

La voie de signalisation Notch

Introduction

Comme la voie Wnt, la voie Notch est une voie de signalisation importante dans le développement des vertébrés et des invertébrés. Elle est impliquée dans l'embryogenèse et la morphogenèse et joue un rôle majeur dans l'orientation des cellules souches vers leur différenciation. La perte de fonction de certains de ses composants est rencontrée dans des pathologies héréditaires et leur surexpression dans certaines pathologies cancéreuses.

Brièvement, des messagers protéiques appelés DSL (*Delta, Serrate, Lag2*, du nom des ligands rencontrés respectivement chez les mammifères, la drosophile et

Caenorhabditis elegans) reconnaissent des récepteurs membranaires appelés NOTCH et les activent en provoquant leur clivage. Le produit de clivage peut alors migrer dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles en inhibant l'action de répresseurs.

Un des points notables de cette voie de signalisation est qu'elle agit entre cellules juxtaposées, ligands et récepteurs étant des protéines transmembranaires : la présentation d'un ligand à une cellule par une cellule voisine induit l'activation du récepteur de la première.

1. Les ligands DSL

Deux types de ligands DSL sont susceptibles de reconnaître les récepteurs NOTCH chez les mammifères : les ligands DLL (*Delta-like ligands*) et les ligands JAG (pour *Jagged*, un mot anglais signifiant « dentelé ») qui correspondent aux ligands *Serrate* de la drosophile. Ces ligands sont des protéines transmembranaires de type I (c'est à- dire ayant leur extrémité N-terminale du côté extracellulaire).

Ces ligands possèdent un domaine intracytoplasmique de petite taille, un domaine transmembranaire et des domaines extracellulaires caractéristiques : de dix à quatorze motifs EGF-like (*Epidermal growth factor*) répétés en tandem, un domaine DOS (*Delta and OSM-11-like proteins*), absent des ligands DLL3 et DLL4, et un domaine DSL. Les ligands DLL3 et DLL4, dépourvus de domaine DOS, agissent en présence d'un coligand DLK (*Delta-like protein homolog*) possédant un domaine DOS, des motifs EGF-like, mais pas de domaine DSL. La présence simultanée d'un domaine DOS et d'un domaine DSL semble indispensable à l'interaction ligandrécepteur, que le domaine DOS soit apporté directement par le ligand (cas de JAG1,

JAG2 et DLL1) ou par un coligand (cas de DLL3 et DLL4). La structure des ligands et coligands de la voie Notch est présentée figure 8-1.

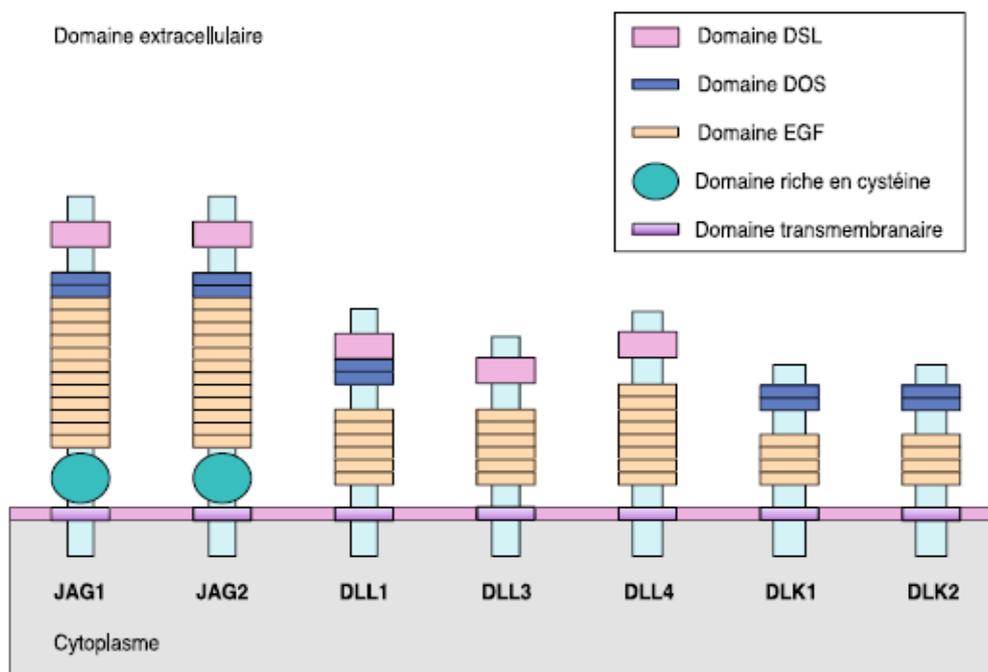


Fig. 1 – Les ligands DSL.

