

■■■■ **Les protéines GAP des grandes protéines G trimériques.** L'activation des petites protéines G de la famille Ras est contrôlée négativement par stimulation de leur activité GTPasique par des protéines GAP (*GTPase-activating proteins*) (*m/s n° 4, vol. 8, p. 388*). La sous-unité  $\alpha$  des grandes protéines G trimériques est, elle aussi, activée par liaison du GTP, remplaçant le GDP fixé à la forme inactive. Cette sous-unité  $\alpha$  liée au GTP se dissocie alors des sous-unités  $\beta\gamma$ , stimule le système effecteur, puis est désactivée par hydrolyse du GTP. Cependant, comme pour les protéines Ras, l'activité GTPasique intrinsèque de la sous-unité  $G_\alpha$  est très faible. Il y a quelques mois, plusieurs auteurs ont décrit une nouvelle famille de protéines appelées RGS (*regulators of G-protein signalling*) capables de contrôler négativement le signal relayé par les récepteurs à sept passages transmembranaires, couplés aux protéines G [1-3]. Trois équipes américaines montrent maintenant que ces protéines RGS sont probablement des GAP spécifiques des sous-unités  $\alpha$  de protéines G trimériques [4-6]. Les différentes protéines RGS étudiées stimulent au moins cent fois la vitesse d'hydrolyse du GTP lié aux protéines  $\alpha_o$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_{12}$ ,  $\alpha_3$ , transducines. En revanche, les auteurs n'ont pas trouvé de protéines RGS capables d'activer la fonction GTPasique de la sous-unité  $\alpha_s$ , couplée positivement à l'adénylyl cyclase.

- [1. Dohlmam H, *et al. Mol Cell Biol* 1995; 15: 3634-43.]
- [2. Koelle MR, Horvitz HR. *Cell* 1996; 84: 115-25.]
- [3. Drueyk M, *et al. Nature* 1996; 379 : 742-6.]
- [4. Watson N, *et al. Nature* 1996; 383: 172-5.]
- [5. Hunt TW, *et al. Nature* 1996; 383 : 175-7.]
- [6. Berman DM, *et al. Cell* 1996; 86: 445-520.]

■■■■ **La dimérisation de la kinase Raf est-elle suffisante à son activation?** En réponse à divers signaux inflammatoires ou de proliférations, la protéine Ras est activée, stimulant à son tour

l'activité kinasique de la protéine Raf, point de départ de la cascade de phosphorylation relayée par les MAP-kinases [1]. Le mode précis d'activation de Raf restait cependant inconnu. On avait seulement montré que Raf interagissait avec Ras activée, et était ainsi recrutée à la membrane (*m/s n° 2, vol. 10, p. 235*) où elle pouvait être phosphorylée par des tyrosine kinases (*m/s n° 10, vol. 11, p. 1501*). Cependant, il semble que cette phosphorylation sur une tyrosine ne soit pas indispensable à l'activation de Raf. Différentes données suggéraient que l'un des phénomènes pouvant intervenir dans l'activation de cette protéine Raf était son oligomérisation, notamment par l'intermédiaire de protéines de la famille 14-3-3 qui forment eux-mêmes des dimères [2]. Deux équipes américaines viennent de démontrer la validité de cette hypothèse en utilisant une nouvelle technique de dimérisation conditionnelle de grand intérêt et de potentialité étendue. Il s'agit de produire des protéines de fusion comportant un domaine de fixation d'un ligand bivalent, dont le modèle est l'immunosuppresseur FK506 dimérisé (appelé, par conséquent FK1012). En réalité, la même opération peut être réalisée avec une grande diversité de ligands. Lorsque de tels agents bivalents sont ajoutés à une cellule produisant les protéines de fusion, ils induisent leur dimérisation dont on peut alors évaluer les conséquences. Dans le cas de Raf, cette dimérisation induite entraîne le phénomène d'activation de la cascade des MAP-kinases [3, 4]. Les résultats de Farrar *et al.* [3] et de Luo *et al.* [4] diffèrent sur un point: les premiers auteurs observent que Raf peut être activée indépendamment de Ras, alors que les seconds rapportent que le mécanisme en reste dépendant. Quoi qu'il en soit, le schéma qui émerge de ces résultats est le suivant: le recrutement de Raf à la membrane, secondaire à l'activation de Ras, augmente la concentration locale en Raf, et facilite donc son oligomérisation, très probablement par l'intermédiaire de protéines de la famille 14-3-3. C'est cette oligomérisation qui entraîne l'activation de la

kinase Raf, peut-être par «transphosphorylation», comme cela est le cas pour les récepteurs membranaires à activité de tyrosine kinase dont les ligands provoquent l'oligomérisation et l'activation par un tel mécanisme.

