

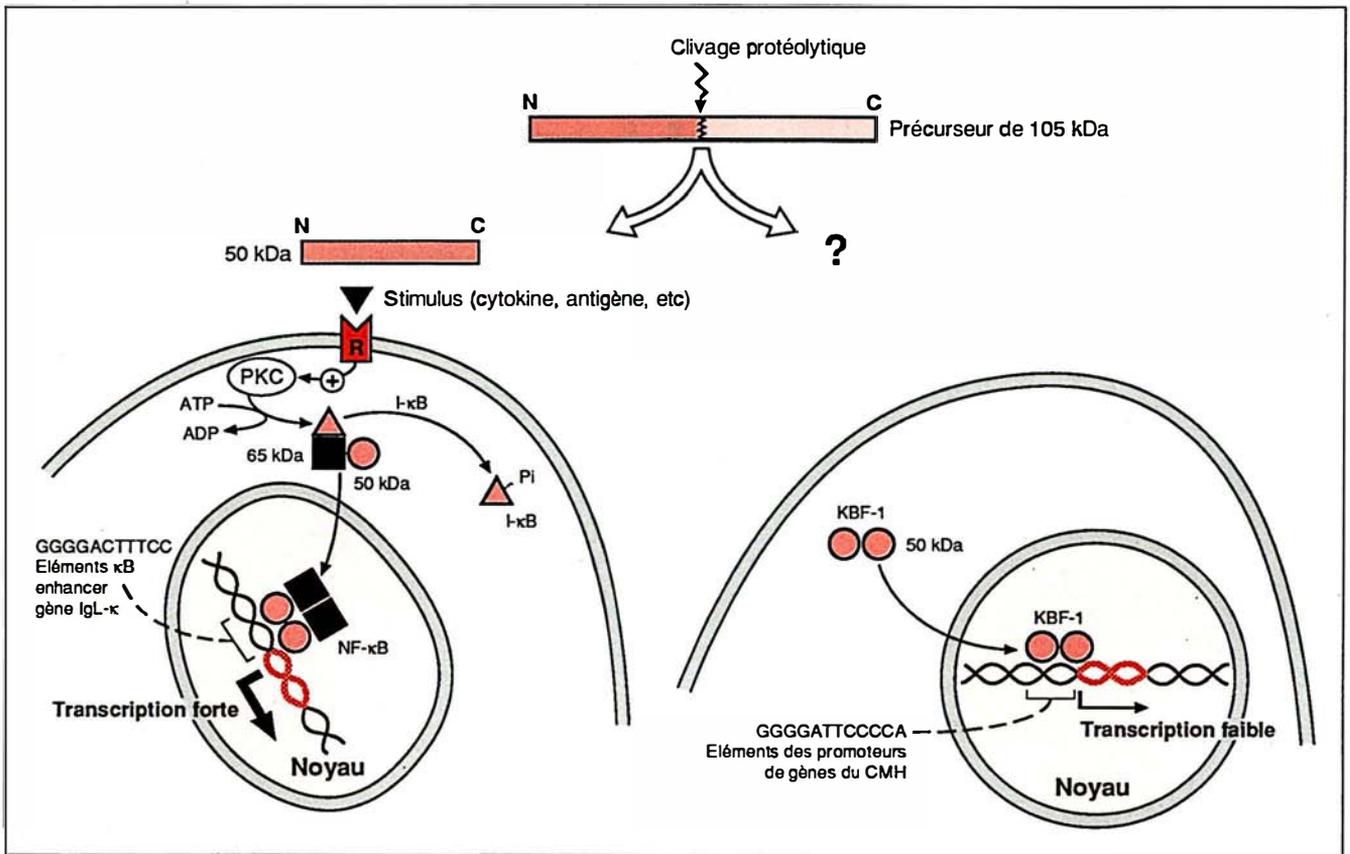
Les protéines NF- κ B, Dorsal et Rel Une nouvelle classe de facteurs de transcription

