

La voie de signalisation Wnt

Introduction

La voie Wnt ou voie de la β -caténine 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 la programmation cellulaire des cellules souches vers la différenciation ou la prolifération. Cette voie est complexe et l'ensemble de ses rôles physiologiques est encore loin d'être déchiffré. On trouvera dans cette voie des protéines du nom de *Wingless*, *Frizzled*, *Dishevelled*, qui désignent des mutants du développement de la drosophile, ce qui témoigne de son universalité dans le règne animal. Certaines altérations génétiques de cette voie chez l'homme déterminent des pathologies congénitales ; plusieurs altérations somatiques ou germinales sont liées à l'oncogenèse.

Brièvement, des messagers protéiques appelés WNT activent des récepteurs membranaires appelés *Frizzled* (FZD), et cette activation aboutit à la stabilisation de la forme cytoplasmique d'une protéine impliquée dans les jonctions intercellulaires des tissus épithéliaux, la β -caténine. Cette dernière peut alors être transférée dans le noyau où elle pourra activer des programmes de transcription de nombreux gènes, en particulier ceux qui codent pour des protéines nécessaires à la prolifération (cycline D1, MYC, etc.).

1. Les ligands WNT et leurs récepteurs

Dix-neuf protéines WNT distinctes existent chez l'homme, le nom complet des gènes étant *Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site*. Le premier d'entre eux, *WNT1*, avait été identifié au site d'intégration d'un rétrovirus induisant des tumeurs mammaires chez la souris et appelé *Int1*, montrant d'emblée un rôle potentiel dans le développement normal et dans l'oncogenèse ; il avait été ensuite assimilé au gène *Wingless* de la drosophile : son nom résulte de la contraction de *Wingless* et de *Integration*.

Les protéines WNT sont des glycoprotéines riches en cystéine sécrétées par divers types cellulaires ; leurs gènes sont organisés en plusieurs *clusters* localisés sur des chromosomes différents et possèdent une grande homologie entre eux, et avec les gènes correspondants chez tous les métazoaires. Il existe une spécificité tissulaire de l'expression de ces protéines, mais le rôle individuel de chaque protéine WNT est encore mal connu.

Les ligands WNT sont reconnus par des récepteurs FZD (*Frizzled*) ; il en existe dix chez l'homme, mais la combinatoire entre les dix-neuf ligands et les dix récepteurs n'est pas connue avec précision. L'activation de ces récepteurs nécessite la présence d'un corécepteur phosphorylable, LRP5 ou LRP6 (*LDL receptor related protein*).

Les récepteurs FZD sont des protéines à sept domaines transmembranaires, du type des GPCR (*G-protein coupled receptors*); l'activation concomitante récepteur FZD-corécepteur LRP5/6 conduit à la formation d'un complexe avec une protéine cytoplasmique DVL (*Dishevelled*), protéine adaptatrice (il en existe trois chez l'homme, DVL1, 2 et 3) dont l'activation permet la rupture d'un complexe cytoplasmique où est engagé l'élément central de cette voie, la β -caténine. On a longtemps pensé que les récepteurs FZD fonctionnaient sans couplage avec une protéine G hétérotrimérique, à l'inverse des GPCR. Il semble en fait qu'il y ait intervention d'une telle protéine G entre l'activation de FZD et celle de la protéine DVL, de la même façon qu'elle intervient en aval de l'activation de tous les GPCR.

2. La voie de la β -caténine

La β -caténine (CTNNB) est une molécule impliquée à la fois dans l'adhésion cellulaire et dans la signalisation. Dans sa première fonction, elle est liée, dans le cytoplasme, au cytosquelette d'actine *via* une molécule d' α -caténine et, au niveau extracellulaire, aux structures jonctionnelles de l'E-cadhérine (CDH1) .

Elle joue donc un rôle majeur dans les jonctions intercellulaires des tissus épithéliaux et dans le maintien de l'architecture tissulaire.

La β -caténine libre cytoplasmique, en équilibre avec la β -caténine liée au niveau des jonctions intercellulaires, est maintenue inactive, en absence de signal WNT, grâce à sa phosphorylation qui la conduit à sa destruction dans le protéasome. Cette phosphorylation est assurée au sein d'un complexe de dégradation dans lequel interviennent des protéines adaptatrices, axine et APC (*Adenomatous polyposis coli*), et deux sérine/thréonine kinases, la caséine kinase 1 (CK1 α) et la glycogène synthase kinase3 β (GSK3 β), qui phosphorylent la β -caténine sur des sites distincts. La phosphorylation de la β -caténine lui permet d'être reconnue par une protéine β -TRCP (*Transducing repeat containing protein*) qui n'est autre que son ubiquitine ligase E3 qui la conduit donc à la destruction dans le protéasome (voir Annexe C) .