- [1. Kahn A. *médecine/sciences* 1992; 8 : 1097-9.]
- [2. Marshall CJ. *Nature* 1996; 383: 127-8.]
- [3. Farrar MA, *et al. Nature* 1996; 383 : 178-81.]
- [4. Luo Z, *et al. Nature* 1996; 383: 181-5.]

■■■■ **Expression du gène de l'insuline: le gène E2A est-il vraiment important?** Une nouvelle fois, l'inactivation d'un gène *in vivo* crée la surprise! C'est le tour du gène E2A. Ce gène code pour plusieurs facteurs de transcription ubiquitaires (de la famille structurale bHLH (*basic helix-loop-helix*)), dont au moins deux, E12 et E47, sont supposés jouer un rôle important dans l'activation du gène de l'insuline *in vitro*. Alors que l'inactivation du gène E2A conduit à la mort des souris très tôt après la naissance, les altérations majeures du phénotype dont il est fait mention concernent le système immunitaire et, en particulier, l'arrêt du développement des lymphocytes B [1]. La même équipe ayant émis l'hypothèse qu'une hypo-insulinémie en relation avec un déficit de la synthèse d'insuline pouvait rendre compte de la mort précoce des souris mutantes E2A<sup>-/-</sup>, le développement du pancréas chez ces souris ainsi que la présence de cellules endocrines fonctionnelles dans ce tissu ont été analysés [2]. Les souris nouveau-nées E2A<sup>-/-</sup> et E2A<sup>-/-</sup>, de façon inattendue, ne présentent aucune anomalie anatomique au niveau des tissus pancréatiques exocrine et endocrine; la présence de cellules  $\beta$  et  $\alpha$  différenciées dans les îlots pancréatiques a été détectée par immunomarquage. L'intégrité anatomique du pancréas des souris mutées est corroborée par les études fonctionnelles: le contenu en insuline du pancréas d'embryons de 17 jours de souris mutées, tout comme la glycémie chez les souris de 1 jour, sont tout à fait

normaux. Ces résultats indiquent que l'expression du gène de l'insuline *in vivo* ne dépend pas des protéines bHLH codées par le gène *E2A* et, par conséquent, suggèrent un phénomène de redondance fonctionnelle pour cette classe de protéines transactivatrices du gène de l'insuline. Enfin, ils apportent la confirmation qu'une étude de régulation de l'expression génique ne peut se passer de l'animal pour être tout à fait convaincante.

[1. Bain G, *et al. Cell* 1994; 79: 885-92.]

[2. Itkin-Ansari P, *et al. Endocrinology* 1996; 137: 3540-3.]

■■■ **Le double jeu de la tyrosine phosphatase PRL-1 sur le système digestif signe la croissance dans le foie, et la différenciation dans l'intestin.** Le gène *PRL-1* n'en finit pas de se singulariser: découvert par le groupe de R. Taub (Philadelphie, PA, USA) en tant que gène très précoce au cours de la régénération hépatique, il code pour une tyrosine phosphatase qui se distingue des autres types de phosphatases par sa localisation spécifiquement nucléaire, et par l'absence d'homologie de structure avec les autres phosphatases (hormis au niveau du site actif) [1]. Ces données ajoutées au fait que l'expression du gène est importante dans le foie fœtal et dans des hépatomes en culture ont permis de suggérer que la protéine PRL-1, comme la plupart des tyrosine phosphatases et tyrosine kinases, exerce un rôle régulateur sur la croissance et la division cellulaires. Aujourd'hui, ce même groupe apporte la confirmation que le gène *PRL-1* est bien exprimé en association avec la prolifération cellulaire au niveau hépatique, alors qu'au niveau de l'intestin, tissu d'origine endodermique comme le foie et lieu de division cellulaire active, ce gène est exprimé spécifiquement dans les cellules différenciées qui ne se divisent plus [2]. Ainsi, par des expériences d'hybridation *in situ*, les auteurs démontrent que l'ARNm de *PRL-1* est quasiment indétectable au niveau des lobules hépatiques chez le rat normal,

