

## Mécanisme d'activation de l'oncogène *BRAF*

### L'union fait la force

Hugo Lavoie, Marc Therrien

Institut de recherche en immunologie et en cancérologie, unité de recherche en signalisation intracellulaire, département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, CP 6128, Succursale centre-ville, Montréal (Québec), H3C 3J7 Canada.  
[marc.therrien@umontreal.ca](mailto:marc.therrien@umontreal.ca)

> L'activation anormale de la protéine kinase *BRAF* ou de composantes de la voie ERK dont elle fait partie se manifeste dans une forte proportion de tumeurs cancéreuses humaines [1]. *BRAF* elle-même est mutée dans 8 % des cancers avec des incidences élevées dans les mélanomes (70 %) et les tumeurs thyroïdiennes (33 %) [2]. *BRAF* s'avère donc être une cible de choix dans les thérapies anticancéreuses comme en témoignent plusieurs essais cliniques en cours [1].

Dans sa forme la plus simple, la voie ERK comprend trois kinases, soit *RAF*, *MEK* et *ERK/MAPK*, qui transmettent par le biais de phosphorylations en cascade les signaux émis par la petite GTPase *RAS*. Cette dernière est elle-même activée par des récepteurs membranaires, le plus souvent des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), en réponse à des signaux extracellulaires de prolifération, de différenciation ou de survie cellulaire [3]. Le module *RAF-MEK-ERK* est l'un des mieux caractérisés dans le domaine de la signalisation intracellulaire. Cependant, plusieurs stades du mécanisme restent encore à élucider comme, par exemple, la séquence exacte des événements conduisant à l'activation catalytique de *RAF*.

#### Complexité du mécanisme d'activation de *RAF*

L'activation de *RAF* passe par plusieurs étapes. Certaines mettent en œuvre des régulations non covalentes qui modifient la localisation subcellulaire de *RAF* ou la conformation de sa structure tridimensionnelle, tandis que d'autres

mettent en jeu des modifications post-traductionnelles, le plus fréquemment par phosphorylation.

Telle qu'elle est comprise aujourd'hui, l'activation de *RAF* commence par son recrutement à la membrane plasmique via une interaction avec la petite GTPase *RAS* liée au GTP (Figure 1A). Cette fixation de *RAS* à un domaine de la portion amino-terminale de *RAF*, le *Ras binding domain* (RBD), provoque en particulier la déphosphorylation d'un résidu-clé situé en amino-terminal de son domaine kinase entraînant ainsi la libération d'un dimère de 14-3-3 qui autrement séquestre *RAF* dans le cytoplasme. Cette libération a pour effet d'exposer le *cysteine-rich domain* (CRD) adjacent au RBD et permet l'ancrage de *RAF* à la membrane. D'autre part, la liaison de *RAF* par *RAS* déstabilise une interaction inhibitrice entre la région amino-terminale de *RAF* et son domaine kinase, ce qui rend ce dernier réceptif aux prochaines étapes d'activation et, notamment, la phosphorylation de résidus situés immédiatement en amino-terminal du domaine kinase et dans sa boucle d'activation [4] (Figure 1A). Hormis *RAS* et 14-3-3, d'autres protéines semblent participer au mécanisme d'activation de *RAF* [4]. C'est le cas de *KSR* (*Kinase suppressor of Ras*), une protéine apparentée à *RAF* par sa séquence et sa structure mais qui est catalytiquement inactive. Quoique cette protéine ait été initialement décrite comme une protéine d'échafaudage avec pour rôle de recruter le substrat *MEK* à son activateur *RAF*, plusieurs données expérimentales lui attribuent un rôle dans le mécanisme d'activation