L'activation de DVL, sans doute *via* une protéine G hétérotrimérique, et faisant suite à l'activation d'un récepteur FZD, entraîne la phosphorylation du corécepteur LRP5/6, sur un motif PPPSPXS, par une caséine kinase membranaire (CK1 γ) et par la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β), dont la fonction de phosphorylation de la β -caténine est inhibée

C'est cette phosphorylation qui crée un signal d'appel pour la relocalisation de l'axine à la membrane, libérant ainsi la β -caténine du complexe cytoplasmique qui entraînait jusque-là sa destruction, en absence d'activation du récepteur. Cette voie Wnt dite canonique semble le plus souvent activée après intervention de ligands WNT précis, comme WNT1, WNT3a ou WNT8.

La β -caténine libre, non phosphorylée, peut alors entrer dans le noyau. Elle pourra déplacer un facteur de transcription de la famille TCF-LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) de ses sites de reconnaissance sur l'ADN et déclencher ainsi la transcription de gènes jusque-là réprimés .

Parmi les gènes transcrits, on peut citer le gène *MYC* dont le rôle activateur de la transcription est bien connu et le gène de la cycline D1 (*CCND1*), impliqué dans la mise en route du cycle cellulaire

Lorsqu'elle ressort du noyau, la β -caténine est reprise en charge par APC et, en absence d'un nouveau signal WNT, réintroduite dans un complexe de destruction.

D'autres systèmes semblent capables d'activer la voie de la β -caténine de façon indirecte, en induisant, par phosphorylation sur une tyrosine, la rupture de la liaison β -caténine – E-cadhérine et l'augmentation de la disponibilité en β -caténine cytoplasmique pour entrer dans le noyau : ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase comme l'EGFR, ERBB2 ou MET . Plus de cent protéines sont impliquées, à des degrés divers, dans la signalisation de cette voie. Outre les acteurs majeurs déjà mentionnés, on peut citer :

- les protéines FRAT (*Frequently rearranged in advanced T-cell lymphoma*) qui inhibent la phosphorylation de la β -caténine par la GSK3 β ;
- les protéines SFRP (*Secreted frizzled-related proteins*) qui jouent un rôle de leurre pour les ligands WNT au niveau extracellulaire ; elles vont donc détourner les ligands de leur cible et contrôler négativement cette voie de signalisation ;
- la protéine WIF (*Wnt inhibitory factor*) est une protéine sécrétée qui se lie aux protéines WNT au niveau extracellulaire pour les inhiber ;
- les protéines DKK (*Dickkopf homolog*), également sécrétées, interagissent avec les corécepteurs LRP5/6, ce qui conduit à leur endocytose et à l'inactivation des récepteurs FZD.

