

## En l'absence d'hormone, le récepteur de l'érythropoïétine est déjà un dimère

Il est classiquement admis que les récepteurs de cytokines et les récepteurs à activité tyrosine kinase fonctionnent selon un mécanisme de dimérisation voire de multimérisation induite par leur ligand. Cette dimérisation rapproche les tyrosine kinases associées au récepteur ou constituant une partie du récepteur lui-même et permet ainsi leur activation par transphosphorylation. Ce processus que personne ne conteste aujourd'hui fut longtemps opposé à une théorie selon laquelle l'activation du récepteur et la stimulation de l'activité tyrosine kinase résultaient de la modification conformationnelle du récepteur induite par la fixation du ligand. Deux articles publiés récemment dans *Science* réconcilient en partie ces deux conceptions [1, 2]. Des expériences de co-cristallisation avaient déjà montré que la forme activée du récepteur de l'érythropoïétine est un trimère constitué d'une molécule d'érythropoïétine et de deux molécules de récepteur [3], confirmant de très nombreuses études fonctionnelles qui concluaient à la nécessité de la dimérisation du récepteur pour déclencher une transmission du signal intracellulaire. Les résultats publiés dans ces deux articles de *Science* démontrent de façon très claire qu'en l'absence d'érythropoïétine, le récepteur est déjà dimérisé et que l'érythropoïétine ne provoque pas la dimérisation du récepteur, mais change l'orientation relative des deux molécules de récepteur, permettant ainsi le rapprochement des tyrosine kinases JAK2 associées à leur partie intracellulaire (*figure 1*) [4] (*m/s* 1994, n° 2, p. 202 et 1995, n° 6, p. 927). Pour arriver à cette conclusion, Livnah *et al.*

ont d'abord cristallisé la partie extracellulaire du récepteur et ont constaté que cette région formait spontanément des dimères. De façon remarquable, les mêmes acides aminés du récepteur sont impliqués dans la liaison de l'érythropoïétine et dans la formation du dimère inactif en l'absence de ligand. L'organisation spatiale du récepteur est très différente dans les deux cas. En l'absence d'hormone, le dimère adopte une structure en croix qui éloigne considérablement les extrémités carboxy-terminales de la partie extracellulaire du récepteur. Puisque, dans le récepteur complet, ces extrémités sont suivies de la partie transmembranaire puis de la partie intracellulaire, on pouvait supposer que cette organisation éloignait fortement les parties intracellulaires l'une de l'autre. C'est ce que démontre de façon très élégante l'article de Remy *et al.* [2]. Ces auteurs avaient préalablement montré qu'on peut reconstituer une enzyme dihydrofolate réductase (DHFR) active à partir de ses fragments amino- et carboxy-terminaux si on les fusionne à des séquences protéiques capables de dimériser [5]. Les données de la cristallographie du récepteur de l'érythropoïétine indiquaient qu'en l'absence d'érythropoïétine, la distance entre les extrémités carboxy-terminales des deux molécules de récepteur était de 73 Å. Les auteurs ont alors estimé que s'ils greffaient les extrémités amino- et carboxy-terminales de la DHFR juste après la région transmembranaire du récepteur de l'érythropoïétine, cette distance était trop importante pour reconstituer une enzyme fonctionnelle (*figure 1A*), mais qu'en intercalant un espaceur flexible de longueur

suffisante entre le récepteur et les parties de l'enzyme on devait pouvoir reconstituer l'enzyme. Ils ont calculé qu'un espaceur de 20 Å, résultant de la liaison de 5 acides aminés devait être trop court, mais qu'un espaceur de 120 Å (30 acides aminés) devait permettre de reconstituer une enzyme fonctionnelle si les données de la cristallographie pouvaient être transposées à des récepteurs insérés dans une membrane et donc placés dans leur environnement physiologique normal. Leurs résultats confirment totalement cette hypothèse : en l'absence d'érythropoïétine, un espaceur de 120 Å permet de reconstituer une enzyme DHFR active alors qu'un espaceur de 20 Å ne permet pas cette reconstitution (*figure 1B*). Les données de cristallisation de l'érythropoïétine avec son récepteur montraient que la présence du ligand diminuait la distance entre les parties carboxy-terminales des domaines extracellulaires du dimère de récepteurs à 39 Å. Cette distance devait permettre de reconstituer la DHFR avec un espaceur de 20 Å. C'est effectivement ce que montrent les résultats de Remy *et al.* : l'addition d'érythropoïétine permet de reconstituer une enzyme active avec un espaceur de 5 acides aminés (*figure 1C*). L'ensemble de ce travail montre donc que le récepteur de l'érythropoïétine forme un dimère en l'absence de ligand et que la fixation d'érythropoïétine ne provoque pas la dimérisation du récepteur comme on le supposait jusqu'à présent, mais simplement un rapprochement des parties intracellulaires. Qu'en est-il des tyrosine kinases JAK2 qui assurent le déclenchement de la transmission du signal intracellulaire ? On sait que ces