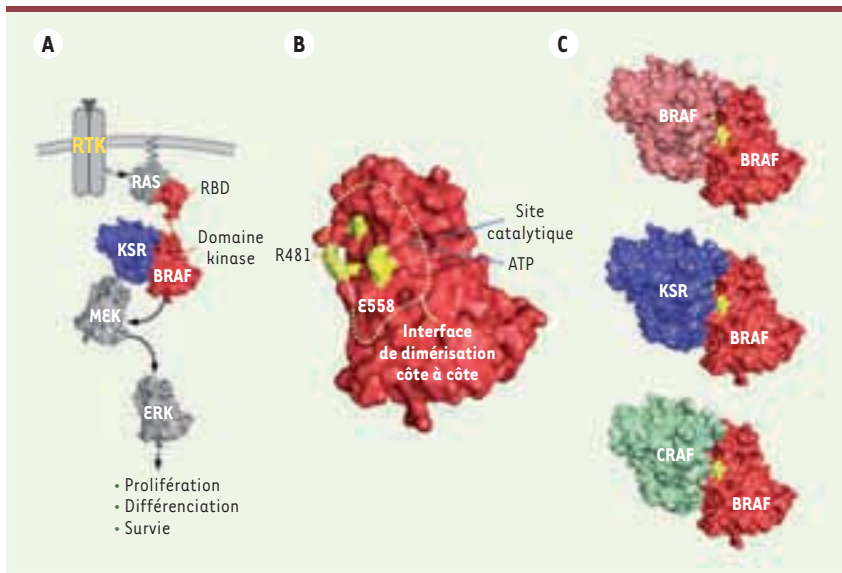
de *RAF* [5, 6]. Nos travaux récents, qui font l'objet de la présente nouvelle, ont révélé le mécanisme par lequel *KSR* contribue à l'activation de *RAF*. De plus, ils dévoilent un aspect central du processus d'activation de *RAF* insoupçonné jusqu'ici.

#### Dimérisation de *RAF* : une élégante hypothèse confirmée

Les mutations oncogéniques mises à part, l'activation de *RAF* semble dépendre invariablement de *RAS*. Des expériences effectuées dans des cellules de drosophile en culture ont permis de déceler une exception à cette règle. En effet, il s'avère que la surexpression de *KSR* en présence de *RAF* et de *MEK* suffit pour activer *RAF* sans requérir une quelconque activité de *RAS* [6]. Ce résultat, d'abord mystérieux, a été élucidé par une étude de la structure du domaine kinase de *BRAF* qui recèle un indice capital de son mécanisme d'activation [7]. En effet, l'analyse structurale de ce domaine suggère sa dimérisation où chaque monomère se présenterait côte à côte l'un par rapport à l'autre (Figure 1B et C) [6]. Cette hypothèse a été confirmée par des essais d'interaction *in vitro* utilisant des protéines recombinantes produites dans des bactéries [6]. Des mutations ciblant divers résidus-clés de l'interface non seulement perturbent la formation de dimères, mais, de plus, abolissent l'activité kinase de *BRAF*. Il semble donc que la dimérisation de *RAF* soit un élément-clé de son processus d'activation.

Étant donné l'étroite homologie des séquences entre les domaines kinase de *RAF* et de *KSR*, nous avons posé l'hypothèse que l'activation de *RAF* par *KSR* résulterait de l'hétérodimérisation de leurs domaines kinase respectifs. Un modèle tridimensionnel d'un





**Figure 1. Activation de BRAF par la formation de dimères côte à côte.** **A.** Modèle simplifié de l'activation de la voie ERK par les récepteurs RTK. L'interface de dimérisation côte à côte identifiée par notre équipe (**B**) est requise pour la formation d'homodimères de BRAF et suggère que des hétérodimères KSR-BRAF et CRAF-BRAF existent (**C**). Le résidu K481 est requis pour la formation d'homodimères BRAF-BRAF et le résidu E558 est muté en lysine dans certaines tumeurs cancéreuses.

