

Le blocage de l'interaction Grb2-Sos par un peptide dimérique inhibe la prolifération cellulaire dans un modèle tumoral

La cascade d'événements conduisant à la division et/ou à la différenciation d'une cellule met en jeu de nombreuses protéines, dont certaines ont, semble-t-il, comme seul rôle de mettre en contact des protéines fonctionnelles moins mobiles, d'où leur nom d'adaptateurs [1]. Grb2 (*growth factor binding protein 2*) est, à ce jour, le plus étudié de ces adaptateurs [2]. Il est constitué d'un domaine SH2 (*Src homology 2*), encadré par deux domaines SH3 (*m/s 1994, n° 6/7, p. 709*). Par l'intermédiaire de son domaine SH2, Grb2 interagit avec des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) au niveau de sites comportant un résidu tyrosine phosphorylé. Par ses domaines SH3, Grb2 se complexe à de courtes régions riches en proline (8 à 10 acides aminés

possédant la séquence consensus PXXP) présentes dans ses cibles, dont la principale est Sos, le facteur d'échange de la protéine Ras [3]. La fixation aux RTK de leur ligand, par exemple l'EGF (*epidermal growth factor*) entraîne leur autophosphorylation sur des résidus Tyr de leur extrémité carboxy-terminale, puis le recrutement de la protéine Grb2 complexée à Sos, en situation sous-membranaire, proche du point d'ancrage de Ras. La liaison de Sos à Ras stabilise la forme liant le GTP (Ras-GTP), qui est alors capable, comme le montre la *figure 1A*, de stimuler en aval la voie des MAP (*mitogen activating protein*)-kinases, ERK1 et ERK2 [3]. Ces dernières, après translocation dans le noyau, vont à leur tour activer certains facteurs de transcription.

Grb2 a été impliquée dans plusieurs maladies, en particulier cancéreuses [4]. Ainsi, on la trouve en excès dans des tumeurs du sein induites par l'oncogène *erbB-2/HER2*, analogue tronqué du récepteur de l'EGF, qui stimule en permanence la voie de transmission du signal [5]. De même, le pouvoir transformant de l'oncogène *bcr-abl*, résultant de la translocation du gène *abl* (chromosome 9) au niveau du point de cassure (*bcr*) du chromosome 22, et présent chez 95 % des patients atteints de leucémie myéloïde chronique, a été corrélé à sa capacité à lier Grb2 et ainsi à activer Ras [6]. Par ailleurs, des mutants de *Grb2*, codant pour une forme délétée au niveau du domaine SH3 aminoterminal, induisent une réversion du phénotype malin lorsqu'ils sont trans-

