

Protéolyse intracellulaire et tumorigenèse

Patrizia Ferrara
Claire Acquaviva
Guillaume Bossis
Marc Piechaczyk
Isabelle Jariel-Encontre

La dégradation des protéines intracellulaires est un processus essentiel non seulement dans la physiologie de la cellule mais aussi des organismes. Au-delà de son rôle dans l'élimination des polypeptides anormaux et le maintien de l'homéostasie cellulaire, cette dégradation est aussi responsable de la production des peptides antigéniques présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, sur laquelle s'appuie toute réponse immune spécifique. Par ailleurs, elle confère un caractère irréversible à certains processus biologiques fondamentaux, comme la progression unidirectionnelle dans le cycle cellulaire, la différenciation ou l'apoptose. La protéolyse intracellulaire affecte donc des fonctions importantes de l'organisme comme l'organogenèse, la morphogenèse ou encore l'angiogenèse. En raison de son importance biologique, il était raisonnable de suspecter que des altérations des mécanismes de la protéolyse intracellulaire puissent avoir des conséquences pathologiques, en particulier dans le cadre du cancer. Récemment, de multiples travaux ont effectivement démontré l'implication des perturbations de la protéolyse intracellulaire dans un grand nombre de tumeurs.

ADRESSE

P. Ferrara, C. Acquaviva, G. Bossis, M. Piechaczyk, I. Jariel-Encontre : Institut de génétique moléculaire, Cnrs UMR 5535/IFR 24, 1919, route de Mende, BP 5051, 34293 Montpellier Cedex 05, France.

m/s n°1, vol. 17, janvier 2001

Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur jouent un rôle-clé dans la carcinogenèse : en effet, l'activation des premiers favorise le développement tumoral alors que la diminution d'activité des seconds entraîne la perte des contrôles physiologiques de la prolifération cellulaire. On sait depuis longtemps que les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation d'oncogènes, ou à la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs, sont nombreux et variés. Il est récemment devenu clair que le dérèglement des mécanismes de dégradation des protéines codées par ces gènes, contribue de façon importante à la transformation cellulaire. Ainsi, dans de nombreuses tumeurs, l'activité et l'abondance de certaines protéines onco-suppressives sont réduites ou quasi-inexistantes, en raison d'une dégradation illégitime ou accélérée. Inversement,

certaines protéines oncogéniques sont caractérisées par une demi-vie plus longue que celle de leurs équivalents proto-oncogéniques, entraînant leur accumulation anormalement élevée, ou hors des fenêtres physiologiques d'expression, et qui contribue à leur activité tumorigène. Les mécanismes aboutissant à la dégradation anormale d'une protéine sont variés. Les mutations affectant certaines protéines onco-suppressives ou oncogéniques peuvent, par exemple, modifier leur reconnaissance par les systèmes protéolytiques, ou par les systèmes qui adressent ces protéines vers les complexes protéolytiques. Dans d'autres cas, la mutation oncogénique n'affecte pas la protéine onco-suppressive ou proto-oncogénique elle-même, mais un composant d'une voie de signalisation, modifiant ainsi le degré de phosphorylation de la protéine et sa sensibilité à la dégradation. Enfin, certains des composants des systèmes d'adressage vers les systèmes protéolytiques, et tout particulièrement vers la voie ubiquitine/protéasome (voir [1]), sont eux-mêmes des protéines onco-suppressives ou proto-oncogéniques, dont l'altération de l'activité contribue à l'établissement tumoral.

Comme nous l'illustrerons au travers d'exemples soulignant la diversité des tumeurs et des mécanismes oncogéniques mis en jeu, le fonctionnement du système Ub/protéasome, ou la reconnaissance de protéines oncogéniques ou onco-suppressives par ce dernier, sont altérés dans de nombreuses tumeurs. Soulignons cependant qu'il existe de nombreuses protéases intracellulaires (probablement plusieurs centaines), dont certaines peuvent potentiellement exercer des effets oncogéniques. C'est le cas des calpaïnes, qui sont des protéases cytoplasmiques abondantes, et dont l'activité exacerbée est responsable de la destruction anormale de la protéine onco-suppressive NF2 dans certains schwannomes et méningiomes [2]. C'est probablement aussi le cas des caspases dont l'activité est réduite, ou dont les mécanismes d'activation sont altérés dans différentes tumeurs, ce qui favorise la survie des cellules cancéreuses [3].

La voie ubiquitine/protéasome

Celle-ci constitue la voie principale de dégradation protéolytique intracellulaire de type non lysosomiale. La destruction des protéines via la voie Ub/protéasome s'effectue en deux étapes : dans un premier temps, les protéines substrats sont « marquées » pour la dégradation par

l'addition covalente de chaînes d'ubiquitine, une petite protéine de 76 acides aminés stable et extrêmement conservée. Dans un second temps, ces protéines sont reconnues par le protéasome 26S par l'intermédiaire de ces chaînes d'ubiquitine, puis hydrolysées (pour plus de détails, voir légendes des figures 1 A-B). L'ubiquitylation fait intervenir successivement trois catégories d'enzymes