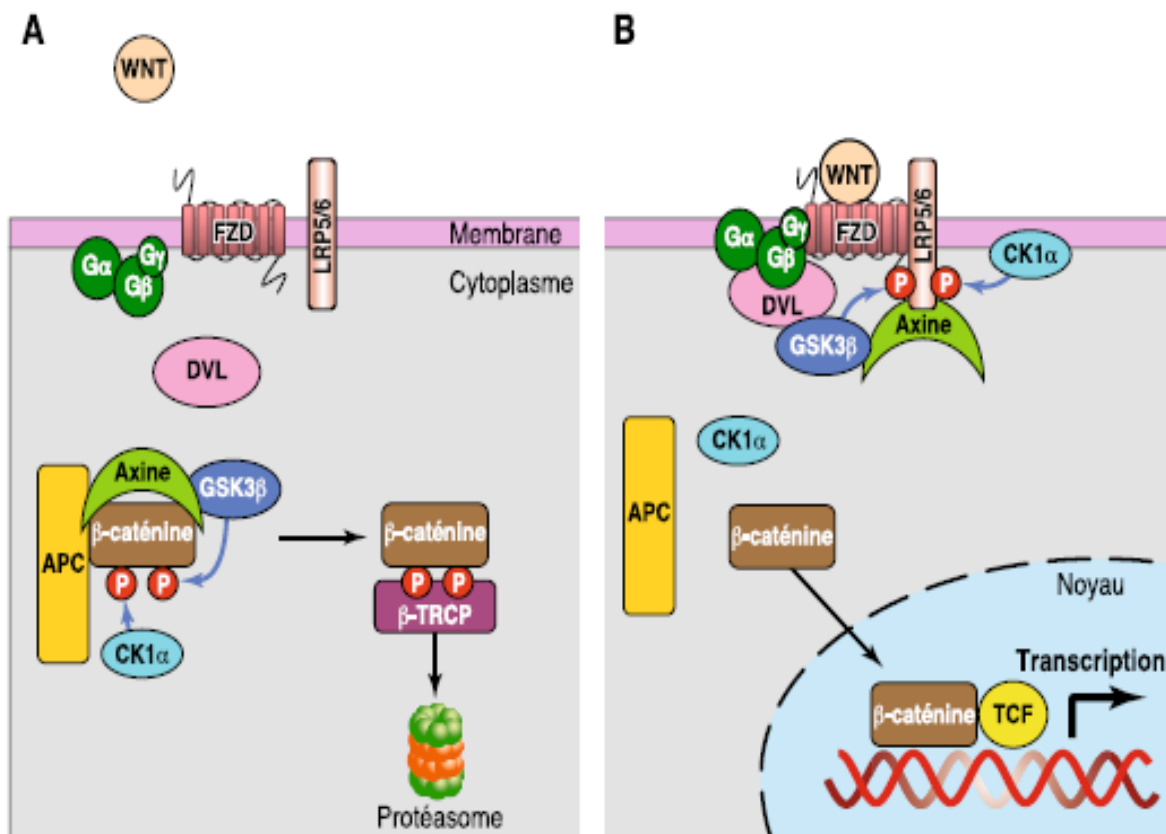


Fig. 1– La voie Wnt-β-caténine.

A. En absence de stimulation des récepteurs FZD par un ligand WNT, la β-caténine est phosphorylée,

dans un complexe de destruction dont font partie l'axine et la protéine APC, par les kinases GSK3β et CK1α. Cette phosphorylation la conduit vers son ubiquitine-ligase, β-TRCP,

et vers le protéasome.

B. En présence d'un ligand WNT sur le récepteur FZD, la protéine DSL est recrutée, sans doute

via l'activation d'une protéine G, ce qui permet la phosphorylation du corécepteur LRP5/6 par la CK1γ et la GSK3β, et le recrutement de l'axine à la membrane. Le complexe de destruction est dissocié et la β-caténine non phosphorylée peut entrer dans le noyau où elle s'associe à un ensemble de molécules impliquées dans la répression de la transcription, en particulier les facteurs

Les voies Wnt « non canoniques »

Des voies de signalisation partant de la liaison de protéines WNT avec un récepteur FZD et n'agissant pas au niveau de la β -caténine ont été décrites. Ce sont plus particulièrement les protéines WNT5a et WNT11 qui activent les voies non canoniques.

Dans une première voie, la liaison de WNT avec FZD active une phospholipase C, par l'intermédiaire d'une protéine G à sous-unité α_q , mais aussi avec mise en jeu de la protéine DVL. Cela permet ainsi d'une part la libération de calcium cytosolique *via* la voie classique de l'inositol triphosphate, et d'autre part l'activation d'une protéine kinase C *via* la formation de diacylglycérol .

Une autre voie non canonique utilise la protéine adaptatrice DVL et peut-être une protéine G hétérotrimérique pour activer la JUN N-terminal kinase (JNK) impliquée dans une voie du type MAP kinase , montrant ainsi un exemple d'interconnexion entre voies de signalisation. Cette activation passe par des petites protéines G de la famille RHO, comme RHO-A, RHO-U, RAC ou CDC42 .

Cette voie commande des actions impliquées dans la polarité cellulaire plane (PCP, *Planar cell polarity*).

La levée de la répression permet la transcription de nombreux gènes de prolifération, dont le gène *MYC* et celui de la cycline D1, tous deux impliqués dans la prolifération cellulaire, sont de bons exemples.