Les ligands DSL contiennent une série de domaines particuliers essentiels pour leur fonction : les domaines de reconnaissance DSL et DOS et les domaines *EGF-like* (au nombre de six à quatorze).

Les ligands JAG contiennent en outre un domaine riche en cystéine. Les ligands DLL3 et DLL4 n'ont pas de domaine DOS ; ils sont dépendants de la présence de coligands DLK1 et DLK2 qui possèdent un domaine DOS, mais n'ont pas de domaine DSL.

2. Les récepteurs NOTCH

Les ligands DSL sont reconnus par des récepteurs NOTCH (d'un autre mot anglais signifiant « dentelé ») ; il en existe quatre chez l'homme. Ce sont également des protéines à un seul domaine transmembranaire, de type I. Alors que chez la drosophile la séquence polypeptidique est continue et couvre les parties extra- et intracellulaires, les récepteurs sont, chez les mammifères, des hétérodimères obtenus, dans l'appareil de Golgi, par clivage post-traductionnel au niveau d'un site extracellulaire proche du domaine transmembranaire, suivi d'une réassociation par des liaisons non covalentes.

Les monomères constitutifs de l'hétérodimère portent le nom de NECD (*Notch extracellular domain*) et NTMIC (*Notch transmembrane and intracellular domain*). Les récepteurs NOTCH possèdent, dans leur partie extracellulaire, entre vingt-neuf et trente-six motifs homologues de la structure de l'EGF répétés en tandem. Ces motifs *EGF-like* contiennent des

sites d’*O*-glycosylation par des résidus fucose ou par des résidus glucose. Les motifs *EGF-like* sont suivis d’une séquence appelée NRR (*Negative regulatory region*) faite de trois motifs LNR (*Lin12 and Notch repeats*) et d’un domaine d’hétérodimérisation HD où se situe le site de clivage S1 mentionné ci-dessus, réalisé par une protéase appelée furine. Du côté intra cellulaire, après le domaine transmembranaire, se trouve un motif RAM (*RBPJK [Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region]-association module*), des séquences de localisation nucléaire (NLS), des domaines ANK (*Ankyrin repeats*) et un domaine de transactivation qui héberge des motifs PEST (*Proline-glutamic acid-serine-threonine rich domains*). La figure 8-2 présente la structure générale des récepteurs NOTCH.