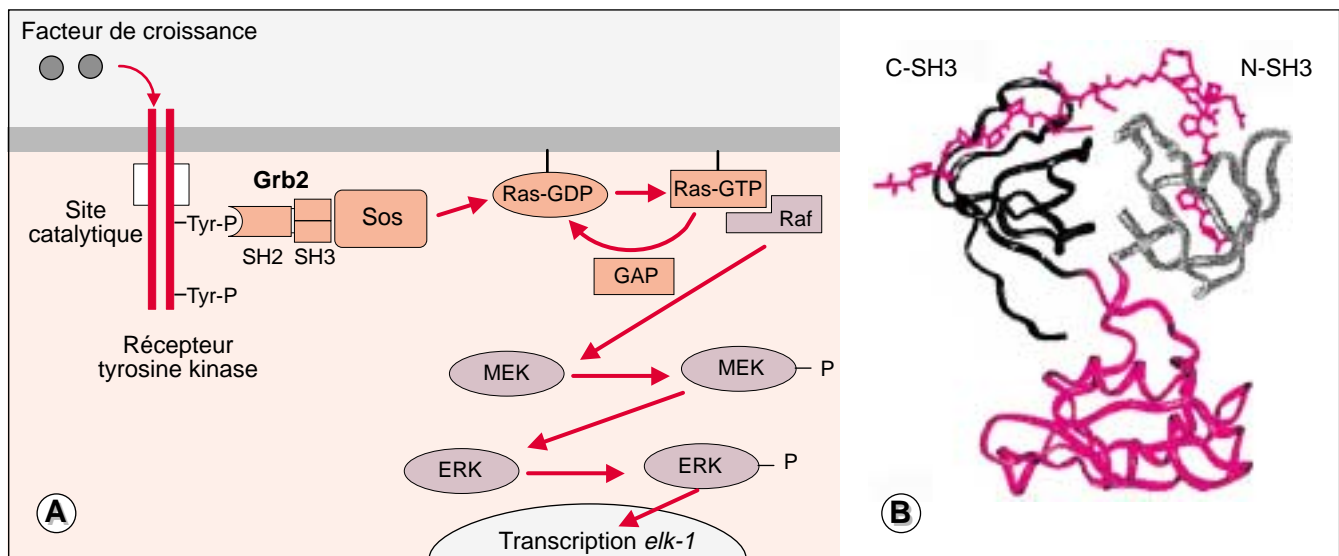


Figure 1. **A.** Voie de signalisation de la protéine Ras induite par les récepteurs à activité TK. **B.** Structure tridimensionnelle « modélisée » du peptidimère complexé avec la protéine Grb2.

fectés dans des cellules transformées par HER2 [7]. L'ensemble de ces observations montre le rôle essentiel de Grb2 dans la transmission de signaux conduisant à la division et/ou à la différenciation cellulaire, et souligne l'intérêt thérapeutique que pourrait représenter une possible interruption de son interaction avec Sos. Pour y parvenir et afin de pallier la faible affinité des peptides riches en proline pour les domaines SH3 isolés ($K_d \sim 10^{-5}M$), contrastant avec la forte affinité de Sos pour Grb2, nous avons eu l'idée de fabriquer une molécule capable de reconnaître en même temps les deux domaines SH3, en dimérisant la région riche en proline la plus affine de la protéine Sos (VPPVPPRRR)*. En effet, l'affinité attendue d'un composé dimérique se liant à deux sites est théoriquement de l'ordre du produit des affinités de chaque monomère.

En utilisant à la fois les données que nous apportait la RMN sur la structure des complexes formés entre ce peptide et les domaines SH3 [8], et la structure tridimensionnelle de Grb2 non complexée, résolue par cristallographie aux rayons X [2], la modélisation moléculaire (figure 1B) nous a permis de constater que les peptides riches en proline, placés sur les deux domaines SH3, adoptaient des positions rapprochant leurs extrémités carboxy-terminales. En reliant celles-ci par les deux fonctions aminées d'une lysine, un dimère que nous avons dénommé peptidimère [9] a été obtenu (figure 1B). Il présente pour Grb2 une affinité supérieure de plus de deux ordres de grandeur ($K_d \approx 40$ nM) à celle du monomère ($K_d \approx 18$ μ M).

Ce peptidimère est capable d'inhiber l'interaction entre Grb2 et Sos dans des cellules ER22 (fibroblastes surexprimant le récepteur de l'EGF), stimulées par l'EGF. Ce dimère est très spécifique des domaines SH3 de Grb2, ce qui tient à l'arrangement spatial de ces derniers, et est incapable de se lier aux protéines PI3K, Nck et Crk, qui possèdent elles aussi un ou plusieurs domaines SH3 [9]. Afin de permettre l'entrée du composé dans les cellules, nous lui avons

adjoint un peptide dérivé de la troisième boucle de l'homéodomaine d'Antennapédia, qui diffuse très efficacement dans les cellules [10]. Le conjugué obtenu (peptidimère-Ant), mis en présence de cellules ER22 stimulées par l'EGF, est capable d'inhiber non seulement la formation du complexe Grb2-Sos, mais également l'activation des MAP-kinases ERK1 et ERK2, sans toutefois modifier la croissance des cellules.