alors que dans un foie en régénération, trois heures après une hépatectomie partielle, on observe un marquage important dans l'ensemble des cellules hépatiques parenchymateuses et non parenchymateuses. Dans le même temps, alors que la protéine PRL-1 est présente en quantité très faible dans les cellules quiescentes normales, la synthèse de la protéine PRL-1 augmente rapidement après l'hépatectomie, est maximale 16 heures après l'intervention (début de l'entrée des cellules en division) et reste élevée durant les 5 jours qui suivent. Dans l'intestin, en revanche, la situation est tout autre. En effet, l'expression du gène détectée dès le stade embryonnaire de 11 jours, est fortement accrue au moment de la naissance, à la fois dans l'intestin grêle et le côlon. Pour mieux comprendre le rôle du gène *PRL-1* au niveau intestinal, la présence de messenger a été évaluée dans des cellules différenciées et indifférenciées (donc en division) de la lignée Caco-2 dérivée d'un adénocarcinome colique humain. De façon surprenante, l'ARNm codant pour PRL-1 n'est retrouvé que dans les cellules différenciées, restant indétectable dans les cellules en cours de prolifération. Une situation identique est observée au niveau de l'épithélium normal de l'intestin grêle de rat, la protéine étant présente uniquement dans les cellules villositaires différenciées, au niveau des noyaux, et non dans les cellules cryptiques indifférenciées. Dans le côlon, c'est au niveau de la surface épithéliale et non au niveau des cryptes que la protéine PRL-1 a pu être identifiée. Ces résultats suggèrent sans équivoque que le gène *PRL-1* peut avoir deux rôles distincts qui dépendent à la fois du tissu qui l'exprime et de son état de différenciation. Ils confortent également la notion que les gènes codant pour des tyrosine phosphatases n'ont pas seulement un rôle de gène de ménage (*housekeeping*) mais peuvent exercer aussi une mission plus « noble » et plus spécifique dans la cellule. Dans le cas de PRL-1, sa localisation nucléaire laisse penser qu'elle peut interagir avec d'autres protéines nucléaires,

comme par exemple des facteurs de transcription ou des protéines régulatrices du cycle cellulaire. En outre, ses substrats cellulaires encore inconnus aujourd'hui sont probablement différents dans le foie et l'intestin, ce qui pourrait expliquer la double fonction de l'enzyme. A l'heure actuelle, nombreuses sont les questions, mais rares sont les réponses, et on est encore loin de les connaître !

[1. Diamond RH, *et al. Mol Cell Biol* 1994; 14: 3752-62.]

[2. Diamond RH, *et al. Am J Physiol* 1996; 271: G121-9.]

■■■ **HNF-6, prototype d'une nouvelle classe de facteurs de transcription.** L'expression histo-spécifique des gènes est contrôlée par des facteurs de transcription qui présentent eux-mêmes une distribution tissulaire très restreinte. Cinq familles de gènes (*HNF-1*, *HNF-3*, *HNF-4*, *C/EBP*, *PAR*) concourent à exercer une régulation hépato-spécifique de la transcription, influençant ainsi le développement embryonnaire du foie et le contrôle des fonctions hépatiques de l'adulte [1]. Les produits des gènes *HNF-1* s'apparentent à la classe des protéines dites POU-homéo. Pour *HNF-3*, il s'agit de la classe des *winged helix/fork head*, pour *HNF-4* de celle des récepteurs nucléaires orphelins à doigts de zinc, pour *C/EBP* de celle des protéines à glissière de leucine, et pour *PAR* de celle dite *proline, acid-rich*. La récente identification par le groupe de Guy Rousseau et Frédéric Lemaigre à l'ICP (Université de Louvain, Bruxelles), de HNF-6 (*hepatocyte nuclear factor-6*) chez le rat [2] vient à présent grossir les rangs des facteurs de transcription hépato-spécifiques, tout en définissant une nouvelle classe de ces facteurs. HNF-6 a été découvert en tant qu'activateur de la transcription du gène codant pour la 6-phosphofructo-2-kinase, une enzyme-clé du métabolisme glucidique. La présence de sites potentiels de liaison de HNF-6 sur d'autres gènes importants pour l'homéostasie glucidique (tyrosine aminotransférase, glucokinase), ou contrôlant les fonctions hépatiques en