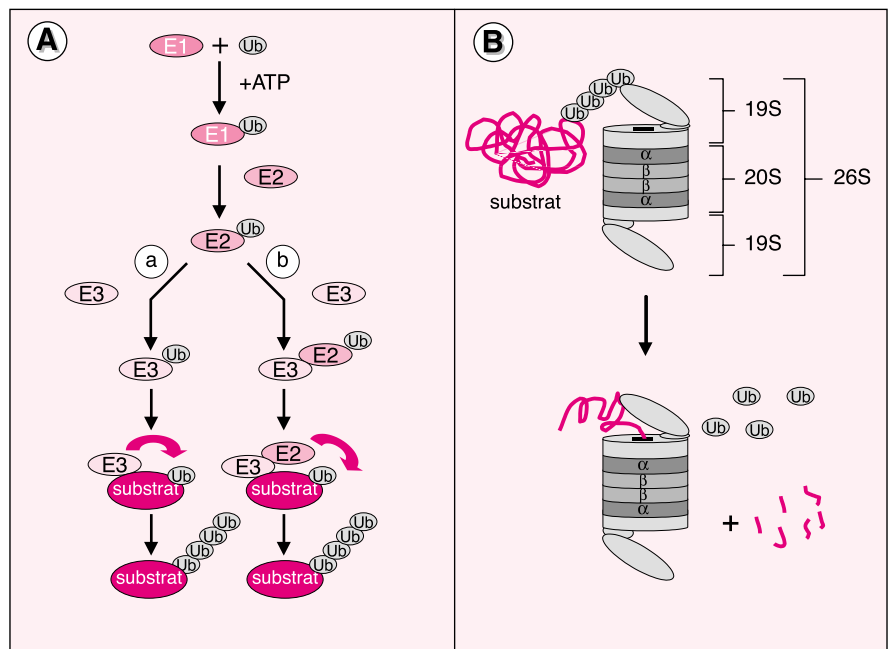


Figure 1. **Représentation schématique de la voie ubiquitine/protéasome.** **A. La voie de l'ubiquitine.** En présence d'ATP, l'enzyme E1 (ubiquitin-activating enzyme) active l'ubiquitine par un mécanisme conduisant à la formation d'une liaison riche en énergie. L'ubiquitine est ensuite transférée sur l'une des multiples enzymes E2 (ubiquitin-conjugating or ubiquitin-carrier enzyme) de la cellule. Les enzymes E3 (ubiquitin ligase) assurent la spécificité d'ubiquitylation des substrats et permettent la conjugaison de l'ubiquitine par deux mécanismes différents : soit (1) elles fixent elles-mêmes l'ubiquitine qui leur est donnée par une enzyme E2, et la transfèrent ensuite sur un substrat spécifique (a), soit (2) elles jouent le rôle d'adaptateur moléculaire entre l'enzyme E2 et le substrat (b). **B. Le protéasome 26S.** Il est formé d'un cœur protéolytique, le protéasome 20S, et de deux complexes régulateurs 19S. Le protéasome 20S est constitué par l'empilement de quatre anneaux, identiques deux à deux, comprenant chacun 7 sous-unités. Les activités protéolytiques sont portées par les sous-unités β et sont situées à l'intérieur de la structure cylindrique creuse du 20S. Les sous-unités α n'ont pas d'activité enzymatique et interviennent, entre autres, dans l'interaction avec les complexes régulateurs. Le complexe régulateur 19S est formé de 18 sous-unités. Au moins l'une de ces sous-unités interagit avec les polymères d'ubiquitine fixés sur les substrats. Six ATPases ont également été identifiées, et sont impliquées dans la dénaturation des substrats, un événement nécessaire à leur entrée dans la chambre interne de protéolyse. Une activité isopeptidase (ubiquitin hydrolase) libère les molécules d'ubiquitine présentes sur les protéines à dégrader et permet ainsi leur recyclage. Il existe aussi d'autres isopeptidases non associées au protéasome dans la cellule. Le protéasome 26S dégrade les protéines en peptides de 4 à 15-20 acides aminés.

(figure 1A). L'enzyme E1, unique, sert à activer les molécules d'ubiquitine qui sont ensuite transférées sur les multiples enzymes E2, dites de conjugaison. Enfin, l'ubiquitine est transférée d'une E2 sur les protéines cibles, grâce à des enzymes E3 (ubiquitine ligases) qui confèrent la spécificité de substrat à la réaction. Si un certain nombre d'enzymes E3, dont certaines sont des complexes multimériques modulaires [1], ont été récemment caractérisées, la plupart des activités E3 restent probablement à identifier. Par ailleurs, il existe dans la cellule une classe d'enzymes, appelées ubiquitine hydrolases, dont la fonction est d'hydrolyser les chaînes d'ubiquitine. Cette activité est nécessaire, tant pour permettre l'entrée des substrats dans la chambre catalytique du protéasome que pour recycler l'ubiquitine. L'activité des ubiquitine hydrolases entre également en compétition avec l'ubiquitinylation de certains substrats, et donc avec leur destruction. Soulignons que la simple surexpression de l'ubiquitine hydrolase Tre-2 est suffisante pour conférer des propriétés de transformation à des fibroblastes embryonnaires murins [4]. Enfin, la dégradation des protéines est très majoritairement gouvernée par l'étape d'ubiquitinylation des substrats, dont la reconnaissance par les enzymes E2 et E3 est souvent contrôlée par les cascades de signalisation intracellulaire ou l'association avec d'autres partenaires protéiques.

Stabilisation de protéines oncogéniques

Comme nous l'avons mentionné plus haut, l'une des perturbations des événements de protéolyse intracellulaire fréquemment observée dans les tumeurs est la stabilisation de proto-oncoprotéines. Deux mécanismes sont essentiellement mis en jeu : il peut s'agir d'altérations structurales de la protéine, pouvant entraîner la perte ou l'inaccessibilité des motifs qui confèrent la sensibilité au système Ub/protéasome. C'est ainsi le cas des protéines c-Myc mutées dans certains lymphomes de Burkitt, en raison de la translocation du gène *c-myc* dans l'un des locus codant pour les immunoglobulines [5]. La stabilisation

de proto-oncoprotéines peut également intervenir suite à leur phosphorylation, due à l'activation oncogénique de protéines de signalisation intracellulaire. Ainsi, l'un des effets de l'activation oncogénique de la protéine Ras, observée dans de nombreux cancers, est la stabilisation de la protéine c-Myc *via* une phosphorylation spécifique [6], et cet effet est nécessaire pour une coopération efficace entre ces deux protéines dans des tests de transformation cellulaire.

Un autre exemple est celui de la β -caténine, dont la stabilisation a été observée à l'origine dans le syndrome de polypose adénomateuse familiale (FAP), une maladie héréditaire autosomique caractérisée par une prédisposition au cancer du côlon [7]. Ce syndrome résulte de mutations dans le gène suppresseur de tumeur *APC* (*adenomatous polyposis coli*) qui entraînent, dans plus de 90 % des cas, un clivage de la partie carboxy-terminale de la protéine correspondante. De façon frappante, le gène *APC* est également muté dans 80 % des cancers sporadiques du côlon exprimant des protéines identiques à celles des patients atteints de FAP [7].

Comment des mutations dans le gène *APC* peuvent-elles contribuer à la stabilisation de la β -caténine et à la tumorigenèse colorectale ? La β -caténine est une protéine ubiquitaire intervenant dans la cascade de signalisation mitogénique induite par le facteur de croissance Wnt-1. Elle joue cependant au moins deux rôles différents dans la physiologie cellulaire : l'un au niveau de l'adhérence cellulaire et l'autre au niveau de la prolifération cellulaire. Ainsi, en l'absence de signal Wnt-1, la β -caténine est faiblement abondante, car son processus de dégradation est activé. La β -caténine interagit principalement avec la cadhérine E, une protéine transmembranaire exprimée au niveau des plaques d'adhérence cellulaire, et dont le rôle suppresseur de métastase est largement documenté [8]. Dans ces conditions, le mécanisme de destruction de la β -caténine est le suivant : la protéine *APC* est phosphorylée par la sérine/thréonine kinase GSK3 β , active en l'absence de signal Wnt-1, au sein d'un complexe comprenant

une troisième protéine, l'axine (figure 2). *APC* recrute alors la β -caténine qui est à son tour phosphorylée par GSK3 β , permettant ainsi sa reconnaissance et son ubiquitinylation par l'une des enzymes E3 de la famille SCF, SCF^{TRCP} (voir figure 5 et [1]), puis son hydrolyse par le protéasome [9-11].