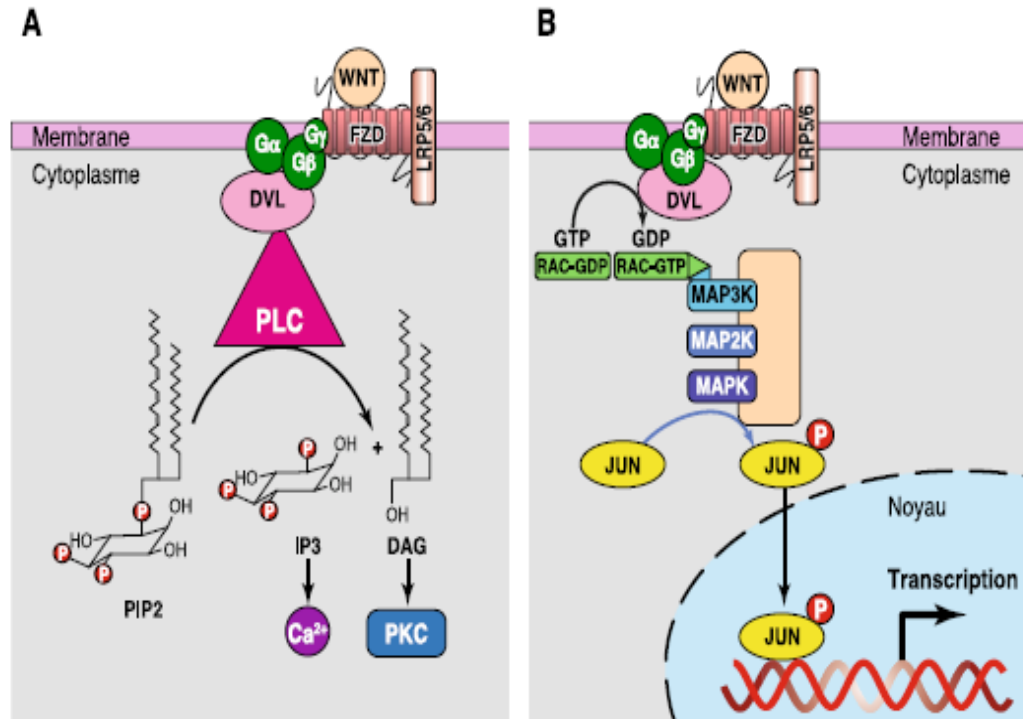


Fig. 2 – Les voies Wnt non canoniques.

Ces voies de signalisation sont bien activées par un message WNT mais ne mettent pas en jeu la β -caténine. En A, la protéine DSL permet l'activation d'une phospholipase C, qui génère, à partir du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate, les seconds messagers que sont le diacylglycérol (DAG) et le triphosphoinositol (IP3).

En B, la protéine DSL permet l'activation de petites protéines G comme la protéine RAC, qui permet l'activation d'une cascade de MAP kinases aboutissant à la phosphorylation du facteur de transcription JUN et à l'activation de gènes de prolifération .

3. Altérations oncogéniques

Il existe de nombreuses altérations génétiques de cette voie de signalisation qui conduisent à des anomalies du développement de l'embryon et du fœtus et déterminent des pathologies congénitales graves qui ne seront pas décrites ici. Les altérations oncogéniques peuvent concerner des régulateurs positifs de cette voie, qui se comporteront comme des proto-oncogènes, ainsi que des régulateurs négatifs qui se comporteront comme des gènes suppresseurs de tumeurs.

Dans les cancers humains, de nombreuses altérations ont été observées ; certaines sont des mutations bien identifiées, d'autres sont des modifications d'expression dont le rôle moteur dans l'oncogenèse n'est pas démontré.

Le gène *APC* est connu de longue date comme un gène suppresseur de tumeurs jouant un rôle majeur dans l'oncogenèse colorectale. Ses mutations germinales sont à l'origine de la polypose colique familiale, un des deux grands syndromes de prédisposition héréditaire au cancer colorectal. Au niveau somatique, ses mutations constituent, dans le modèle de Vogelstein, l'événement initial le plus fréquent. Ce sont généralement des mutations de type non-sens et elles conduisent à une protéine tronquée.

Il semblerait que la mutation d'un seul allèle soit suffisante pour constituer cet événement initial, par un phénomène d'haplo-insuffisance.

Les cancers colorectaux sont particulièrement dépendants, pour leur formation comme pour leur croissance, de la voie de la β -caténine. Outre les mutations d'*APC*, celles de l'axine 2 ou de la β -caténine elle-même sont fréquentes. Des altérations de cette voie sont également rencontrées dans les hépatocarcinomes, les cancers de l'ovaire et les tumeurs desmoïdes ou fibromateuses profondes.

4. Cibles pharmacologiques

La voie de la β -caténine représente donc une cible potentielle majeure en cancérologie, en particulier pour les cancers colorectaux qui conservent tout au long de leur évolution une « addiction » certaine à cette voie. Nous n'évoquerons pas ici le rôle potentiel des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des vitamines A et D sur l'inhibition possible de cette voie, mais les développements pharmacologiques ciblés.

Une première approche consiste en la synthèse d'anticorps dirigés contre les ligands WNT ou contre les récepteurs FZD. Des résultats encourageants ont été obtenus sur des modèles cellulaires et animaux.

Au niveau des petites molécules, une approche peut être le ciblage des complexes transcriptionnels TCF- β -caténine. Plusieurs molécules ont été identifiées lors de criblages à grande échelle (*High-throughput screening*) comme capables d'interagir avec la β -caténine pour empêcher sa liaison au TCF. Plus en amont, des molécules susceptibles d'interagir avec les complexes FZD-DVL sont activement recherchées dans des programmes de criblage à grande échelle.

Enfin, il semble pouvoir exister des molécules régulant positivement l'activité de GSK3 β ; il s'agit de facteurs de différenciation de *Dictyostelium discoideum* qui pourraient être également actifs sur les cellules de mammifères et se comporter comme des inhibiteurs de la voie de la β -caténine.