La régulation en *trans* de l'expression des gènes spécifiques de certains stades de différenciation tissulaire se fait principalement au niveau transcriptionnel et implique la mise en jeu de facteurs protéiques diffusibles qui contrôlent la structure de la chromatine et la fréquence d'initiation de nouveaux transcrits (*m/s* n° 1, vol. 3, p. 56 ; n° 7, vol. 3, p. 428 ; n° 8, vol. 3, p. 487 ; n° 9, vol. 3, p. 546). Certains des gènes codant pour ces facteurs sont eux-mêmes « tissu-spécifiques ». Tel est le cas des protéines de la famille POU Oct-2, présente dans les lymphocytes B, Pit 1/GHF 1, présente dans les cellules hypophysaires (*m/s* n° 3, vol. 5, p. 172), HNF 1, présente dans les hépatocytes, ou des protéines de la famille Myo D1, spécifiques du muscle (*m/s* n° 7, vol. 6, p. 635). Comme cela a déjà été discuté dans *m/s*, la totalité du déroulement d'un programme de différenciation ne peut cependant pas reposer uniquement sur de tels facteurs de régulation, car sinon émerge inmanquablement la question du régulateur initial des gènes de régulation (*m/s* n° 9, vol. 3, p. 546). En fait, un deuxième type de facteurs de transcription est d'expression plus ou moins ubiquitaire mais peut exister sous des formes biologiquement actives ou biologiquement inactives. Ici, ce n'est pas principalement l'expression des gènes de ces facteurs qui en contrôle l'activité biologique, mais des processus d'activation. Ces derniers peuvent être la liaison d'un ligand (par exemple, pour les récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes ou thyroïdiennes et de l'acide rétinoïque), une réaction de phosphorylation (par exemple, pour l'une des protéines responsables de la stimulation transcriptionnelle de gènes par l'AMP cyclique), l'association à

une autre protéine (par exemple, la formation des dimères Fos-Jun après stimulation par le sérum ou les esters de phorbol) ou une modification de compartimentation cellulaire (*m/s* n° 8, vol. 6, p. 803). La protéine NF- κ B est l'un de ces facteurs de transcription, présente dans pratiquement toutes les cellules mais devant être activée pour jouer son rôle biologique. Initialement détecté uniquement dans des extraits nucléaires de cellules B, NF- κ B se fixe sur un motif d'ADN localisé dans une séquence activatrice intronique du gène de la chaîne légère des immunoglobulines κ et est indispensable au fonctionnement de cette séquence [1]. On a d'abord pensé que ce facteur avait une distribution tissulaire restreinte, liée à l'activation des gènes d'immunoglobulines. En fait, on a rapidement constaté que NF- κ B était présent dans pratiquement toutes les cellules, mais inactivé par un mécanisme original. Ce facteur est, en effet, généralement localisé dans le cytoplasme où il est associé à une protéine inhibitrice. On peut résumer ce mécanisme de régulation de la manière suivante : la forme active (nucléaire) de NF- κ B est constituée par un hétérotétramère formé de deux molécules de 50 kDa dont une des fonctions est de se lier spécifiquement à l'ADN, et de deux molécules de 65 kDa dont la fonction est présentement inconnue. La forme cytoplasmique inactive semble être constituée au moins d'une molécule de la sous-unité 50 kDa, d'une molécule de la sous-unité 65 kDa, et d'une molécule inhibitrice I κ B. La sous-unité 65 kDa est indispensable pour l'interaction avec I κ B [2]. Cette dernière molécule est à la fois responsable de la localisation cytoplasmique et empêche la fixation à l'ADN du complexe.

Divers mécanismes d'activation permettent la translocation de la forme active dans le noyau : il semble qu'un événement de phosphorylation de la molécule I κ B impliquant probablement la protéine kinase C, soit responsable de sa dissociation qui serait suivie de la tétramérisation du complexe actif et de sa translocation nucléaire [3].