En revanche, en présence d'un signal mitogène Wnt, la destruction de la β -caténine est fortement ralentie, suite à l'inactivation de GSK3 β et l'inhibition subséquente de l'interaction β -caténine/*APC*. La β -caténine s'accumule alors dans la cellule et active un facteur de transcription appartenant à la famille Lef/Tcf, dont l'une des multiples cibles est le proto-oncogène *c-myc*. Dans les cellules colorectales cancéreuses, la protéine *APC* tronquée n'est plus capable d'interagir avec la β -caténine, ce qui entraîne l'accumulation de cette dernière et la stimulation constitutive des gènes cibles de Lef/Tcf (figure 2). Par ailleurs, il est intéressant de noter que 50 % des cancers sporadiques du côlon, portant un gène *APC* sauvage, expriment des taux élevés de β -caténine mutée. Or, ces mutations se situent au niveau des sites d'interaction avec *APC* et/ou de phosphorylation par la GSK3 β [12], renforçant ainsi l'idée d'un rôle central de la β -caténine dans la tumorigenèse colorectale. L'implication oncogénique de la β -caténine n'est cependant pas limitée à ce type de tumeurs car ces mêmes mutations, qui influencent la stabilité de la protéine, sont rencontrées dans 75 % des pilomatricomes [13], 60 % des carcinomes thyroïdiens anaplasiques [14] et 26 % des carcinomes hépatocellulaires [15].

Accélération de la dégradation de l'inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines p27 dans les cancers

A l'inverse de la situation précédente, la dégradation de certaines protéines onco-suppressives est accélérée dans de nombreuses tumeurs. Un exemple particulièrement riche, parce qu'il implique des mécanismes différents dans des situations très diverses, est celui de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 (figure 3).

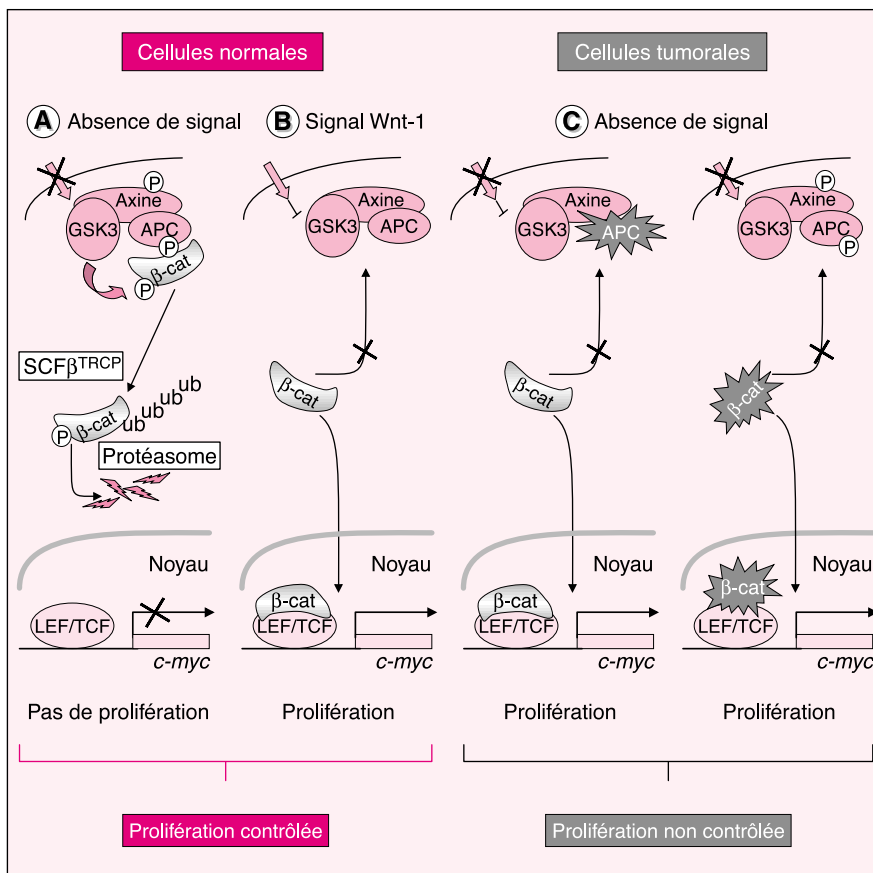


Figure 2. Mécanismes de la dégradation de la β -caténine dans les cellules normales et tumorales. **A.** Dans les cellules non stimulées par Wnt-1, la β -caténine est dégradée activement. La faible quantité de β -caténine qui s'accumule dans la cellule s'associe à la cadhérine E au niveau des plaques d'adhérence cellulaire (non montré). La kinase GSK3 β phosphoryle l'axine et la protéine APC engagées dans le complexe APC/Axine/GSK3. L'axine et l'APC phosphorylées recrutent la β -caténine qui est à son tour phosphorylée par GSK3, puis reconnue et ubiquitinylée par la E3 SCF ^{β TRCP}. **B.** Lorsque la cellule reçoit un signal Wnt-1, la kinase GSK3 est inactivée. En l'absence de phosphorylation, le complexe ne recrute plus la β -caténine. Cette dernière s'accumule, s'associe et active le complexe transcriptionnel Lef/Tcf qui stimule des gènes cibles comme c-myc. **C.** Dans les cellules tumorales, les mutations présentes sur APC (ou sur la β -caténine) ne permettent plus l'interaction avec la β -caténine (ou avec APC). Il y a alors activation constitutive des gènes sous contrôle du complexe transcriptionnel Lef/Tcf/ β -caténine, dont c-myc, même en absence de signal Wnt-1.

Il est maintenant bien établi que le cycle cellulaire est sous contrôle de l'activation et de l'inactivation séquentielles des complexes cyclines (cyc)/kinases dépendantes des cyclines (cdk) [16]. Les cdk, dont l'abondance varie peu au cours du cycle cellulaire, sont d'une part activées par fixation des cyclines et par des réactions de phosphorylation/déphosphorylation, et d'autre part inactivées par les inhibiteurs de cdk (cki). Ainsi, le cki p27 contrôle négativement l'activité de cdk2, en parti-

culier lorsque cette dernière est engagée dans le complexe cycE/cdk2, dont l'activité est nécessaire pour le démarrage de la réplication de l'ADN lors de la transition G1/S. L'expression de p27 est abondante dans les cellules soumises à des signaux antiprolifératifs, et diminue en fin de phase G1 en raison de sa dégradation par le système Ub/protéasome. L'ubiquitinylation de p27 est déclenchée de façon complexe, puisqu'elle nécessite la formation préalable d'un complexe trimérique

p27/cycE/cdk2 inactif, puis sa phosphorylation en *trans* sur la thréonine 187 (T187) par un complexe cycE/cdk2 actif [17, 18] (figure 3). Cet événement ne peut se produire qu'en fin de phase G1 alors que la synthèse de cycE est maximale et que, p27 devenant limitant, des complexes cycE/cdk actifs apparaissent. Comme dans le cas de la β -caténine, la E3 intervenant dans l'ubiquitinylation de p27 est un complexe de la famille SCF, dont le composant Skp2 reconnaît et recrute p27 via la thréonine 187 phosphorylée. Cette protéine Skp2 [19] n'est exprimée dans la cellule qu'en fin de phase G1, ce qui confère un niveau de sélectivité supplémentaire à la dégradation de p27.

