéré que ces molécules agissent comme des récepteurs à dépendance, actifs même en l'absence de ligand. Des études de transfection cellulaire ou d'infection virale ont permis de mettre en évidence que l'expression de ces récepteurs *DCC* et UNC5H en l'absence de nétrine-1 permet d'induire la mort de la cellule, tandis que la présence de nétrine-1 suffit à bloquer cette activité pro-apoptotique (Mehlen *et al.*, 1998; Forcet *et al.*, 2001; Llambi *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Tanikawa *et al.*, 2003; Thiebault *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2003).

Le mécanisme contrôlant l'activité pro-apoptotique des récepteurs *DCC* et UNC5H reste mal connu. Cependant, ces protéines semblent toutes deux être clivées par des protéases majeures de la voie de l'apoptose, les caspases. Ces protéases, caractérisées par la présence d'une cystéine qui coupe la chaîne peptidique des protéines intracellulaires du côté C-terminal d'un résidu aspartate, sont de deux types : les caspases initiateuses (caspase-8 et -9) et les caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7). L'activation des caspases initiateuses peut être déclenchée par deux voies de signalisation, l'une implique un récepteur de mort (caspase-8) et l'autre la voie mitochondriale (caspase-9). Cette activation déclenche une cascade protéolytique qui conduit à l'activation des caspases effectrices, déclenchant rapidement l'apoptose et provoquant finalement la mort de la cellule.

Les sites de clivage des récepteurs UNC5H et *DCC* sont reconnus *in vitro* par la caspase-3 (en position 412 pour UNC5H, 1290 pour *DCC*; Fig. 1), ce qui ne signifie pas nécessairement l'implication de la caspase-3 dans le clivage de ces récepteurs *in vivo* (Mehlen *et al.*, 1998; Llambi *et al.*, 2001). Des mutations ponctuelles du site de clivage empêchent l'activité pro-apoptotique des récepteurs UNC5H et *DCC*. Le clivage, en permettant la libération et l'exposition d'un domaine pro-apoptotique appelé ADD (pour "*Addiction Dependence Domain*") situé au niveau du domaine intracellulaire des récepteurs, constituerait ainsi un préalable indispensable à l'induction de la mort cellulaire.

Pour ce qui concerne le récepteur UNC5H, ce domaine ADD serait situé après le site de clivage de la caspase et engloberait un domaine de mort très similaire à celui d'autres protéines comme les récepteurs Fas et TNFR dont on admet généralement l'implication dans la voie de l'apoptose (Llambi *et al.*, 2001). Le mécanisme par lequel le domaine de mort du récepteur UNC5H induit l'apoptose reste à élucider; toutefois, il est probable que d'autres protéines porteuses d'un domaine de mort sont également impliquées. Ainsi, nous avons récemment mis en évidence une interaction entre UNC5H2 et une protéine sérine/thréonine kinase contenant un domaine de mort nommé DAPK (pour "*Death Associated Protein Kinase*"), et démontré que cette DAPK est indispensable au déclenchement de la mort cellulaire induite par UNC5H2 (Llambi *et al.*, 2005). Les récepteurs UNC5H possèdent également un autre domaine, lui aussi impliqué dans la mort cellulaire, le domaine ZU-5, homologue de Zona Occludens-1, une protéine de jonction intercellulaire

impliquée dans la transmission du signal. Une étude récente a permis de montrer que NRAGE, une protéine de la famille MAGE (pour "Melanoma Antigen") régulatrice de l'apoptose, était un partenaire spécifique de UNC5H1 et que leur interaction était responsable de l'activation de la voie apoptotique *via* la dégradation d'une protéine de survie XIAP (pour "X-linked Inhibitor of Apoptosis") ou l'activation de la voie JNK (pour "cJun N-term Kinase") (Williams *et al.*, 2003).

Dans le cas du récepteur *DCC*, le domaine ADD est situé en amont du site de clivage et serait exposé à la suite de modifications conformationnelles de la protéine dues à la délétion de son extrémité C-terminale par les caspases (Mehlen *et al.*, 1998). Il a été montré que le domaine de *DCC* ainsi exposé pouvait interagir avec la caspase 9 en l'absence de nétrine-1 (Mehlen *et al.*, 1998 ; Forcet *et al.*, 2001) ce qui déclencherait l'activation en cascade de caspases effectrices démontrée *in vitro* (Mehlen *et al.*, 1998), créant ainsi une boucle d'amplification entraînant l'accélération du clivage du récepteur et l'apoptose. D'autres protéines ont également été signalées pour leurs interactions avec le domaine ADD du récepteur *DCC*. Le groupe de Chen, par exemple, a décrit la protéine DIP13 (pour '*DCC-Interacting Protein-13*') qui interagit avec l'ADD et déclenche l'activité pro-apoptotique de *DCC* (Liu *et al.*, 2002).