hétérodimère KSR/RAF hypothétique a donc été produit et utilisé pour prédire quels acides aminés de KSR entrent en contact avec RAF. De façon remarquable, la mutation de tous les résidus de KSR situés à l'interface de dimérisation de l'hétérodimère diminue fortement ou abolit la capacité de KSR à activer RAF. Enfin, cette propriété ne dépend ni d'une activité catalytique potentielle de KSR, ni de son rôle de pont entre RAF et MEK. Par ailleurs, ce travail a permis d'expliquer la nature d'une deuxième classe de mutations oncogéniques de BRAF qui ne se situent pas dans la boucle d'activation du domaine kinase, mais plutôt à l'interface de dimérisation du dimère [7]. En effet, l'analyse de l'une de ces mutations (E558K ; *Figure 1B*) a permis de démontrer qu'elle a la capacité d'augmenter la proportion de BRAF dimérique et, par le fait même, l'activité catalytique de ce mutant [6]. Considérant que les génomes de mammifères encodent trois isoformes de RAF et deux de KSR, on peut en déduire que divers hétérodimères de RAF dotés de différentes propriétés signalétiques coexistent potentiellement dans une cellule. L'observation d'hétérodimères BRAF/CRAF en est un exemple [7]. Bien que la conséquence structurale de cette dimérisation reste à découvrir, la transactivation entre monomères s'effectue indépendamment

de leur activité catalytique intrinsèque, ce qui plaide en faveur d'un mode de régulation allostérique.

### Perspectives sur la signalisation modulée par allostérie

La modification de l'activité d'une enzyme envers son substrat par la liaison d'une troisième molécule se nomme allostérie [8]. Les affinités du régulateur lacR pour l'ADN ou de l'hémoglobine pour l'oxygène, respectivement modulées par le lactose et l'oxygène, sont des exemples classiques d'interactions modulées par allostérie [8]. Traditionnellement, l'allostérie était principalement considérée dans l'étude d'enzymes du métabolisme cellulaire. L'activation de RAF par dimérisation avec KSR rappelle bien ce phénomène moléculaire qui constituait, selon Jacques Monod, le « deuxième secret de la vie » après le code génétique. Récemment, des exemples de domaines kinase activés par dimérisation ont été découverts. En effet, l'activité kinase du récepteur à l'EGF (EGFR), de la protéine kinase PKR et de la kinase LKB1 est induite par des mécanismes d'allostérie par dimérisation [9-11]. L'allostérie semble donc jouer un rôle prédominant lors de la transmission de signaux intracellulaires et pourrait ouvrir la voie à diverses thérapies ciblées. Comme BRAF est très

fréquemment activé dans des tumeurs de diverses origines et que même l'activité du variant V600E dépend de la dimérisation de son domaine kinase [6], la découverte de composés chimiques bloquant la dimérisation de BRAF devrait contribuer à la mise au point de nouvelles thérapies anticancéreuses hautement efficaces. ♦

### It takes two RAFs to tango

#### CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Montagut C, Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett* 2009 ; 283 : 125-34.
2. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002 ; 417 : 949-54.
3. Ashton-Beaucage D, Therrien M. La signalisation RTK/RAS/ERK élargie : contributions de la génétique à l'assemblage d'un réseau de signalisation. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 (sous presse).
4. Claperon A, Therrien M. KSR and CNK: two scaffolds regulating RAS-mediated RAF activation. *Oncogene* 2007 ; 26 : 3143-58.
5. Roy F, Laberge G, Douzich M, et al. KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes Dev* 2002 ; 16 : 427-38.
6. Rajakulendran T, Sahmi M, Lefrançois M, et al. A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature* 2009 ; 461 : 542-5.
7. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004 ; 116 : 855-67.
8. Fenton AW. Allostery: an illustrated definition for the second secret of life. *Trends Biochem Sci* 2008 ; 33 : 420-5.
9. Dar AC, Dever TE, Sicheri F. Higher-order substrate recognition of eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* 2005 ; 122 : 887-900.
10. Zhang X, Gureasko J, Shen K, et al. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 2006 ; 125 : 1137-49.
11. Zeqiraj E, Filippi BM, Deak M, et al. Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science* 2009 ; 326 : 1707-11.