général (HNF-3  $\beta$ , *hepatocyte growth factor*), ou encore impliqués dans la transmission de signaux extracellulaires (NO synthase, MAP kinase) laisse présager un rôle plus étendu de HNF-6 dans le contrôle des fonctions de l'hépatocyte. Par ailleurs, HNF-6 contient deux motifs de liaison à l'ADN, à savoir un domaine cut et un domaine homéo. Le domaine cut, initialement caractérisé dans la protéine cut de drosophile, fut par la suite identifié chez les mammifères dans les produits (CDP, *cux*, *clox*) du gène *mClox* (*mammalian cut-like homeobox*), homologue du gène *cut* de Drosophile. Alors que les protéines cut et *mClox* contiennent chacune trois boîtes cut et une boîte homéo, HNF-6 contient une seule boîte cut et une boîte homéo. De plus, le domaine homéo de HNF-6 ne se classe dans aucune catégorie de protéines homéo décrites à ce jour [3], à en juger par la nature de certains acides aminés impliqués dans la liaison du domaine homéo à l'ADN et dans l'établissement de sa structure tridimensionnelle. Toutefois, le génome du nématode *Caenorhabditis elegans* contient l'information nécessaire à la synthèse d'un homologue potentiel de HNF-6, homologue qui comporte, de manière remarquable, un seul domaine cut associé au même type de domaine homéo que celui de HNF-6. La conservation, au cours de l'évolution, de l'association et de la séquence (86 % de similitude sur 133 résidus) de ces deux motifs particuliers suggère un rôle important pour HNF-6 dans le contrôle de la transcription.

- [1. Cereghini S. *FASEB J* 1996; 10: 267-82.]
- [2. Lemaigre F, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9460-4.]
- [3. Duboule D. *Guidebook to Homeobox Genes*. Oxford: Oxford University Press, 1994.]

■■■■ **Le constat de la recombinaison illégitime dans le cancer rénal papillaire.** Dans les leucémies, nombreuses sont les translocations chromosomiques spécifiques où des gènes qui codent pour des facteurs de transcrip-

tion de la famille *bHLH*, comme *CMYC*, *LYL1* et 2, ou *TAL1* et 2, se trouvent juxtaposés à des gènes codant pour les immunoglobulines ou pour le récepteur T. Il en résulte alors une dérégulation ou une expression ectopique du gène *bHLH*. Nous allons voir qu'une translocation d'un gène de cette famille *bHLH*, *TFE3*, peut se comporter différemment : dans le cancer papillaire du rein, il forme une protéine de fusion. On sait que le carcinome rénal à grandes cellules claires (RCC) s'accompagne parfois d'une translocation entraînant la perte ou l'inactivation du gène *VHL* (von Hippel Lindau) (*m/s n°4*, vol. 9, p. 475). Dans le carcinome papillaire (PRCC) une translocation (X;1) (p11.2;q21.2) avait été observée [1], mais on ignorait jusqu'à présent quels étaient les gènes impliqués dans ce remaniement spécifique. Un travail collaboratif entre des équipes anglaise, australienne et américaine vient de montrer qu'un gène, appelé *PRCC*, était fusionné avec le gène *TFE3* [3]. Le gène *PRCC* contient un cadre de lecture ouvert de 491 acides aminés et la protéine déduite possède un domaine N-terminal riche en proline, en leucine et en glycine qui ne présente aucune homologie avec des séquences déjà connues. Ce domaine est présent dans la protéine hybride. Normalement, le gène *TFE3* code pour une protéine qui se lie à des éléments d'ADN de type CACGTG, par exemple, aux éléments E3 des chaînes lourdes des IG [4]. L'étude du transcrit hybride *PRCC-TFE3* dans les trois tumeurs papillaires étudiées montre la perte du transcrit *TFE3* normal, qui fut retrouvé par ailleurs dans les autres tissus étudiés, tels que rhabdomyosarcome, sarcome d'Ewing et synoviosarcome (où il existe une autre translocation spécifique impliquant aussi le chromosome X). La translocation pourrait donc avoir un effet double, produisant une protéine de fusion à effet dominant, d'une part, et supprimant l'activité des protéines *TFE3* normales, d'autre part. Le domaine aminoterminal d'activation transcriptionnelle de *TFE3*, appelé AAD, est codé par les 105 nucléotides de l'exon

3 du gène *TFE3*. Or, une isoforme plus courte, *TFE3-S*, exprimée dans le rein, est obtenue par épissage différentiel de cet exon, et a un effet dominant négatif sur l'activité de *TFE3* [5]. On pourrait donc supposer que l'émergence des clones malins à l'origine des tumeurs papillaires du rein nécessite à la fois la présence de la protéine hybride et la disparition de l'isoforme *TFE3-S* inhibitrice.

- [1. Shipley JM, et al. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 71: 280-4.]
- [2. Larsen C, et al. *médecine/sciences* 1994; 10: 1127-35.]
- [3. Sidhar S, et al. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1333-8.]
- [4. Macchi P, et al. *Genomics* 1995; 28: 491-4.]
- [5. Roman C, et al. *Science* 1991; 254: 94-7.]