Les résultats obtenus *in vivo* dans un modèle de souris invalidées pour la nétrine-1 ont permis de confirmer que les cellules exprimant *DCC* et *UNC5H* sont dépendantes de la nétrine-1 pour leur survie. En effet, l'ab-

sence de nétrine-1 entraîne une apoptose massive des cellules du tronc cérébral, en particulier de celles qui expriment les gènes *DCC* et/ou *UNC5H* (Llambi *et al.*, 2001). Dans le même ordre d'idée, pour étudier l'implication de *UNC5H* dans le guidage axonal sur les neurones de Xenope, le groupe de Tessier-Lavigne a dû avoir recours à un mutant *UNC5H* délété de son domaine de mort car l'expression du récepteur sauvage induisait la mort des neurones (Hong *et al.*, 1999).

Les conséquences physiologiques de cette activité « négative » des récepteurs *DCC* et *UNC5H* en absence de nétrine-1 sont de deux ordres : alors qu'ils agissent positivement sur le guidage axonal grâce à leur rôle de récepteur pour la nétrine-1, *DCC* et *UNC5H* peuvent également exercer un contrôle négatif en entraînant la mort cellulaire. Ainsi, la régulation du mouvement des axones au cours du développement du système nerveux central pourrait résulter de la conjugaison de deux mécanismes de contrôle, l'un négatif et l'autre positif. L'effet négatif serait un mécanisme de « surveillance » chargé d'éliminer les cellules qui s'éloigneraient de la source de ligand. Dans le cas des cellules du système nerveux, la croissance et l'orientation des neurones seraient régulaées par un mécanisme de chimio-attraction/chimio-répulsion (selon le récepteur exprimé à la surface cellulaire) par rapport à la source de nétrine-1. Cependant ajouté à cet effet « positif », lorsque les neurones s'éloignent de la source de nétrine-1, les récepteurs inactivés induisent l'apoptose, empêchant ainsi toute migration des cellules vers des sites « interdits ». Cet effet « néga-

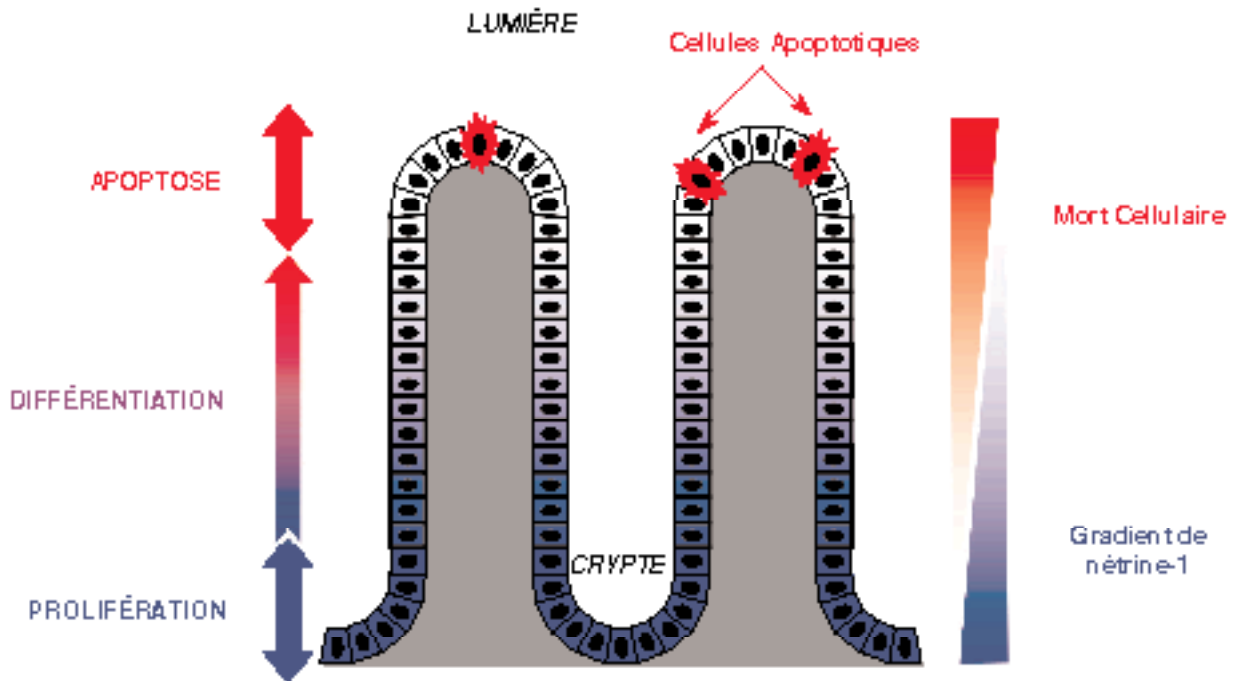


FIG. 2. – Schéma des villosités intestinales normales.