Le gène p27 n'a encore jamais été trouvé sous une forme transcriptionnelle inactive ou mutée dans une tumeur humaine. Cependant, une expression très faible de p27, liée à la déstabilisation de la protéine, est observée dans de nombreux cancers humains [20]. Ce faible taux d'expression est corrélé avec l'agressivité de la tumeur et un très mauvais pronostic. Les mécanismes impliqués dans cette dégradation anormale sont encore inconnus. Il est cependant intéressant de noter que cycE est surexprimée dans certains cancers (sein, estomac et côlon), et que l'abondance de Skp2 est aussi anormalement élevée dans de nombreuses cellules transformées [19]. Il semble donc très important de déterminer si cycE et/ou Skp2 sont fortement exprimées dans les tumeurs exprimant faiblement p27. Si tel était le cas, il serait alors nécessaire de caractériser les mécanismes intimes d'activation oncogénique de Skp2 et/ou de cycE et de déterminer si p27 est l'une de leurs principales cibles.

Une relocalisation intracellulaire anormale peut aussi participer à l'inactivation de p27, associée à une destruction accélérée. C'est le cas par exemple dans le syndrome de la sclérose tubéreuse (*tuberosus sclerosis complex* ou TSC), une maladie dominante autosomique caractérisée par un retard mental et l'apparition de tumeurs variées. Les cellules tumorales sont caractérisées par un cycle cellulaire dans lequel la phase G1 est écourtée et une activité cdk impor-

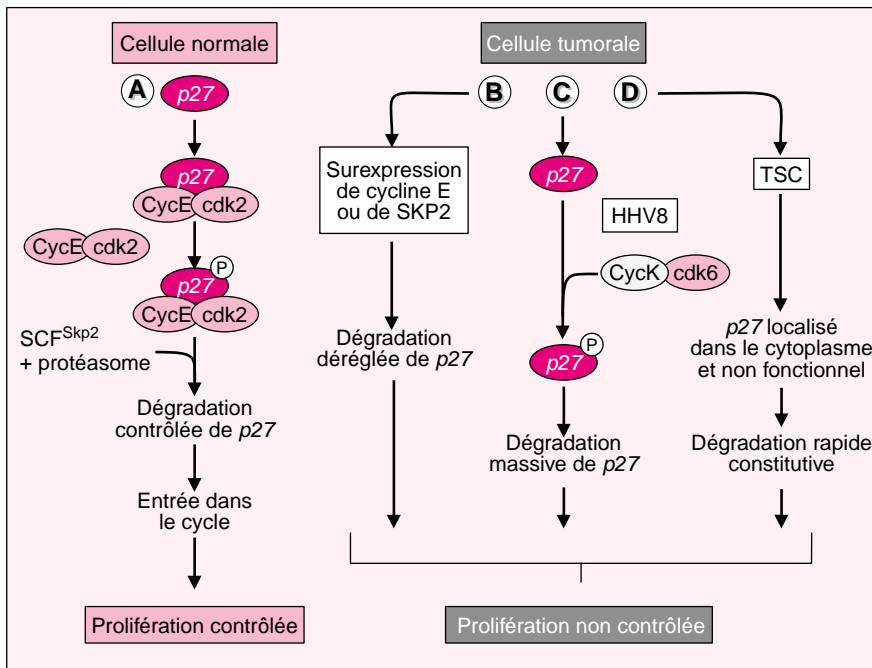


Figure 3. **Mécanismes de la dégradation de p27 dans les cellules normales et tumorales.** **A.** Dans les cellules normales, p27 est ubiquitinylé par le complexe SCF^{SKP2}, après phosphorylation du résidu thréonine 187 par des complexes cycE/cdk2 actifs. Dans les cellules tumorales, la dégradation accélérée de p27 peut résulter de différents mécanismes. **B.** La surexpression de cycE ou de Skp2. **C.** Dans le cas du sarcome de Kaposi, la cycline K, codée par le virus HHV8 se substitue de façon très efficace à cycE pour entraîner une dégradation massive de p27. **D.** Dans le cas du syndrome TSC, une localisation cytoplasmique aberrante est associée à une grande instabilité dont les mécanismes sont inconnus.

tante. En outre, la localisation cytoplasmique de p27 est aberrante, ne lui permettant plus d'inhiber les complexes cyc/cdk nucléaires, et son abondance est très faible en raison de sa durée de vie raccourcie [21]. Les mécanismes responsables de cette localisation cytoplasmique anormale et de la dégradation accélérée de p27 ne sont pas encore caractérisés, et la contribution réelle de la déstabilisation de p27 au processus tumorigène n'est pas formellement établie. Cependant, il est raisonnable de penser que la dégradation cytoplasmique active de p27 est cruciale dans le processus tumorigénique car une protéine p27 stable pourrait s'accumuler dans le cytoplasme et diffuser dans le noyau, où elle jouerait alors son rôle d'inhibiteur de la division cellulaire.

La diminution de l'abondance de p27 peut également avoir une étiologie virale. Ainsi, l'apparition du sarcome de Kaposi chez les patients atteints de SIDA est liée à l'infection

par le virus herpétique HHV8 (ou KSHV), qui a développé une stratégie propre pour diminuer l'abondance de p27. La cycline cycK, codée par le génome viral, s'associe à un cdk cellulaire (cdk6) dont elle modifie le répertoire de substrats. Ainsi, cdk6 devient, entre autres, capable de phosphoryler p27 sur la T187 et donc d'enclencher l'ubiquitinylation et la dégradation de cette dernière. Bien qu'il ne soit pas encore formellement prouvé que cycK soit impliquée dans la tumorigénèse due à HHV8, il est vraisemblable qu'en raison de l'absence de p27, les cellules infectées continuent à se diviser, constituant ainsi un environnement propice pour la réplication du virus [22, 23].