Le peptidimère-Ant est aussi efficace dans des modèles cellulaires dans lesquels la protéine Ras intervient dans la voie de transmission d'un signal de différenciation. C'est le cas des cellules PC12 (cellules de rat isolées d'un phéochromocytome dérivé de la crête neurale), dont la différenciation en réponse au NGF (*nerve growth factor*) est inhibée par l'injection d'un anticorps dirigé contre p21Ras [11]. L'addition à ces cellules du peptidimère-Ant, à des concentrations de l'ordre du micromolaire, a le même effet que l'anticorps anti-Ras et inhibe la formation de neurites en réponse au NGF. Dans ces expériences, la forte activation des MAP-kinases observée lors de la stimulation par le NGF est également inhibée. En revanche, la prolifération des cellules PC12 stimulées par l'EGF n'est pas altérée, suggérant que le niveau d'activation des MAP-kinases est fonction du récepteur stimulé. En effet, la stimulation du récepteur Trk A induite par le NGF conduit à un niveau d'activation des MAP-kinases ERK1 et ERK2 très supérieur à celui qui est observé en réponse à l'EGF [12], et parallèlement le pouvoir inhibiteur du conjugué peptidimère-Ant s'exerce essentiellement sur l'effet produit par le NGF.

Enfin, et c'est le résultat le plus intéressant en termes pharmacologiques, le conjugué peptidimère-Ant a un effet anti-prolifératif important sur la formation de colonies par des cellules tumorales NIH3T3 transfectées par l'oncogène *HER2* ($CI_{50} = 1$ μ M). En revanche, comme on pouvait s'y attendre (voir figure 1A), le conjugué n'a pas d'effet significatif sur la croissance des cellules tumorales NIH3T3 transfectées par un mutant de *Ras* oncogénique.

En conclusion, le conjugué peptidimère-Ant constitue un outil biolo-

gique extrêmement intéressant puisqu'il est capable d'inhiber spécifiquement la voie des MAP-kinases induite par Ras. De plus nos résultats montrent clairement que des composés susceptibles d'inhiber des protéines situées en aval de protéines oncogéniques, comme celles qui participent à une voie de transmission du signal, pourraient constituer des outils thérapeutiques potentiels. Reste à augmenter encore l'affinité du peptidimère pour sa cible, et à parfaire sa biodisponibilité en l'absence de vecteur.

**Christiane Garbay
Bernard P. Roques**

Inserm U. 266, Cnrs UMR 8600, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France.

1. Dusanter-Fourt I, Mayeux P, Gisselbrecht S. Transduction du signal par les récepteurs de cytokines. *Med Sci* 1994; 10: 825-35.
2. Chardin P, Cussac D, Maignan S, Ducruix A. The Grb2 adaptor. *FEBS Lett* 1995; 369: 47-51.
3. Chardin P. Protéines Ras et transmission des signaux mitogènes. *Med Sci* 1994; 10: 657-64.
4. Sastry L, Cao T, King CR. Multiple Grb2-protein complexes in human cancer cells. *Int J Cancer* 1997; 70: 208-13.
5. Janes P, Daly R, DeFazio A, Sutherland R. Activation of the Ras signaling pathway in human breast cancer cells overexpressing *erbB-2*. *Oncogene* 1994; 9: 3601-9.
6. Gishizky M. Tyrosine kinase induced mitogenesis breaking the link with cancer. *Ann Reports Med Chem* 1995; 30: 247-53.
7. Xie Y, Pendergast AM, Hung MC. Dominant-negative mutants of Grb2 induced reversal of the transformed phenotypes caused by the point mutation-activated rat *HER-2/Neu*. *J Biol Chem* 1995; 270: 30717-24.
8. Goudreau N, Cornille F, Duchesne M, et al. NMR structure of the N-terminal SH3 domain of Grb2 and its complex with a proline-rich peptide from Sos. *Nat Struct Biol* 1994; 1: 898-907.
9. Cussac D, Vidal M, Leprince C, et al. A Sos-derived peptidimer blocks the ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity. *FASEB J* 1999; 13: 31-8.
10. Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A. Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 1996; 271: 18188-93.
11. Hagag N, Halegoua S, Viola M. Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to Ras p21. *Nature* 1986; 319: 680-2.
12. Birge RB, Knudsen BS, Besser D, Hanafusa H. SH2 and SH3-containing adaptor proteins: redundant or independent mediators of intracellular signal transduction. *Genes Cells* 1996; 1: 595-613.

* V: Val; P: Pro; R: Arg.