Les cellules prolifèrent à partir du bas de chaque villosité, au niveau des cryptes, puis migrent tout en se différenciant vers la surface (côté lumière intestinale) où elles sont éliminées. L'expression de la nétrine-1 est plus forte au niveau des cryptes mais celle de son récepteur *DCC* est uniforme le long des villosités. La fixation de la nétrine-1 sur *DCC* au niveau des cellules des cryptes contribue à la survie des cellules alors que l'absence de nétrine-1 à la surface des villosités conduit à la mort des cellules par apoptose.

tif» définirait alors par défaut des territoires de migration autorisée.

Une étude récente sur les cellules des villosités intestinales a montré que ces récepteurs pouvaient également agir *in vivo* sur le contrôle de la durée de vie des cellules non nerveuses. En effet, les profils d'expression de la nétrine-1 et du récepteur *DCC* dans l'intestin et le côlon normaux évoquent un rôle régulateur du couple *DCC*/nétrine-1 sur la survie cellulaire. Dans ces tissus, la nétrine-1 est localisée uniquement à la base de la crypte intestinale tandis que *DCC* est présent sur toute la villosité (Hsu *et al.*, 2001 ; Mazelin *et al.*, 2004). Ceci correspond parfaitement au schéma classique selon lequel les cellules en phase de prolifération rapide sont localisées à la base de la crypte intestinale, puis elles migrent vers le sommet de la villosité et finalement se détachent et meurent, ou meurent et se détachent (Fig. 2). Dans la crypte, les cellules en prolifération exprimant *DCC* dans un environnement riche en nétrine-1 seraient préservées de l'apoptose, tandis que les cellules de l'épithélium ayant cessé de proliférer pour se différencier et migrer vers le sommet de la villosité seraient progressivement placées dans un environnement dépourvu de nétrine-1 et conduites à l'apoptose (Fig. 2). Nous avons montré, par exemple, qu'une surexpression de la nétrine-1 dans tout l'épithélium intestinal permettait de réduire l'apoptose de plus de 50 % (Mazelin *et al.*, 2004). Le gradient apparent de concentration de la nétrine-1 serait donc un mécanisme régulateur capable de limiter la durée de vie des cellules lorsque celles-ci ont été soumises *i*) à de trop nombreux cycles de prolifération au niveau de la crypte ou *ii*) à des agressions mécaniques ou chimiques répétées de la lumière intestinale. Dans les deux cas, le risque de dommage et de comportement aberrant de la cellule est accru. L'induction de l'apoptose par absence d'expression de la nétrine-1 dans la partie apicale des villosités, de même que le détachement des cellules dans l'espace extracellulaire, permettraient ainsi de limiter le déclenchement de la transformation maligne.

## LES RÉCEPTEURS À DÉPENDANCE UNC5H ET *DCC* DANS LA TUMORIGÈNE

Le mécanisme de dépendance décrit ci-dessus pourrait expliquer le rôle essentiel joué par les récepteurs *DCC* et *UNC5H* dans la suppression des tumeurs. Toute cellule tumorale confrontée à un environnement inapproprié ou anormal (cellule en prolifération soumise à des concentrations limitées ou constantes en nétrine-1, ou cellule métastatique en migration vers d'autres tissus) se retrouverait isolée de son ligand, ce qui déclencherait l'activité pro-apoptotique de *DCC* et/ou de *UNC5H*, conduisant à la mort de la cellule et donc à la régression tumorale. Dans le contexte du cancer, une délétion des gènes codant pour *DCC* et *UNC5H* conduirait à la perte du signal pro-apoptotique, conférant ainsi un avantage sélectif favorisant l'échappement tumoral.

Ainsi, le gène *DCC* a été décrit dans les années 90 comme un suppresseur de tumeur potentiel. En effet, plusieurs études ont révélé une perte d'allèle de *DCC* sur le chromosome 18q dans 70 % des cancers colorectaux ainsi que dans plusieurs autres tumeurs (Cho *et al.*, 1994 ; Fearon *et al.*, 1990). La plupart des études ont également montré que la perte d'allèle du 18q était rare dans les tumeurs de bas grade (*e.g.* petits adénomes) mais fréquente dans les cancers colorectaux primitifs, et présente dans la totalité des métastases hépatiques de cancer colorectal. La perte d'hétérozygotie du chromosome 18q dans cette pathologie serait donc plus spécifiquement responsable de la progression tumorale que de l'initiation de la prolifération. Dans plus de 90 % des cancers colorectaux primitifs présentant une perte d'hétérozygotie du chromosome 18q, le gène *DCC* est situé dans la région délétée (Fearon *et al.*, 1990 ; Thiagalingam *et al.*, 1996). La plupart des travaux ont établi un lien entre cette délétion du 18q dans les tumeurs colorectales et l'expression réduite de *DCC* au niveau de l'ARN (Thiagalingam *et al.*, 1996) ou de la protéine (Goi *et al.*, 1998). De même, une perte d'hétérozygotie du chromosome 18q et/ou une expression réduite de *DCC* ont également été rapportées dans plusieurs autres types tumoraux tels que les cancers de l'estomac, de la prostate, de l'endomètre, des ovaires, de l'œsophage, du sein ou du testicule, les gliomes, les neuroblastomes et les cancers hématologiques (pour revue, Mehlen & Fearon, 2004).