Soulignons pour conclure que si la destruction accélérée est un mode d'inactivation important de p27 dans les tumeurs, ce n'est pas le seul, et d'autres mécanismes ont été décrits. Par exemple, l'activation oncogénique de Ras stabilise la protéine c-

Myc (voir plus haut) et induit la stimulation des cibles transcriptionnelles de cette dernière, comme les gènes des cyclines D, et *in fine* l'inactivation de p27 par séquestration dans des complexes cycD/cdk/p27 [24].

p53, MDM2, E6 et cancers

La protéine p53 est un facteur de transcription onco-suppressif stabilisé dans certaines tumeurs et déstabilisé dans d'autres. Par ailleurs, le gène p53 est engagé dans une boucle d'autorégulation impliquant le proto-oncogène *mdm2* dont le produit a une activité E3.

Les fonctions biologiques connues de p53 sont de prévenir d'une part la propagation des altérations de l'ADN génomique, et d'autre part la prolifération cellulaire induite par des signaux oncogéniques ou hyperprolifératifs aberrants. p53 est une protéine métaboliquement instable, essentiellement dégradée par la voie Ub/protéasome, et son activation fonctionnelle est en général liée à une stabilisation importante. L'accumulation qui en résulte permet à p53 de moduler l'expression de gènes contrôlant la progression dans le cycle, la réparation de l'ADN et l'apoptose. Des travaux récents ont montré que la proto-oncoprotéine Mdm2 (aussi appelée Hdm2 chez l'homme), dont la synthèse est induite par p53, et qui inhibe l'activité transcriptionnelle de p53, est aussi une E3 physiologique de cette dernière [25, 26]. Lorsqu'une cellule est soumise à un stress génotoxique, la phosphorylation de p53, vraisemblablement par le biais des kinases ADN-PK et/ou ATM, empêche l'interaction avec Mdm2 et donc son ubiquitinylation. Par ailleurs l'activité de Mdm2 est elle-même contrôlée par une protéine onco-suppressive, p19^{ARF} (appelée chez l'homme p14^{ARF}), dont la synthèse est induite en réponse aux signaux hyperprolifératifs et oncogéniques. p19^{ARF} se lie à Mdm2 et prévient la destruction de p53 en inhibant, entre autres, l'activité E3 de Mdm2, et en accélérant la dégradation de cette dernière [25, 27-29] (figure 4).

La fonction onco-suppressive de p53 est altérée dans la majorité des cancers humains. Pour une fraction d'entre eux, cette perte de fonction

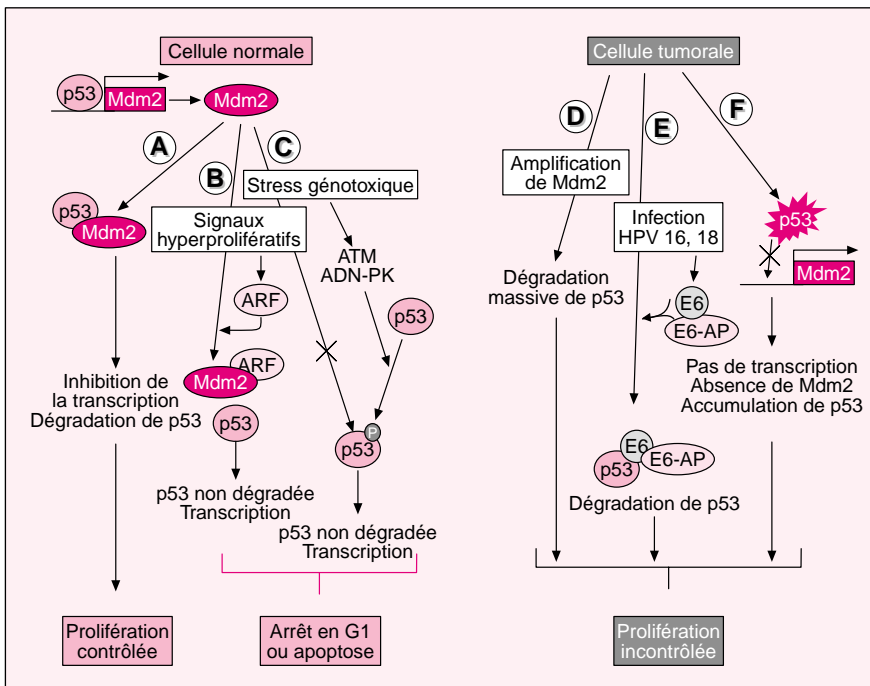


Figure 4. Mécanismes de la dégradation de p53 dans les cellules normales et tumorales. Dans les cellules normales et en l'absence de stress, le taux d'expression de p53 est maintenu très bas par une boucle d'autorégulation négative via l'activité E3 de Mdm2, dont le gène est une cible de p53 (A). En réponse à des signaux hyperprolifératifs la protéine onco-suppressive p19^{ARF} est exprimée. En interagissant avec Mdm2, elle prévient l'inactivation et la dégradation de p53 (B). En réponse à des stress génotoxiques, p53 est phosphorylée par les sérine-thréonine kinases ATM et/ou DNA-PK, ce qui inhibe l'interaction Mdm2/p53 (C). Ces deux mécanismes conduisent à une stabilisation de p53 et à l'activation des gènes impliqués dans l'arrêt en G1 et/ou l'apoptose. La déstabilisation de p53 dans de nombreux sarcomes est due à une surexpression de Mdm2 (D), alors que dans les cancers liés à HPV16 et 18 la déstabilisation de p53 est due à la présence de l'oncoprotéine virale E6, qui, en s'associant à la E3 cellulaire E6-AP, entraîne l'ubiquitinylation de p53 (E). Dans d'autres types de cancers, la perte de la fonction onco-suppressive de p53 n'est pas liée à la déstabilisation de la protéine, mais au contraire à une stabilisation liée soit à des mutations qui abolissent son activité transcriptionnelle, soit à une localisation anormale. Dans les deux cas, il y a alors absence de synthèse de Mdm2 et donc forte diminution de la dégradation de p53 (F).

est directement liée à une dégradation accélérée de la protéine selon deux processus différents. Ainsi, dans 40 à 60 % des sarcomes humains, p53 est synthétisée sous sa forme sauvage, et est dégradée très activement. Cette dégradation est due à une forte abondance de la protéine Mdm2 résultant de l'amplification du gène *mdm2* [30, 31]. Soulignons, bien que le cas n'ait jamais encore été documenté, que des mutations abolissant la fonction de p19^{ARF} ou qu'une diminution de l'expression de cette dernière pourrait contribuer à l'absence de stabilisation de p53 en réponse aux signaux hyperprolifératifs. La protéine p53 est