■■■■ **Caractérisation du site de fixation du  $Mg^{2+}$  dans les métalloprotéines : peut-être la fin d'une longue frustration?** L'ion magnésium  $Mg^{2+}$  est un élément essentiel du milieu intérieur impliqué dans de nombreux processus biologiques. Il joue, en particulier, un rôle primordial dans l'activation de très nombreuses enzymes qui nécessitent la présence d'un cation pour que le complexe enzyme-substrat adopte la configuration adéquate. Cette propriété tient au fait que l'ion  $Mg^{2+}$  possède les caractéristiques physico-chimiques requises pour créer des complexes ternaires. Outre son faible rayon ionique (0,72 Å) il tend à former, en solution aqueuse, des octaèdres réguliers avec six molécules d'eau qui lui sont fortement liées, géométrie qui se maintient même après complexation avec un, voire deux autres ligands. Parmi ces enzymes, on compte la grande majorité de celles qui activent les processus de phosphorylation. L'ion  $Mg^{2+}$  forme en effet des complexes très stables avec les nucléotides comme l'adénosine triphosphate (ATP). Pour les enzymes fonctionnant à la fois avec du  $Mg^{2+}$  et de l'ATP, l'entité active est le complexe  $Mg(ATP)$  lui-même. Pour d'autres enzymes, l'ion  $Mg^{2+}$  joue un rôle plus structurant, faisant partie intégrante

## ■■■ BRÈVES ■■■

d'un complexe binaire Mg-enzyme, qui seul porte l'activité catalytique. Ces deux fonctions peuvent coexister dans certaines enzymes. La pyruvate kinase, par exemple, possède deux sites de fixation du  $Mg^{2+}$ . Le premier est le site de fixation du substrat Mg(ADP), le second ayant un rôle direct d'activateur de l'enzyme.

C'est l'importance physico-chimique maintenant bien perçue de l'ion  $Mg^{2+}$  et l'existence de sites spécifiques de fixation de cet ion sur de nombreuses protéines à caractère enzymatique, qui font naître de profondes frustrations chez ceux qui s'intéressent à ces métalloprotéines, car on ne dispose d'aucune méthode spectroscopique permettant d'étudier, à l'échelle atomique, la nature des liaisons qu'il engendre. Une équipe du CEA vient de montrer que l'on peut tourner la difficulté en utilisant le cation  $Mn^{2+}$  comme analogue du  $Mg^{2+}$  [1]. Dans

un complexe formé avec l'adénosine triphosphatase (ATPase) isolée de la bactérie thermophile *Bacillus PS3* la présence d'un  $Mn^{2+}$  en lieu et place d'un  $Mg^{2+}$  ne modifie pas l'activité de l'enzyme. Cependant le  $Mn^{2+}$ , contrairement au  $Mg^{2+}$ , possède un paramagnétisme le rendant apte à être identifié et analysé par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE). En outre, la spectroscopie de RPE dite « en mode pulsé » permet de détecter d'éventuels noyaux magnétiques comme  $^1H$ ,  $^{14}N$  et  $^{31}P$  dans l'environnement du cation  $Mn^{2+}$ . Des ligands impliquant ces atomes laisseront en effet une signature spécifique dans les spectres du  $Mn^{2+}$  ainsi recueillis. Dans l'ATPase de *Bacillus PS3*, cette méthode a permis d'attribuer les fréquences détectées au couplage du  $Mn^{2+}$  avec un ligand azoté, provenant très probablement de l'amine terminale d'un résidu

lysine, et de démontrer que l'ajout d'ATP induit la formation d'un complexe ternaire Mn-ATPase-ATP, avec le couplage caractéristique d'un ligand phosphate de l'ATP coordonné au  $Mn^{2+}$ . Cette observation démontre la proximité spatiale des sites de fixation du nucléotide et du cation divalent. Les analyses spectrales montrent que l'hydrolyse de l'ATP en ADP qui survient lors de la mise en activité de l'enzyme, pourrait s'accompagner d'un changement conformationnel significatif autour du cation  $Mn^{2+}$ . Cette étude ouvre donc des perspectives intéressantes sur les mécanismes d'action des ATPases, dont le  $Mg^{2+}$  est un co-facteur essentiel et, au-delà de ces enzymes, des métalloprotéines comprenant ce cation dans la configuration de leur site fonctionnel.

[1. Buy C, *et al. Biochemistry* 1996; 35: 9880-91.]