La perte d'hétérozygotie du chromosome 18q est un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer colorectal ne présentant pas d'atteinte ganglionnaire ni de métastases à distance (stade II), ou chez les patients avec atteinte ganglionnaire mais sans métastase (stade III) au moment de l'exérèse chirurgicale (Jen *et al.*, 1994 ; Ogunbiyi *et al.*, 1998). D'autres études ont montré que cette délétion du 18q s'accompagnait d'une inhibition de la réponse au traitement adjuvant par le 5-fluorouracil chez les patients porteurs de cancers colorectaux de stade III (Watanabe *et al.*, 2001 ; Barratt *et al.*, 2002). La perte d'expression de *DCC* a par ailleurs fréquemment été associée à un mauvais pronostic et un risque accru de métastase (Shibata *et al.*, 1996 ; Saito *et al.*, 1999). Ce lien entre perte d'hétérozygotie du 18q, expression réduite de *DCC*, mauvais pronostic et inhibition de la réponse à la chimiothérapie adjuvante est potentiellement intéressant au plan clinique. Cependant, les résultats obtenus ne permettent pas d'établir avec certitude si la perte ou l'inactivation de *DCC* est un événement central dans la transformation maligne ou simplement un épiphénomène. Un certain nombre d'éléments tendent à prouver que l'inactivation de *DCC* serait associée à la croissance tumorale dans les cancers colorectaux. Par exemple, l'introduction d'une copie normale du chromosome 18 dans une lignée de cancer colorectal n'exprimant pas le gène *DCC* a permis d'obtenir des taux détectables de copies de la protéine, aboutissant à l'inhibition de la croissance cellulaire en agar et de la transformation maligne *in vivo* chez la souris nude (Tanaka *et al.*, 1991). De la même manière, l'expression ectopique du gène dans une lignée tumorigénique de

kératinocytes n'exprimant pas *DCC* de manière endogène supprime la croissance tumorale chez la souris *nude* (Klingelhutz *et al.*, 1993). De façon intéressante, cette étude a montré que l'inhibition du pouvoir tumorigène était associée à une perte d'expression de *DCC* et une perte ou un réarrangement du vecteur d'expression de *DCC* (Klingelhutz *et al.*, 1993). D'autres études ont montré par la suite que la restauration de l'expression de *DCC* permettait de supprimer la croissance tumorale *in vitro* ou *in vivo* dans le modèle de la souris *nude* (Velcich *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 2000). Plus récemment, des travaux intéressants ont démontré le rôle de l'association *DCC*/nétrine-1 dans le développement tumoral des cellules endométriales, et ceci pour plusieurs raisons : *i*) le gène *DCC* est délété dans la quasi totalité des lignées cellulaires de cancer de l'endomètre et *ii*) la réexpression du gène dans ces cellules induit l'apoptose, un phénomène que permet de bloquer l'addition de nétrine-1 (Kato *et al.*, 2004). Certaines observations, comme le faible nombre de mutations ponctuelles identifiées dans les séquences codantes du gène, l'absence de mutations germinales à potentiel oncogénique héréditaire ou l'absence de phénotype de prédisposition au cancer chez les souris hétérozygotes pour les mutations inactivatrices de *DCC*, ainsi que la présence d'autres gènes suppresseurs de tumeur connus ou potentiels sur le chromosome 18q, obligent cependant à s'interroger sur le rôle exact du gène *DCC* dans la tumorigénèse. Toutefois, aucun de ces arguments ne semble suffisamment convaincant pour permettre de rejeter l'hypothèse que *DCC* agit comme un gène suppresseur de tumeur. Cette question a fait l'objet d'une autre publication (Mehlen & Fearon, 2004).

De plus, de manière intéressante, nous avons observé que dans plus de 90 % des tumeurs colorectales, mais aussi dans de nombreuses autres tumeurs, l'expression de UNC5H est, elle aussi, fortement réduite, cette baisse d'expression étant essentiellement attribuée à UNC5H1 et UNC5H3 dans les cancers colorectaux (Thiebault *et al.*, 2003). Des pertes d'allèles ont été observées mais on est tenté d'attribuer la baisse d'expression de UNC5H à des phénomènes épigénétiques comme la méthylation des promoteurs (Thiebault *et al.*, 2003). Il a par ailleurs été montré que UNC5H2 est une cible transcriptionnelle du gène suppresseur de tumeur *p53* qui induit l'apoptose *via* l'induction de l'expression de UNC5H2 et est inhibé en présence de nétrine-1 (Tanikawa *et al.*, 2003). De plus, plusieurs études *in vitro* ont montré que l'expression de *DCC* et UNC5H inhibait les manifestations classiques de la transformation cellulaire : croissance indépendante du support et capacité à migrer à travers une matrice de matrigel (Mehlen & Fearon, 2004; Thiebault *et al.*, 2003).