également déstabilisée dans les cancers du col de l'utérus induits par les virus du papillome HPV16 et 18, cette déstabilisation étant essentiellement sous la dépendance de la protéine oncogénique virale E6. Celle-ci recrute une E3 cellulaire, E6-AP (*E6-associated protein*), qui ne reconnaît pas p53 dans les cellules non infectées, pour former un complexe E6/E6-AP capable d'ubiquitinyler efficacement p53 [26]. Contrairement à la situation précédente, p53 est fortement exprimée dans certaines tumeurs, en raison soit de mutations conduisant à une perte de l'activité transcriptionnelle,

soit d'une localisation cytoplasmique aberrante qui préviennent, entre autres, l'induction de la synthèse de la protéine Mdm2 et donc de la boucle d'autorégulation négative [26].

pVHL : un suppresseur de tumeur à activité E3-ligase

La maladie de von Hippel Lindau (VHL), identifiée depuis une centaine d'années, est un syndrome rare d'origine génétique, causé par une mutation germinale sur un allèle du gène *vhl* et caractérisé par le développement de tumeurs variées (carcinomes du rein à cellules claires ou RCC, tumeurs de la rétine...) [32]. Le gène *vhl* existe également sous forme mutée, avec perte d'hétérozygotie, dans 80 % des RCC sporadiques. Les tumeurs dans lesquelles le gène *vhl* est déficient sont toujours hautement vascularisées, et surexpriment l'érythropoïétine et des peptides angiogéniques tels que le VEGF, dont l'expression physiologique est généralement restreinte aux conditions d'hypoxie.

In vivo, pVHL est associée à d'autres protéines au sein d'un complexe E3 multimérique, appelé CBC^{VHL} [33-35], qui présente de nombreuses analogies structurales et fonctionnelles avec les complexes de type SCF (pour plus de détails voir [1, 36] et figure 5). Au sein de CBC^{VHL}, pVHL interagit avec l'élongine C par un motif appelé BC [35, 37] et joue vraisemblablement un rôle équivalent à celui des protéines à boîte F du SCF pour recruter les substrats de l'ubiquitinylation. L'interaction de pVHL avec les élongines a un rôle fonctionnel important dans la fonction suppresseur de tumeur de pVHL, puisque chez les patients atteints de VHL, les mutations les plus fréquentes sont localisées dans la boîte BC. Une autre zone de mutations fréquentes n'affectant pas l'intégrité du complexe CBC^{VHL} est située sur le côté opposé de la liaison à l'élongine C. Ce domaine de pVHL correspondrait à une zone d'interaction protéine-protéine potentiellement impliquée dans la reconnaissance des substrats [37, 38].

Comment expliquer la forte vascularisation des tumeurs associées à la

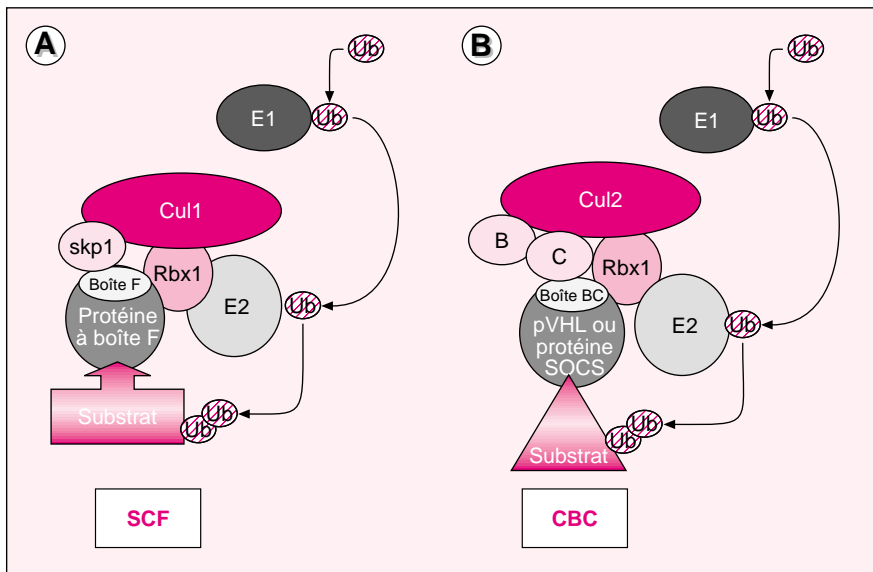


Figure 5. **Représentations schématiques des E3 SCF et CBC.** **A.** Le complexe SCF sert d'adaptateur entre le substrat et l'enzyme E2. Il est formé d'un cœur protéique et d'une protéine à boîte F interchangeable dont la fonction est de sélectionner les substrats à ubiquitinyler [1, 47]. Les protéines cœurs sont : la culline 1 (ou *cdc53* chez la levure), SKP1 et une protéine à RING finger, Rbx1. Rbx1 (aussi appelée *Roc1* ou *Hrt1* chez la levure) permet le recrutement de E2 (*cdc34* chez la levure, et peut-être Ubch3 chez l'homme) et assiste vraisemblablement l'acte catalytique d'ubiquitinylation. Les protéines à boîte F interagissent avec SKP1 via leur motif F. Elles possèdent en outre un ou des motifs d'interaction protéine-protéine (motif WD40 ou motif riche en leucines) permettant la reconnaissance et le recrutement des substrats. Dans tous les cas rapportés, les protéines à boîte F reconnaissent des motifs phosphorylés sur leurs protéines cibles. À l'heure actuelle, plus d'une centaine de protéines à boîte F ont été identifiées, mais on ignore encore si toutes participent à la constitution d'activité E3. **B.** Le complexe CBC, de façon analogue au complexe SCF, est un adaptateur entre une E2 (probablement Ubch3 ou Ubch5) et ses substrats. Il est formé d'un cœur protéique comprenant la culline 2, les élongines B (présentant des homologies avec l'ubiquitine) et C (ayant des homologies avec Skp1), Rbx1, et très vraisemblablement d'une protéine interchangeable assurant la reconnaissance des substrats. Une seule de ces protéines supposées adaptatrices a été identifiée à ce jour, il s'agit de pVHL. D'autres protéines contiennent un motif BC imbriqué dans une boîte dite SOCS, initialement identifié dans les protéines du même nom (pour suppressor of cytokine signaling [27, 33]). Certaines d'entre elles pourraient faire partie de la famille des protéines adaptatrices de CBC.