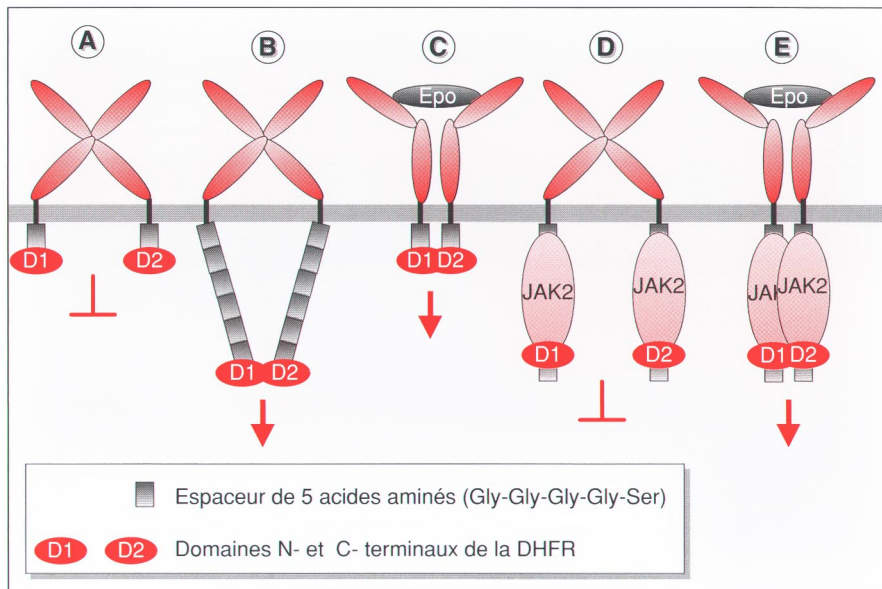


Figure 1. **Schéma explicatif des expériences de Remy et al.** Si les deux domaines (D1 et D2) de la DHFR ne sont espacés de la partie transmembranaire que par 5 acides aminés, une enzyme active est reconstituée en présence d'érythropoïétine (C) mais pas en son absence (A). En revanche, la présence d'un espaceur de 30 acides aminés permet la reconstitution de l'enzyme en l'absence d'érythropoïétine (B). Si les fragments de la DHFR sont fixés à l'extrémité carboxy-terminale des kinases JAK2, la reconstitution de l'activité DHFR n'est possible qu'en présence d'érythropoïétine (D et E).

tyrosine kinases sont associées à la partie du récepteur située juste sous la membrane. Le rapprochement ou l'éloignement des domaines transmembranaires devrait donc être transmis de façon efficace aux molécules JAK2. Ce dernier point a été vérifié par Remy *et al.* qui ont greffé les fragments de la DHFR à l'extrémité carboxy-terminale des molécules JAK2. Notons que cette extrémité est constituée par le domaine catalytique de JAK2. Bien que l'association de JAK2 avec le récepteur de l'érythropoïétine ne requiert pas la liaison de l'hormone (un résultat

déjà acquis que les auteurs de cet article confirment avec le système de reconstitution DHFR), et malgré la dimérisation du récepteur en l'absence d'hormone, la reconstitution de l'activité DHFR à partir des fragments de l'enzyme fixés sur JAK2 n'est observée que lorsque les cellules sont stimulées par de l'érythropoïétine (figure 1E). Cela indique que les domaines catalytiques des deux molécules JAK2 sont éloignés lorsque le récepteur n'est pas activé (figure 1D) et que la fixation du ligand rapproche fortement ces domaines (figure 1E). Après ce travail, on peut se

demander quel est le degré d'universalité de ce mécanisme. Les auteurs citent des résultats d'expériences de transfert d'énergie de fluorescence qui suggèrent que les récepteurs des interleukines-1 et 2, ainsi que le récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) pourraient exister sous forme dimérique en l'absence de ligand. D'un point de vue plus général, ce résultat pourrait expliquer pourquoi de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase sont activables à 4°C alors qu'à cette température la mobilité des protéines dans les membranes est très fortement réduite. Si, comme on peut le supposer, ce résultat est applicable à d'autres récepteurs que celui de l'érythropoïétine, ces deux articles pourraient nous amener à modifier de façon très significative notre vision de leur fonctionnement.

#### Patrick Mayeux

ICGM, Inserm U. 363, Hôpital Cochin, Bâtiment Gustave-Roussy, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

1. Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 1999; 283: 987-90.
2. Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* 1999; 283: 990-3.
3. Syed RS, Reid SW, Li C, *et al.* Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* 1998; 395: 511-6.
4. Lacombe C, Mayeux P. L'érythropoïétine. *Med Sci* 1995; 11: 947-55.
5. Pelletier JN, Campbell-Valois FX, Michnick SW. Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12141-6.

## Journée ARP – Association de Recherche sur la Polyarthrite

Vendredi 22 octobre 1999 – 9 h 00-19 h 00

Fondation A. de Rothschild, 25, rue Manin, 75019 Paris, France

Salle de Conférence - 1<sup>er</sup> sous-sol

### Renseignements

Association de Recherche sur la Polyarthrite, 4, rue Berteaux-Dumas, 92200 Neuilly-sur-Seine

Tél. : 01 46 41 41 00 – Fax : 01 40 88 37 88