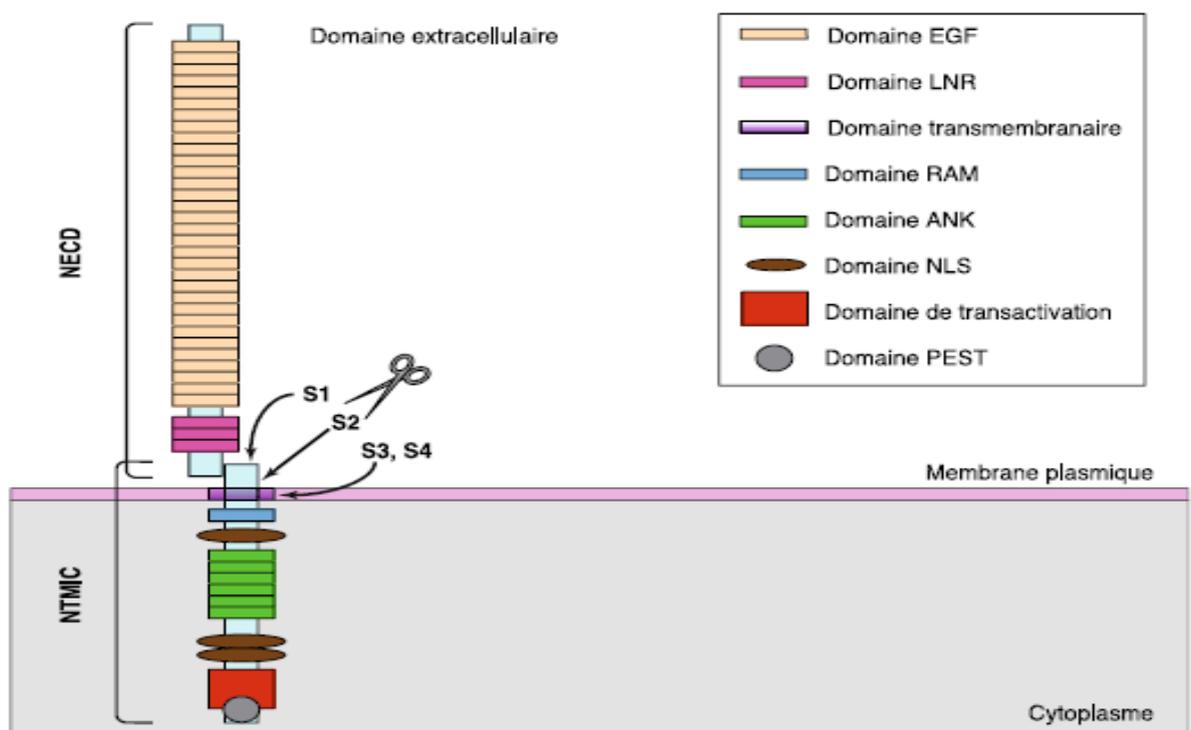


Fig. 2 – Les récepteurs NOTCH.

Les quatre récepteurs NOTCH sont construits sur le même modèle, associant un monomère extracellulaire (NECD) et un monomère transmembranaire et intracellulaire (NTMIC) réunis par interaction non covalente au niveau d’un domaine d’hétérodimérisation HD, les deux monomères

étant issus d’une même protéine clivée au niveau de ce domaine HD dans l’appareil de Golgi. Le NECD contient de 29 à 36 domaines *EGF-like*, et trois domaines LNR jouant un rôle

dans la régulation négative de l’activité Notch en protégeant le site de clivage S2 dans le domaine

HD. Le NTMIC contient un domaine RAM d'interaction avec des protéines de liaison de l'ADN, des séquences de localisation nucléaire, des domaines ANK répétés pour le recrutement d'activateurs transcriptionnels MAML et un domaine de transactivation contenant des séquences PEST

3. L'activation des récepteurs NOTCH

La liaison entre ligand et récepteur par interaction homotypique des domaines *EGFlike* entraîne le clivage protéolytique du récepteur par une métalloprotéinase, ADAM10 (*A disintegrin and metalloproteinase*) ou ADAM17 (également appelée TACE, *TNF-alpha converting enzyme*), au niveau d'un site S2 situé dans le domaine d'hétérodimérisation, donc du côté extracellulaire du récepteur, à douze acides aminés du domaine transmembranaire. Ce clivage est permis par un changement de conformation qui enlève la protection qu'exerçaient les domaines LNR sur le site S2.

Il se forme un intermédiaire appelé NEXT (*Notch extracellular truncation*) qui est substrat d'une autre activité protéolytique catalysée par une γ -sécrétase agissant au niveau transmembranaire sur deux sites successifs appelés S3 et S4. À l'issue de ce clivage, la partie intracellulaire de NOTCH (NICD) est capable de migrer dans le noyau, grâce au démasquage de son domaine de localisation nucléaire. Les γ -sécrétases sont des complexes multimériques transmembranaires dont font partie les présénilines (PSEN) 1 et 2, la nicastrine (NCSTN) et des facteurs d'activation et de stabilisation de ces protéases.

Au niveau nucléaire, le NICD interagit, par l'intermédiaire de son domaine RAM, avec une protéine de liaison à l'ADN dont le nom générique est CSL (*CBF[Corebinding factor]1/Su(H)/Lag-1*) et qui est chez l'homme la protéine RBPJK. Le domaine ANK permet ensuite le recrutement du coactivateur MAML (*Mastermindlike protein*), qui à son tour recrute le facteur MED8 (*Mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 8*), ce qui permet l'activation de la transcription de gènes cibles.

La figure 8-3 présente les étapes de la maturation post-traductionnelle du récepteur NOTCH, son interaction avec les ligands DSL, sa protéolyse, la migration de sa partie active vers le noyau et son interaction avec les complexes transcriptionnels activateurs et répresseurs.