perte de pVHL? En condition de normoxie, pVHL est nécessaire à la dégradation active du facteur de transcription HIF1 α , impliqué dans l'expression de gènes induits par l'hypoxie, comme le VEGF, ainsi qu'à la dégradation rapide des ARNm codés par ces mêmes gènes. Il est tentant de supposer que l'ubiquitinylation de ce dernier soit sous le contrôle de CBC^{VHL}, puisque la dégradation de HIF1 α implique la voie Ub/protéasome et que pVHL interagit avec HIF1 α (bien que l'on ne sache pas encore si la liaison est directe) [39]. Les ARNm, dont la sta-

bilité est sous contrôle de pVHL, possèdent une séquence déstabilisatrice dans leur région 3' non codante [40], dont la fonction est bloquée en condition d'hypoxie, vraisemblablement par l'intermédiaire d'une liaison avec des protéines absentes en normoxie [41]. Comme pour HIF1, une hypothèse attrayante serait que ces dernières soient efficacement ubiquitinyliées par le complexe CBC^{VHL} (figure 6) en conditions de normoxie. Le rôle de pVHL ne se limite pas au contrôle des gènes induits par l'hypoxie. Le gène est ainsi impliqué dans le contrôle de la stabilité de

l'inhibiteur de cdk p27 et de l'arrêt du cycle cellulaire lors de la carence en sérum [34] ou encore dans la formation de la matrice extracellulaire, en particulier au niveau du réseau de fibronectine [42]. Il serait intéressant de déterminer si l'implication de pVHL dans ces processus passe aussi par son activité E3.

Quelles perspectives thérapeutiques anticancéreuses ?

A travers les quelques exemples présentés ici, il apparaît très clairement que l'altération de la protéolyse intracellulaire peut contribuer de façon importante au développement tumoral, et il est très vraisemblable que de nouvelles perturbations des systèmes de protéolyse et/ou d'adressage des substrats vers ces derniers soient décrites dans le futur. Il est aussi vraisemblable que la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de ces dérégulations pourra conduire à la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses.

De multiples approches sont en effet possibles. Des chimiothérapies fondées sur l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome sont envisageables, puisque certains de ces inhibiteurs entraînent plus efficacement la mort cellulaire de certaines cellules tumorales que celle des cellules normales, dans divers modèles précliniques animaux [43, 44]. Certaines de ces drogues sont d'ailleurs dès maintenant utilisées dans des essais cliniques de phase I. Leur toxicité générale est cependant élevée et il serait souhaitable de développer des stratégies plus ciblées, afin d'atténuer les effets secondaires des traitements. La sélectivité de l'ubiquitinylation des protéines étant assurée par les activités E3, le développement des drogues inhibant des E3 spécifiques de protéines onco-suppressives permettrait de ralentir ou d'inhiber la prolifération tumorale. Inversement, des agents pharmacologiques activant ou stimulant des E3 spécifiques de certaines oncoprotéines pourraient avoir le même effet. Une alternative intéressante pourrait également consister à interférer, non pas avec le système Ub/protéasome lui-même, mais avec la reconnaissance

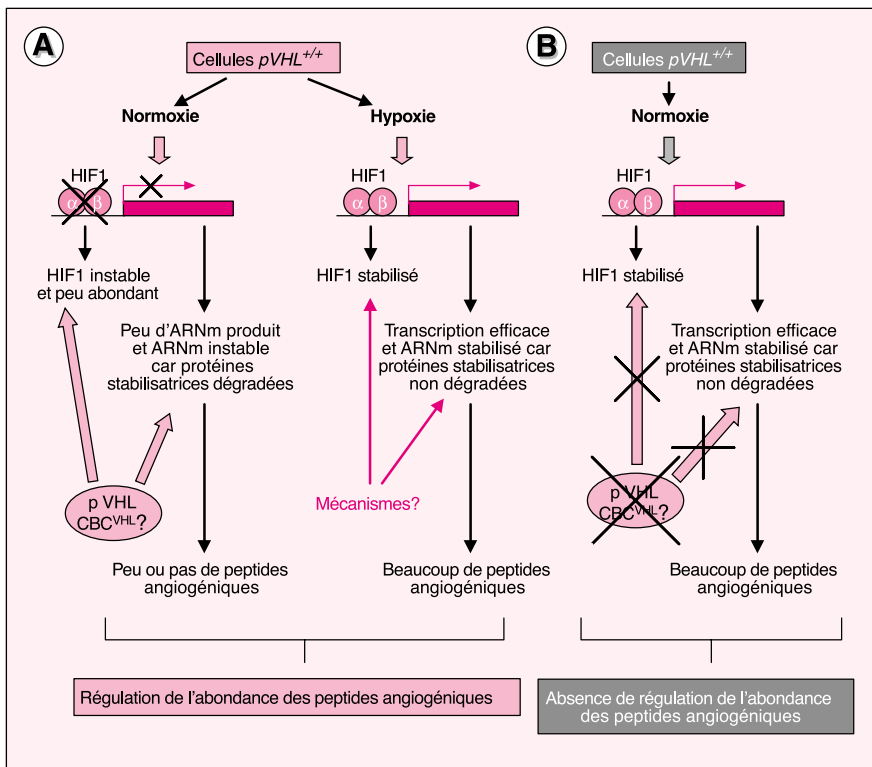


Figure 6. **Régulation de l'abondance par pVHL des polypeptides produits en réponse à l'hypoxie.** A. Dans des conditions de normoxie, l'instabilité du facteur de transcription HIF1 α ainsi que l'instabilité des ARNm, dont l'expression est sous contrôle de HIF1 α , concourent à maintenir un taux d'expression très bas ou nul des protéines, comme les protéines angiogéniques, dont l'expression est induite en condition d'hypoxie. Cette instabilité est strictement sous la dépendance de pVHL. Quand la pression en oxygène diminue (hypoxie), HIF1 α et les protéines (exprimées en condition d'hypoxie) stabilisant les ARNm sont elles-mêmes stabilisées par un mécanisme encore mal caractérisé. B. En conditions de normoxie, les cellules pVHL $^{-/-}$ ne sont pas capables de réprimer l'expression des gènes induits naturellement par l'hypoxie. Ceci conduit à une accumulation de peptides angiogéniques et explique le caractère hypervasculaire des tumeurs pVHL $^{-/-}$.