Afin d'éviter les biais liés à l'utilisation de stratégies classiques d'inactivation (knock-out) qui inactivent aussi bien les voies positives (signal nétrine-1 dépendant) et négative (apoptose en absence de nétrine-1), nous avons développé une méthode alternative permettant d'évaluer le rôle des récepteurs *DCC* et UNC5H dans la transformation maligne. Il existe en théorie deux mécanismes permettant aux récepteurs à dépendance de provoquer l'apparition de cancer : soit les récepteurs sont inactivés

ou délétés, de telle sorte que la mort de la cellule n'est plus induite en cas de raréfaction ou d'absence du ligand, soit le ligand est présent en trop grande quantité ou au mauvais endroit, ce qui favorise la survie prolongée de la cellule.

Nous avons produit des souris surexprimant le ligand nétrine-1 dans leurs cellules épithéliales afin de prévenir l'apoptose induite par les récepteurs (Fig. 3). nous avons effectivement pu montrer que la surexpression de nétrine-1 ciblée dans tout le système digestif conduit à une inhibition de l'ordre de 50 % de la mort cellulaire dans l'épithélium intestinal (Mazelin *et al.*, 2004). En accord avec le modèle de régulation de la durée de vie des cellules *via* le contrôle par la nétrine-1 de la mort cellulaire induite par *DCC*, cette inhibition est associée à un développement significatif des hyperplasies focales et des adénomes (Mazelin *et al.*, 2004). Le blocage de l'apoptose induite par la surexpression de la nétrine-1 entraîne donc une accélération de la transformation maligne dans le cancer colorectal. La délétion du gène *DCC* étant souvent considérée chez l'homme comme un événement tardif, les souris surexprimant la nétrine-1 ont été croisées avec un modèle de souris chez lesquelles la transformation maligne est due à une mutation du gène APC (pour "Adenomatous Polyposis Coli") (Fodde *et al.*, 1994). Alors que les souris porteuses d'une mutation du gène APC ont des adénomes de bas grade, les souris APC/nétrine-1 développent des tumeurs de grade plus élevé allant jusqu'au stade d'adénocarcinomes (Mazelin *et al.*, 2004) (Fig. 3B). Ces résultats démontrent que le blocage de l'apoptose induite par la surexpression de la nétrine-1 entraîne à la fois le déclenchement de la tumorigénèse et sa progression (Mazelin *et al.*, 2004), confirmant le rôle des récepteurs à dépendance dans la tumorigénèse colorectale.

Plusieurs questions essentielles restent sans réponse. Premièrement, quel est le récepteur impliqué, *DCC* ou UNC5H1-3 ? Les protéines UNC5H et *DCC* apparaissent dans des endroits différents de la villosité intestinale : UNC5H2 et *DCC* semblent présentes sur toute la villosité, tandis que UNC5H3 est localisée uniquement au niveau de la crypte (Mazelin *et al.*, 2004). Si l'on tient compte également du fait que la surexpression de la nétrine-1 dans le modèle murin décrit plus haut présente deux pics d'activité – l'un pendant la phase précoce de la transformation maligne, responsable de l'apparition d'adénomes et d'hyperplasies focales chez ces souris, l'autre plus tardif responsable de la formation d'adénocarcinomes chez les souris APC/nétrine-1 –, cela suggère que ces récepteurs à dépendance exercent des fonctions régulatrices à différents moments de la tumorigénèse dans le cancer colorectal. La deuxième question en suspens concerne l'expression de la nétrine-1 dans les tumeurs colorectales. En effet, aussi bien la perte d'expression du récepteur (*DCC* et/ou UNC5H) que le gain d'expression du ligand (nétrine-1) devrait conférer un avantage sélectif aux cellules tumorales. Des résultats préliminaires ont montré que la surexpression de la nétrine-1 était rarement associée à la survenue d'un cancer colorectal chez l'homme – 7 % des tumeurs analysées – (Mazelin *et al.*, 2004); le gain d'expression de la nétrine-1 ou la perte du

récepteur ne confèrent donc pas le même avantage sélectif. D'autres études seront nécessaires pour déterminer si cet effet concerne uniquement les cancers colorectaux ou si c'est un effet plus général. Des travaux complémentaires devraient également permettre de déterminer si l'effet observé sur les souris surexprimant la nétrine-1 est effec-