Le récepteur NOTCH, qui doit être clivé pour agir et dont la partie intracellulaire constitue en fait le second messager, ne peut servir qu'une fois : la disponibilité en ligand et en récepteur à la surface des deux cellules échangeant un message est donc un facteur décisif pour la

transmission d'information par cette voie. Synthèse et dégradation des ligands et des récepteurs sont les éléments clés de cette régulation. Le rôle de l'ubiquitinylation pour l'endocytose et la destruction des ligands comme des récepteurs par le protéasome est capital (voir Annexe C), mais nous ne présenterons pas ici les divers effecteurs de cette dégradation. Le domaine HD, qui contient les sites de clivage par les protéases mises en jeu successivement, est sans doute le domaine le plus « sensible » des récepteurs NOTCH. La glycosylation des motifs *EGF-like* des récepteurs NOTCH constitue également un point important pour le contrôle de cette voie de signalisation. Enfin, de nombreuses interactions entre voies de signalisation existent au niveau des gènes activés, au niveau transcriptionnel, par la voie Notch et d'autres voies ; c'est ainsi, pour se limiter à un seul exemple de *crossstalk*, que le ligand JAG1 est le produit d'un gène activé par la β -caténine .

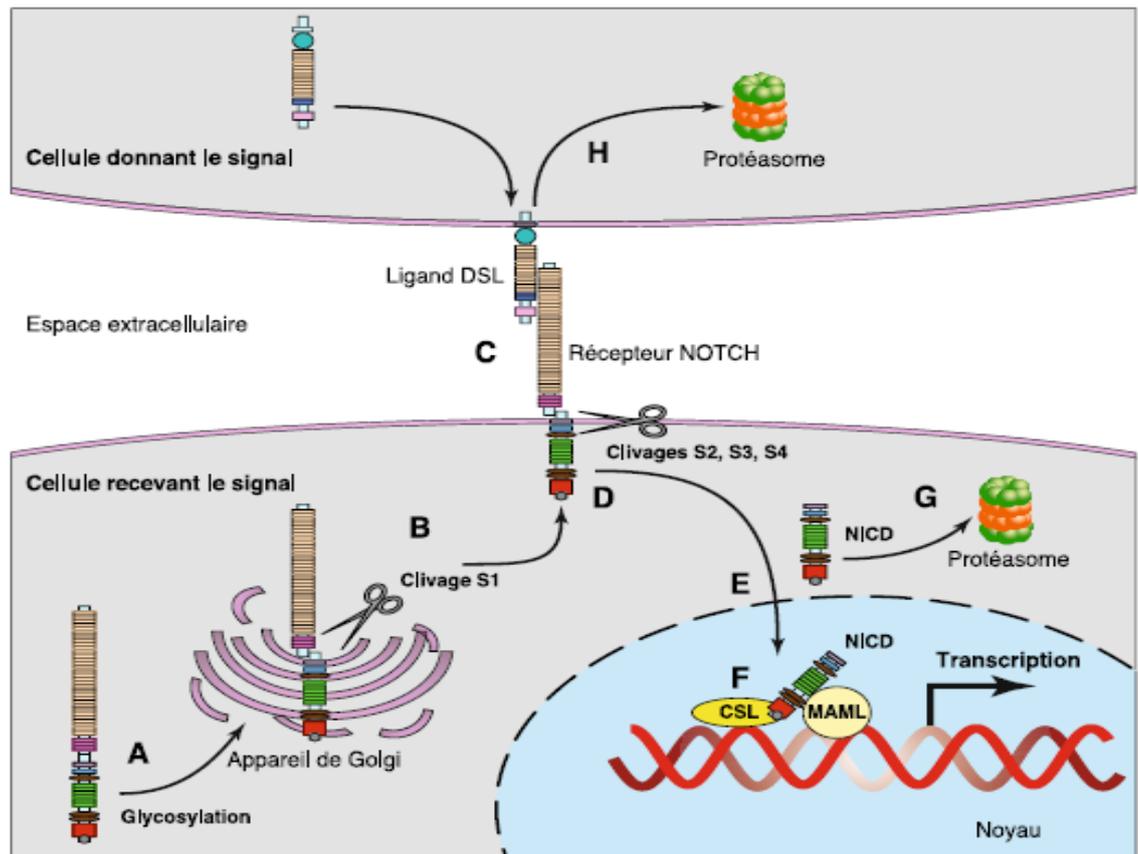


Fig. 3 – La voie de signalisation Notch.