des substrats par ce dernier. Ainsi, l'inhibition ou l'activation de certaines cascades de signalisation intracellulaires devraient permettre d'activer la destruction d'oncoprotéines, ou à l'inverse de ralentir celle de protéines onco-suppressives. La vitesse de dégradation des protéines étant souvent influencée par l'association avec d'autres partenaires, protéiques ou non, le développement de ligands spécifiques des protéines dont on souhaite moduler la destruction peut également représenter une approche attrayante. L'utilisation de l'acide rétinoïque tout-*trans* (RA) et du trioxyde d'arsenic (AS) dans le traitement des leucémies promyélocyaires aiguës est à cet égard instructive. Dans les cellules leucémiques, une

translocation t(15;17) a pour résultat la fusion du gène du récepteur nucléaire RAR α avec celui d'une protéine de la matrice nucléaire, appelée PML. Une protéine oncogénique, PML-RAR α , est ainsi produite, qui empêche d'une part la différenciation terminale naturellement contrôlée par RAR α et d'autre part, la mort cellulaire contrôlée par PML. L'administration des deux drogues RA et AS aux malades induit une dégradation spectaculaire de PML-RAR α par le protéasome [45], ce qui permet la différenciation des cellules tumorales (et aussi de l'apoptose dans le cas d'AS) et se traduit par des rémissions cliniques. De façon intéressante, la chimiothérapie par RA est également utilisée pour induire la

différenciation des neuroblastomes en clinique, et l'un des effets caractérisés de cette drogue est la stabilisation de l'inhibiteur de cdk p27, qui participe très certainement à l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses [46]. Le mécanisme moléculaire de cette stabilisation n'est cependant pas encore élucidé et est probablement indirect, à la différence de l'effet observé sur PML-RAR α . Il n'en reste pas moins que ces observations semblent confirmer qu'il est possible d'interférer avec des événements de protéolyse intracellulaire et d'apporter un bénéfice thérapeutique, et sont encourageantes pour les recherches engagées dans cette voie ■

RÉFÉRENCES

- Coux O, Piechaczyk M. Le système ubiquitine/protéasome : un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines. *Med Sci* 2000 ; 16 : 623-9.
- Kimura Y, Koga H, Araki N, *et al.* The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nat Med* 1998 ; 4 : 915-22.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 ; 100 : 57-70.
- Papa FR, Hochstrasser M. The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature* 1993 ; 366 : 313-9.
- Salghetti SE, Kim SY, Tansey WP. Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J* 1999 ; 18 : 717-26.
- Sears R, Leone G, DeGregori J, *et al.* Ras enhances Myc protein stability. *Mol Cell* 1999 ; 3 : 169-79.
- Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996 ; 87 : 159-70.
- Jeanteur P, Cadrène E et suppression de l'invasion tumorale. *Bull Cancer* 1998 ; 85 : 297-8.
- Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis: a look outside the nucleus. *Science* 2000 ; 287 : 1606-9.
- Peifer M. Beta-catenin as oncogene : the smoking gun. *Science* 1997 ; 275 : 1752-3.
- Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, *et al.* Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 1998 ; 8 : 573-81.

RÉFÉRENCES

12. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, *et al.* Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 1130-4.
13. Chan EF, Gat U, McNiff JM, *et al.* A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet* 1999; 21: 410-3.
14. Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, *et al.* Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 1811-5.
15. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, *et al.* Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8847-51.
16. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-12.
17. Carrano AC, Eytan E, Hershko A, *et al.* SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 193-9.
18. Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, *et al.* Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 1999; 13: 1181-9.
19. Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, *et al.* p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 207-14.
20. Alessandrini A, Chiaur DS, Pagano M. Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation. *Leukemia* 1997; 11: 342-5.
21. Soucek T, Yeung RS, Hengstschlager M. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 upon loss of the tuberous sclerosis complex gene-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15653-8.
22. Ellis M, Chew YP, Fallis L, *et al.* Degradation of p27 (Kip) cdk inhibitor triggered by Kaposi's sarcoma virus cyclin-cdk6 complex. *EMBO J* 1999; 18: 644-53.
23. Mann DJ, Child ES, Swanton C, *et al.* Modulation of p27 (Kip1) levels by the cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *EMBO J* 1999; 18: 654-63.
24. Bouchard C, Thieke K, Maier A, *et al.* Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J* 1999; 18: 5321-33.
25. Honda R, Yasuda H. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J* 1999; 18: 22-7.
26. Kubbutat MH, Vousden KH. Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol Med Today* 1998; 4: 250-6.
27. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 1998; 92: 725-34.
28. Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, *et al.* Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 20-6.
29. Tao W, Levine AJ. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6937-41.
30. Blaydes JP, Gire V, Rowson JM, *et al.* Tolerance of high levels of wild-type p53 in transformed epithelial cells dependent on auto-regulation by mdm-2. *Oncogene* 1997; 14: 1859-68.
31. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, *et al.* Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358: 80-3.
32. Richard S, Olschwang S, Chauveau D, *et al.* La maladie de von Hippel-Lindau. *Med Sci* 1995; 11: 43-51.
33. Kamura T, Koepp DM, Conrad MN, *et al.* Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 1999; 284: 657-61.
34. Pause A, Lee S, Lonergan KM, *et al.* The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 993-8.
35. Lisztwan J, Imbert G, Wirbelauer C, *et al.* The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev* 1999; 13: 1822-33.
36. Gilgenkrantz S. Le gène *VHL* (von Hippel-Lindau): un nouveau complexe ubiquitine ligase? *Med Sci* 1999; 15: 1051-3.
37. Stebbins CE, Kaelin WG, Jr., Pavletich NP. Structure of the VHL-elonginC-elonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 1999; 284: 455-61.
38. Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, *et al.* Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12436-41.
39. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399: 271-5.
40. Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the von Hippel-Lindau protein. *J Biol Chem* 1996; 271: 25492-7.
41. Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, *et al.* Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 732-41.
42. Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, *et al.* The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell Biol* 1998; 1: 959-68.
43. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, *et al.* Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999; 59: 2615-22.
44. Teicher BA, Ara G, Herbst R, *et al.* The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2638-45.
45. Zhu J, Gianni M, Kopf E, *et al.* Retinoic acid induces proteasome dependent degradation of retinoic acid receptor α (RAR α) and oncogenic RAR α fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14807-12.
46. Borriello A, Pietra VD, Criscuolo M, *et al.* p27Kip1 accumulation is associated with retinoic acid-induced neuroblastoma differentiation: evidence of a decreased proteasome-dependent degradation. *Oncogene* 2000; 19: 51-60.
47. Margottin F, Lassot L, Durant H, *et al.* Phosphorylation et ciblage au protéasome: la F-box connection. *Med Sci* 1999; 15: 1008-14.

Summary

Intracellular proteolysis and tumorigenesis

Intracellular protein breakdown plays a pivotal role in cell biology. This process is involved in the control of essential cellular functions such as progression through the cell cycle, differentiation, apoptosis and the production of antigenic peptides. Thereby, proteolysis influences the organism's physiology, particularly at the level of organogenesis, morphogenesis, vascularization and the immune response. It is thus not surprising that intracellular proteolysis impairment contributes to oncogenesis. Recent literature has shown that the degradation of various proto-oncogenic and onco-suppressive proteins is altered in many cancer situations, and that some components of the intracellular proteolytic systems are also proto-oncoproteins or onco-suppressive proteins. The diversity of the proteolytic mechanisms affected in tumors can be illustrated through several examples involving the ubiquitin/proteasome system, which constitutes the main intracellular protein destruction pathway.

TIRÉS À PART

I. Jariel-Encontre.