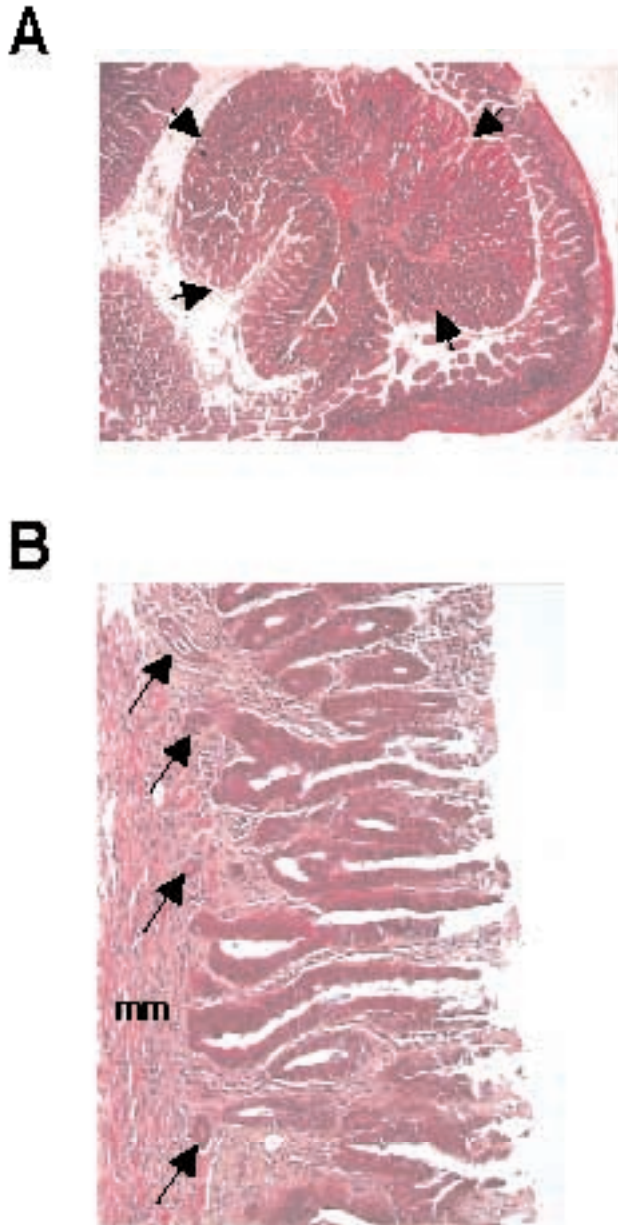


FIG. 3. – Surexpression de la nétrine-1 dans les villosités intestinales murines et prédisposition accrue au cancer.

Les souris surexprimant la nétrine-1 développent spontanément des adénomes (A); les mêmes souris recroisées avec des animaux porteurs d'une mutation du gène APC développent des adénocarcinomes (B).

Figures adaptées de Mazelin *et al.*, 2004.

Les flèches désignent en (A) les adénomes de bas grade, en (B) l'invasion tumorale. mm = muscularis mucosae.

tivement dû à l'inhibition de l'apoptose induite par le récepteur *DCC* – ou de l'apoptose induite par *UNC5H* – ou est lié au fait que la surexpression du ligand provoque une stimulation plus importante d'autres récepteurs putatifs de la nétrine-1 comme les intégrines ou le récepteur de l'adénosine A2b qui excercerait alors une activité positive sur le développement tumoral. De plus, une étude récente a suggéré que le récepteur *UNC5H2* pourrait être impliqué dans l'angiogenèse embryonnaire (Lu *et al.*, 2004). Il a également été rapporté que la nétrine-1 stimulait l'angiogenèse indépendamment de l'expression de *DCC/UNC5H* (Park *et al.*, 2004).

Cependant, l'ensemble des données présentées dans cette revue suggère fortement que les récepteurs de la nétrine-1, que sont *DCC* et *UNC5H*, sont impliqués dans le contrôle de la progression tumorale et peuvent à ce titre être considérés comme des suppresseurs de tumeurs, même si leur activité pro-apoptotique en présence de faibles concentrations en nétrine-1 diffère largement de celle des suppresseurs de tumeurs classiques tels que Rb responsable d'une inhibition constitutive du cycle cellulaire. *DCC* et *UNC5H* n'acquièrent leur activité suppressive que lorsque les cellules se développent anormalement ou migrent vers un territoire «non autorisé» à faible concentration en ligand. L'apoptose provoquée par les récepteurs à dépendance représente donc un nouveau paradigme dans l'élimination contrôlée des cellules malignes à distance des sites où le ligand est disponible. C'est pourquoi nous avons donné à ces récepteurs le nom de suppresseurs de tumeurs conditionnels. Il reste à déterminer si ces suppresseurs conditionnels ou leur voies de signalisation pro-apoptotique pourront constituer à l'avenir des cibles intéressantes pour le traitement des cancers.