Suite à la détection de NF- κ B dans toutes les cellules analysées, on a progressivement montré qu'il était impliqué dans toute une série de mécanismes de régulation concernant une grande variété de gènes. Pour revenir à sa fonction originale, quand on traite des cellules pré-B (qui n'expriment pas les chaînes légères d'immunoglobulines et qui ne possèdent pas de NF- κ B nucléaires) par le LPS (polysaccharide de la membrane bactérienne), on induit, entre autres phénomènes, la translocation nucléaire du complexe et l'activation de ses gènes-cibles. D'autre part, l'étude de l'activation des cellules T par les esters de phorbol, divers mitogènes spécifiques ainsi que par des anticorps contre certains antigènes de surface a montré que ces stimulations se traduisaient par une activation de NF- κ B suivie d'une augmentation de la transcription de plusieurs gènes cibles. Parmi ceux-ci, on peut citer le gène de l'interleukine 2 et le gène de son récepteur [4]. D'autre part, le promoteur du virus HIV possède deux sites de fixation pour NF- κ B qui sont responsables de l'induction du virus à la suite de l'activation de sa cellule-hôte par des stimuli externes [5,7]. Parmi les autres gènes contrôlés par NF- κ B à la suite de stimulations particulières, on peut citer : le gène de l'interféron β en réponse à l'infection virale ou au traitement des cellules par de



l'ARN double-brin [6], les gènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité en réponse au TNF (*tumor necrosis factor*) [8], certains virus comme le SV40 et le cytomégalo-virus, les gènes du TNF et de l'interleukine 6 ; à ce sujet, comme NF-κB lui-même est inducible par le TNF et l'interleukine 1, on peut supposer que ce facteur joue un rôle important dans le réseau complexe des interactions entre cytokines.

Au vu de ces résultats on peut se poser la question suivante : si NF-κB est induit par une telle gamme de stimuli et peut contrôler une telle variété de gènes, comment la spécificité d'action est-elle obtenue ? On a, pour le moment, peu d'éléments de réponse, mais il semble que, dans de nombreux cas, un élément de régulation différent, en général une séquence d'ADN adjacente ayant une fonction facilitante ou antagoniste, soit nécessaire à la spécificité d'action de NF-κB.

Comme il l'a été dit plus haut, les gènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (humain et murin) contiennent dans leur promoteur une séquence de fixation pour NF-κB. Néanmoins, dans des conditions où ce facteur n'est pas induit, une autre protéine, appelée KBF1 (de poids moléculaire 50 kDa) est capable de se fixer sur cette séquence et semble responsable du niveau de base d'expression des gènes de classe I. En présence de TNF par exemple, NF-κB est induit et vient se fixer sur son site (sans doute en remplaçant KBF1), ce qui aboutit à une augmentation du niveau d'expression des gènes de classe I [8]. Dans notre laboratoire, la protéine KBF1 a été purifiée à partir d'un extrait nucléaire de cellules humaines et l'ADNc correspondant a été isolé [9]. Un certain nombre d'expériences complémentaires nous ont permis de démontrer qu'en fait KBF1 est identique à la sous-unité 50 kDa de NF-

κB. Cela a été confirmé par la purification de NF-κB à partir d'extraits cytoplasmiques, suivie du clonage de son ADNc par un autre groupe [12]. On est donc amené à penser que dans la même cellule coexistent un complexe NF-κB inactif dans le cytoplasme (ainsi qu'éventuellement une forme nucléaire activée : hétérodimère 50 kDa + 65 kDa), et la molécule KBF1 (homodimère 50 kDa) active dans le noyau. Le problème des mécanismes aboutissant à la formation de ces deux complexes ainsi que de leur relation fonctionnelle n'a pas été élucidé pour l'instant. Néanmoins, la structure même de la protéine codée par l'ADNc isolé a apporté toute une série d'informations inattendues.

En premier lieu, la protéine codée par l'ADNc a un poids moléculaire théorique de 105 kDa, largement plus important que celui de la protéine purifiée. Nous avons pu montrer que cette protéine de 105 kDa est en fait