À l'issue de sa synthèse, le récepteur NOTCH est fucosylé et glucosylé sur des résidus sérine et thréonine des domaines *EGF-like*, dans le réticulum endoplasmique (A). Il est ensuite clivé au niveau du site S1 du domaine HD par une protéase appelée furine (B), mais les deux produits

de ce clivage, NCED et NTMIC, restent associés par des liaisons non covalentes au niveau du domaine HD pour former un hétérodimère. Au niveau membranaire, le récepteur NOTCH peut être reconnu par des ligands DSL d'une autre cellule par une interaction homotypique des domaines *EGF-like* (C). Cette reconnaissance entraîne le démasquage d'un site de clivage S2 du domaine HD du NTMIC par une protéase ADAM, qui permet ensuite un nouveau clivage, au niveau des sites transmembranaires S3 et S4, par le complexe protéolytique γ -sécrétase (D). Le récepteur ainsi tronqué (NICD) peut migrer vers le noyau grâce à ses domaines de localisation nucléaire (E). Il est reconnu, au niveau de son domaine RAM, par une protéine CSL capable de se fixer sur l'ADN, ce qui permet le recrutement d'une protéine MAML au niveau des domaines ANK (F) et la transcription des gènes cibles peut avoir lieu. Le NCID est ensuite détruit par ubiquitinylation (G) grâce à la présence des domaines PEST à son extrémité C-terminale. De même, les ligands DSL sont détruits par ubiquitinylation (H).

4. Altérations oncogéniques

Des altérations de type « gain de fonction » ont été identifiées originalement dans les lymphomes et les leucémies lymphoblastiques T. Elles ont été observées ultérieurement dans d'autres pathologies néoplasiques, en particulier les cancers du côlon. Le rôle de la voie Notch dans l'orientation (le « destin ») des cellules souches est certainement un élément important dans l'intérêt que lui portent les oncologues.

C'est une rare translocation t(7;9) des leucémies lymphoblastiques T qui permet, dès 1991, de montrer le rôle oncogénique d'une protéine NOTCH1 tronquée et constitutivement active. Ultérieurement, des mutations activatrices nombreuses ont été identifiées dans ces leucémies, en particulier au niveau du domaine d'hétérodimérisation HD et au niveau des domaines PEST. Les mutations du domaine HD ont, pour conséquence la fragilisation de l'interaction entre NCED et NTMIC : cela facilite le clivage ultérieur aux sites S2 et S3-S4 pour le relargage spontané (en absence de contact avec un ligand DSL) du NICD. Les mutations et les délétions de la région Cterminale, en revanche, enlèvent les sites de reconnaissance du NICD

par l'ubiquitine ligase et ont pour conséquence une stabilisation de la forme active du récepteur au niveau de son site d'action nucléaire.

La voie Notch joue également un rôle majeur dans la reproduction des cellules souches des villosités intestinales comme des cellules souches des cancers du sein et son inhibition permet l'orientation de ces cellules vers la différenciation. Le développement des connaissances apporte de plus en plus d'arguments pour faire de la voie Notch une voie essentielle du développement de nombreux organes et son rôle dans l'oncogenèse est encore loin d'être totalement connu.

5. Cibles pharmacologiques

Toute interaction pharmacologique avec les étapes successives de l'activation des récepteurs NOTCH est susceptible d'inhiber cette voie de signalisation et d'inhiber son rôle dans la reproduction des cellules souches et l'oncogenèse. On peut envisager comme cibles potentielles l'interaction entre récepteur et ligand, la glycosylation du récepteur, le clivage initial entre NCED et NTMIC, les clivages ultérieurs par ADAM

et par la γ -sécrétase, l'ubiquitinylation du récepteur et celle du ligand, l'interaction du NICD avec les protéines nucléaires CSL, etc.

Jusqu'à maintenant, la cible essentielle retenue pour un développement pharmacologique est l'activité de clivage transmembranaire catalysée par le complexe de la γ -sécrétase. En effet, des inhibiteurs de γ -sécrétase avaient déjà été conçus et développés pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, du fait que les activités protéolytiques générant les peptides β -amyloïdes sont également catalysées par ce complexe enzymatique. À l'heure actuelle, quelques essais cliniques d'inhibiteurs de γ -sécrétase ont été entrepris. Une autre cible, encore au stade préclinique, concerne le développement d'anticorps dirigés contre le domaine NRR du récepteur NOTCH et contre le ligand DLL impliqué plus particulièrement dans l'angiogenèse.