**Remerciements.** – Les projets développés dans le laboratoire de P. MEHLEN ont été soutenus par la Ligue Contre le Cancer, le Centre National de la Recherche Scientifique, le Ministère de la Recherche et de la Technologie (ACT), l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), la Fondation de la Recherche Médicale (FRM), le National Institute of Health (NIH). DG est financé par une bourse de la Ligue contre le Cancer.

## BIBLIOGRAPHIE

- Barratt P. L., Seymour M. T., Stenning S. P., Georgiades I., Walker C., Birbeck K. & Quirke P., DNA markers predicting benefit from adjuvant fluorouracil in patients with colon cancer: a molecular study. *Lancet*, 2002, 360, 1381-1391.
- Bordeaux M. C., Forcet C., Granger L., Corset V., Bidaud C., Billaud M., Bredezen D. E., Edery P. & Mehlen P., The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *Embo J.*, 2000, 19, 4056-4063.
- Cho K. R., Oliner J. D., Simons J. W., Hedrick L., Fearon E. R., Preisinger A. C., Hedge P., Silverman G. A. & Vogelstein B., The *DCC* gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics*, 1994, 19, 525-531.
- Ellerby L. M., Hackam A. S., Propp S. S., Ellerby H. M., Rabizadeh S., Cashman N. R., Trifiro M. A., Pinsky L., Wellington C. L., Salvesen G. S., Hayden M. R. & Bredezen D. E., Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity. *J. Neurochem.*, 1999, 72, 185-195.
- Fearon E. R., Cho K. R., Nigro J. M., Kern S. E., Simons J. W., Ruppert J. M., Hamilton S. R., Preisinger A. C., Thomas G., Kinz-