◀ Figure 1. **Représentation schématique de la biosynthèse et de l'activation des facteurs transcriptionnels NF- κ B et KBF1.** L'ADNc NF- κ B/KBF1 code pour un précurseur de 105 kDa à localisation cytoplasmique, peut-être du fait des caractéristiques de l'extrémité carboxyterminale. Ce précurseur engendre par protéolyse une protéine de 50 kDa représentant sa partie amino-terminale. La sous-unité de 50 kDa se trouve dans le cytoplasme sous deux formes alternatives. **A gauche**, intégrée à un complexe comportant une sous-unité de 65 kDa et l'inhibiteur I- κ B. Ce dernier est probablement phosphorylé par une kinase (vraisemblablement une protéine kinase C) activée lorsque la cellule est stimulée ; cette stimulation peut être physiologiquement due à des cytokines (TNF, IL-2), à l'antigène, au LPS (lipopolysaccharide bactérien) à des lectines ou à d'autres facteurs qui ne sont pas tous connus. La phosphorylation de I- κ B provoquerait le relâchement du dimère 50 kDa-65 kDa qui, associé à un autre dimère, constituant l'activateur transcriptionnel tétramérique NF- κ B. Une séquence cible du facteur NF- κ B est montrée, celle de l'élément κ B du enhancer du gène codant pour la chaîne légère κ des immunoglobulines. **A droite**, deux sous-unités de 50 kDa forment le dimère KBF1, activateur transcriptionnel faible. Une cible de KBF1, également cible de NF- κ B, est montrée sur la figure : elle correspond à la séquence de fixation de ces protéines sur le promoteur de gènes codant pour des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.

ciation terminale. Le mécanisme de la transformation induite par l'oncogène *v-rel* ainsi que la fonction du proto-oncogène *c-rel* sont, pour le moment, inconnus. Néanmoins, un certain nombre d'expériences semblent indiquer que Rel fonctionne comme un activateur transcriptionnel. Un autre point intéressant est la localisation subcellulaire de Rel : elle peut être nucléaire ou cytoplasmique suivant le type de cellule-hôte et suivant que celle-ci est infectée ou transformée. D'autre part, on a démontré que dans le cytoplasme, Rel était associée à une série de protéines dont la nature est, pour l'instant, inconnue.

De même que pour Dorsal, l'extrémité C-terminale de Rel semble être responsable de la localisation cytoplasmique.

Au vu de l'analogie entre ces trois protéines, nous avons cherché à savoir si Rel et Dorsal étaient capables de fixer l'ADN et, en particulier, les sites NF- κ B. Le résultat s'est avéré négatif pour Dorsal, mais nous avons pu montrer que Rel était effectivement capable de se fixer à divers sites NF- κ B ; de manière très intéressante, nous avons aussi pu montrer que Rel et KBF1 pouvaient former *in vitro* des hétérodimères qui étaient capables de reconnaître les mêmes sites de fixation.

La famille NF- κ B semble donc au moins composée de deux membres : P50/KBF1 et c-Rel. Dans une analyse par *Northern Blot*, le groupe de D. Baltimore a détecté trois ARN murins de tailles différentes en utilisant la sonde P50 [12] : deux de ces espèces correspondent à P50 et c-Rel, la troisième (de taille 2 800 b) correspondant sans doute à un troisième membre non encore connu de cette famille. Des données préliminaires de séquences d'acides aminés semblent indiquer que la P65 présente aussi des homologies avec Rel. Nous sommes donc en présence d'une famille de facteurs de transcription, dont un certain nombre de membres restent à découvrir.

A la lueur de ces résultats il devient très important de reconsidérer le rôle du proto-oncogène *c-rel* et, en particulier, son implication possible dans

un précurseur de la protéine de 50 kDa (c'est la première fois que la présence d'un précurseur est démontrée pour un facteur de transcription). Ce précurseur de localisation purement cytoplasmique est coupé par un mécanisme encore inconnu pour donner naissance à KBF1 qui représente sa partie N-terminale. La fonction exacte de la partie C-terminale est inconnue mais sa structure présente une caractéristique intéressante : elle contient 6 répétitions d'une séquence de 30 acides aminés qui a été détectée récemment dans l'ankyrine d'érythrocyte [10] qui est une protéine contrôlant l'interaction entre la spectrine du cytosquelette et certaines protéines de la membrane cytoplasmique. Ces répétitions pourraient être liées à la localisation purement cytoplasmique de la protéine de 105 kDa. Il semble donc que l'expression de NF- κ B soit contrôlée à plusieurs niveaux post-traductionnels : on trouve tout d'abord un précurseur cytoplasmique, puis après découpage de ce précurseur, la sous-unité 50 kDa est encore retenue dans le cytoplasme par l'intermédiaire de la sous-unité 65 kDa et de I κ B, puis, à la suite d'un stimulus extérieur, le complexe NF- κ B est enfin transporté dans le noyau (voir *m/s* n° 8, vol. 6, p. 803).