- ler K. W. *et al.*, Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, 1990, 247, 49-56.
- Fodde R., Edelmann W., Yang K., van Leeuwen C., Carlson C., Renault B., Breukel C., Alt E., Lipkin M., Khan P. M. *et al.*, A targeted chain-termination mutation in the mouse *Apc* gene results in multiple intestinal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 8969-8973.
- Forcet C., Ye X., Granger L., Corset V., Shin H., Bredesen D. E. & Mehlen P., The dependence receptor *DCC* (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 3416-3421.
- Goi T., Yamaguchi A., Nakagawara G., Urano T., Shiku H. & Furukawa K., Reduced expression of deleted colorectal carcinoma (*DCC*) protein in established colon cancers. *Br. J. Cancer*, 1998, 77, 466-471.
- Hong K., Hinck L., Nishiyama M., Poo M. M., 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, 927-941.
- Hsu Y. H., Shaw C. K. & Chuong C. M., Immunohistochemical localization of deleted-in-colon-cancer (*DCC*) protein in human epithelial, neural, and neuro-endocrine tissues in paraffin sections with antigen retrieval. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 2001, 17, 351-357.
- Jen J., Kim H., Piantadosi S., Liu Z. F., Levitt R. C., Sistonen P., Kinzler K. W., Vogelstein B. & Hamilton S. R., Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 1994, 331, 213-221.
- Kato H., Zhou Y., Asanoma K., Kondo H., Yoshikawa Y., Watanabe K., Matsuda T., Wake N. & Barrett, J. C., Suppressed tumorigenicity of human endometrial cancer cells by the restored expression of the *DCC* gene. *Br. J. Cancer*, 2000, 82, 459-466.
- Kato H. D., Kondoh H., Inoue T., Asanoma K., Matsuda T., Arima T., Kato K., Yoshikawa T. & Wake N., Expression of *DCC* and netrin-1 in normal human endometrium and its implication in endometrial carcinogenesis. *Gynecol. Oncol.*, 2004, 95, 281-289.
- Klingelhutz A. J., Smith P. P., Garrett L. R. & McDougall J. K., Alteration of the *DCC* tumor-suppressor gene in tumorigenic HPV-18 immortalized human keratinocytes transformed by nitrosomethylurea. *Oncogene*, 1993, 8, 95-99.
- Liu J., Yao F., Wu R., Morgan M., Thorburn A., Finley R. L. Jr. & Chen Y. Q., Mediation of the *DCC* apoptotic signal by DIP13 alpha. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 26281-26285.
- Llambi F., Caseret F., Bloch-Gallego, E. & Mehlen P., Netrin-1 acts as a survival factor *via* its receptors *UNC5H* and *DCC*. *EMBO J.*, 2001, 20, 2715-2722.
- Llambi F., Calheiros F., Gozuacik D., Guix C., Pays L., Del Rio G., Kimchi A. & Mehlen P., The dependence receptor *UNC5H2* mediates apoptosis through DAP kinase. *EMBO J.*, 2005, in press.
- Lu X., Le Noble F., Yuan L., Jiang Q., De Lafarge B., Sugiyama D., Breant C., Claes F., De Smet F., Thomas J. L., Autiero M., Carmeliet P., Tessier-Lavigne M. & Eichmann A., The netrin receptor *UNC5B* mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature*, 2004, 432, 179-186.
- Matsunaga E., Tauszig-Delamasure S., Monnier P. P., Mueller B. K., Strittmatter S. M., Mehlen P. & Chedotal A., RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nat. Cell. Biol.*, 2004, 6, 749-755.
- Mazelin L., Bernet A., Bonod-Bidaud C., Pays L., Arnaud S., Gespach C., Bredesen D. E., Scoazec J. Y. & Mehlen P., Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature*, 2004, 431, 80-84.
- Mehlen P. & Fearon E. R., Role of the dependence receptor *DCC* in colorectal cancer pathogenesis. *J. Clin. Oncol.*, 2004, 22, 3420-3428.
- Mehlen P. & Furne C., Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, in press.
- Mehlen P. & Mazelin L., The dependence receptors *DCC* and *UNC5H* as a link between neuronal guidance and survival. *Biol. Cell.*, 2003, 95, 425-436.
- Mehlen P., Rabizadeh S., Snipas S. J., Assa-Munt N., Salvesen G. S. & Bredesen D. E., The *DCC* gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature*, 1998, 395, 801-804.
- Ogunbiyi O. A., Goodfellow P. J., Herfarth K., Gagliardi G., Swanson P. E., Birnbaum E. H., Read T. E., Fleshman J. W., Kodner I. J. & Moley J. F., Confirmation that chromosome 18q allelic loss in colon cancer is a prognostic indicator. *J. Clin. Oncol.*, 1998, 16, 427-433.
- Park K. W., Crouse D., Lee M., Karnik S. K., Sorensen L. K., Murphy K. J., Kuo C. J. & Li D. Y., The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 16210-16215.
- Rabizadeh S., Oh J., Zhong L. T., Yang J., Bitler C. M., Butcher L. L. & Bredesen D. E., Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science*, 1993, 261, 345-348.
- Saito M., Yamaguchi A., Goi T., Tsuchiyama T., Nakagawara G., Urano T., Shiku H. & Furukawa K., Expression of *DCC* protein in colorectal tumors and its relationship to tumor progression and metastasis. *Oncology*, 1999, 56, 134-141.
- Serafini T., Kennedy T. E., Galko M. J., Mirzayan C., Jessell T. M. & Tessier-Lavigne M., The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* *UNC-6*. *Cell*, 1994, 78, 409-424.
- Shibata D., Reale M. A., Lavin P., Silverman M., Fearon E. R., Steele G. Jr., Jessup J. M., Loda M. & Summerhayes I. C., The *DCC* protein and prognosis in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 1996, 335, 1727-1732.
- Stupack D. G., Puente X. S., Boutsaboualy S., Storgard C. M. & Cheshres D. A., Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J. Cell. Biol.*, 2001, 155, 459-470.
- Tanaka K., Oshimura, M., Kikuchi R., Seki M., Hayashi T. & Miyaki M., Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 5 or 18. *Nature*, 1991, 349, 340-342.
- Tanikawa, C., Matsuda K., Fukuda S., Nakamura Y. & Arakawa H., p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell. Biol.*, 2003, 5, 216-223.
- Tessier-Lavigne M. & Goodman C. S., The molecular biology of axon guidance. *Science*, 1996, 274, 1123-1133.
- Thiagalingam S., Lengauer C., Leach F. S., Schutte M., Hahn S. A., Overhauser J., Willson J. K., Markowitz S., Hamilton S. R., Kern S. E., Kinzler K. W. & Vogelstein B., Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat. Genet.*, 1996, 13, 343-346.
- Thibert C., Teillet M. A., Lapointe F., Mazelin L., Le Douarin N. M. & Mehlen P., Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science*, 2003, 301, 843-846.
- Thiebault K., Mazelin L., Pays L., Llambi F., Joly M. O., Saurin J. C., Scoazec J. Y., Romeo G. & Mehlen P., The netrin-1 receptors *UNC5H* are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 4173-4178.
- Velcich A., Corner G., Palumbo L. & Augenlicht L., Altered phenotype of HT29 colonic adenocarcinoma cells following expression of the *DCC* gene. *Oncogene*, 1999, 18, 2599-2606.
- Watanabe T., Wu T. T., Catalano P. J., Ueki T., Satriano R., Haller D. G., Benson A. B. 3<sup>rd</sup> & Hamilton S. R., Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344, 1196-1206.
- Williams M. E., Strickland P., Watanabe K. & Hinck L., *UNC5H1* induces apoptosis *via* its juxtamembrane domain through an interaction with NRAGE. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 17483-17490.