Un second résultat inattendu est l'analogie observée entre l'extrémité N-terminale de la protéine précurseur (c'est-à-dire KBF1) et deux protéines précédemment caractérisées. L'une de ces protéines, Dorsal, est impliquée dans le développement de la drosophile, tandis que la seconde est le produit de l'oncogène *rel* [9, 12]. Cette homologie qui atteint 50 à 60 %, s'étend sur 375 acides aminés. Dorsal qui, comme son nom ne l'indique pas, est responsable de la ventralisation de l'embryon, est localisée dans le noyau de cellules de la région ventrale, où elle est active. Un gradient de localisation du noyau vers le cytoplasme est observé au fur et à mesure qu'on se déplace vers la région dorsale, où la protéine est inactive. Ce type de comportement rappelle celui de NF- κ B bien qu'aucune protéine de type I κ B n'ait pu être observée et que l'existence d'un précurseur n'ait pas pu être démontrée jusqu'à présent. Néanmoins, la partie C-terminale de la protéine semble être impliquée dans sa localisation cytoplasmique.

L'oncogène *rel* est le gène transformant d'un rétrovirus aviaire et induit essentiellement des lymphomes. Les proto-oncogènes *c-rel* humain et murin sont exprimés essentiellement dans les cellules B et T en différen-

le contrôle de tous les gènes apparemment contrôlés par NF- κ B ■

Alain Israël

Unité de biologie moléculaire du gène,
Inserm U. 277-Cnrs UA 535, Institut
Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75724
Paris Cedex 15, France.

RÉFÉRENCES

1. Sen R, Baltimore D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a post-translational mechanism. *Cell* 1986 ; 47 : 921-8.
2. Baeuerle P, Baltimore D. A 65 kD subunit active NF- κ B is required for inhibition of NF- κ B by I- κ B. *Genes Dev* 1989 ; 3 : 1689-99.
3. Ghosh S, Baltimore D. Activation *in vitro* of NF- κ B by phosphorylation of its inhibitor I- κ B. *Nature* 1990 ; 344 : 678-82.
4. Böhlein E, Lowenthal JW, Siekevitz M, Ballard DW, Franza BR, Greene WC. The same inducible nuclear proteins regulates mitogen activation of both the IL-2 receptor-alpha gene and type HIV-1. *Cell* 1988 ; 53 : 827-36.
5. Nabel G, Baltimore D. An inducible transcription factor activates expression of HIV in T cells. *Nature* 1987 ; 326 : 711-3.
6. Visvanathan KV, Goodbourn S. Double stranded RNA activates binding of NF- κ B to an inducible element in the human β -interferon promoter. *EMBO J* 1989 ; 8 : 1129-33.
7. Israël N, Hazan V, Alami J, *et al.* TNF stimulates transcription of HIV-1 in human T lymphocytes, independently and synergistically with mitogens. *J Immunol* 1989 ; 143 : 3956-60.
8. Israël A, Le Bail O, Hatat D, *et al.* TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing and NF- κ B like enhancer binding activity which displaces constitute factors. *EMBO J* 1989 ; 8 : 3793-800.
9. Kieran M, Blank V, Logeat F, *et al.* The DNA binding subunit of NF- κ B is identical to factor KBF1 and homologous to the *rel* oncogene product. *Cell* 1990 ; 62 : 1007-18.
10. Lux SE, John KM, Bennett V. Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature* 1990 ; 344 : 36-42.
11. Hunt T. Cytoplasmic anchoring proteins and the control of nuclear localisation. *Cell* 1989 ; 59 : 949-51.
12. Ghosh S, Baltimore D. Cloning of the P50 DNA binding subunit of NF- κ B : homology to *rel* and *dorsal*. *Cell* 1990 ; 62 : 1019-29.