

***L* a rapamycine : identification d'une nouvelle voie de signalisation des facteurs de croissance, réglant le début de la traduction**

La première transplantation de rein fut réalisée en 1952 et il apparaissait dès cette époque que le développement clinique d'un tel traitement dépendrait de la possibilité de contrôler les phénomènes de rejet. Depuis, on a beaucoup investi dans la recherche d'agents pouvant prévenir le rejet d'organes transplantés et les traitements immunosuppresseurs ont considérablement évolué au cours des 10 premières années du développement de la transplantation. L'apparition de la ciclosporine A au début des années 1980 et celle du FK506 ou tacrolimus en 1990 ont constitué un progrès décisif dans le domaine des transplantations, en particulier hépatiques et cardiaques. Ces immunosuppresseurs inhibent la phase précoce de l'activation du lymphocyte T, en bloquant la transcription de certaines lymphokines, ce qui ne permet plus le passage de l'état quiescent (G0) de la cellule à la phase G1 du cycle cellulaire. Malgré l'utilisation de ces molécules, les phénomènes de rejet restent cependant fréquents, souvent associés à des effets secondaires. Le développement de nouveaux médicaments immunosuppresseurs permettant de prolonger la survie du greffon après transplantation représente donc toujours un défi majeur de la médecine actuelle [1].

Un nouveau mécanisme de l'immunosuppression est apparu avec la rapamycine, appartenant, comme le FK506, à la famille des macrolides. La rapamycine (sirolimus, rapamune) est un antibiotique identifié il y a maintenant 20 ans, mais ce n'est qu'au cours des 5 dernières années qu'a été observé son remarquable pouvoir immunosuppresseur; elle inhibe le rejet des greffons dans des modèles animaux de transplantation. Cette molécule est

actuellement en phase III des essais cliniques de transplantation et les résultats montrent que la rapamycine inhibe très efficacement le rejet des greffons ou les maladies auto-immunes. Les efforts pour caractériser ses mécanismes d'action ont été intensifiés et récemment de nombreux progrès ont été accomplis [2, 3].

Sa cible cellulaire : le début de la traduction

La rapamycine altère une voie de signalisation mitogénique, commune à une grande variété de types cellulaires. Dans les cellules T, la rapamycine inhibe la réponse au signal mitogénique des cytokines sécrétées telles que l'interleukine-2 ou l'interleukine-4, ce qui entraîne l'arrêt des cellules en phase G1. La synthèse protéique est nécessaire pour progresser dans la phase S du cycle cellulaire, et les taux de traduction doivent augmenter en réponse aux facteurs mitogènes. Le mécanisme cellulaire cible de la rapamycine est la synthèse protéique et, plus précisément, l'étape d'initiation qui est limitante parmi les trois étapes (initiation, élongation et terminaison) du processus de traduction. Le début de la traduction permet de positionner le ribosome au codon d'initiation AUG, les ribosomes étant recrutés sur les ARNm suivant un procédé séquentiel [4]. Bien que la rapamycine n'inhibe que de façon partielle le début de la traduction de l'ensemble des ARNm cellulaires [5], son inhibition est totale sur un groupe d'ARNm qui possèdent un domaine riche en pyrimidines à leur extrémité 5' [6, 7]. Cette famille d'ARNm regroupe les gènes des protéines ribosomiques et des facteurs d'élongation.

Ses cibles moléculaires : 4E-BP1 et p70S6k

Les ARNm possèdent à leur extrémité 5' non codante, une structure 7-méthyl-guanosine (m⁷G) appelée la coiffe. La coiffe recrute la petite sous-unité du ribosome sur l'ARNm et ce recrutement dépend du complexe eIF4F. Le complexe protéique eIF4F est constitué de trois sous-unités: (1) eIF4E, protéine de 21 kDa qui se lie directement à la coiffe; (2) eIF4A, protéine de 52 kDa qui possède une activité hélicase, déroulant les structures secondaires de l'ARNm; (3) eIF4G, protéine de 220 kDa dont la fonction reste inconnue. Récemment, une nouvelle protéine de 14 kDa a été identifiée qui inhibe le début de la traduction, 4E-BP1 (*eIF4E-binding protein-1*) [8, 9]. L'interaction de 4E-BP1 avec eIF4E empêche cette dernière de se lier à la coiffe, et le résultat est une inhibition de la traduction des ARNm. La fonction de 4E-BP1 est modulée par son niveau de phosphorylation. Sous sa forme déphosphorylée, 4E-BP1 lie et séquestre eIF4E, alors qu'en réponse aux facteurs de croissance, 4E-BP1 devient phosphorylé et se dissocie de eIF4E. La protéine eIF4E libérée peut alors se lier à la coiffe et mettre en route la traduction des ARNm. On a montré que c'est à ce niveau qu'agit la rapamycine: elle inhibe l'induction de la phosphorylation de 4E-BP1 par les facteurs de croissance, augmentant ainsi la fraction de eIF4E séquestré, inactif dans la cellule [5] (*figure 1*). Par ailleurs, la rapamycine inhibe la phosphorylation et l'activation de la protéine-kinase p70S6k [10, 11]. Cette kinase phosphoryle la protéine ribosomique S6 qui, sous sa forme phosphorylée, est impliquée dans

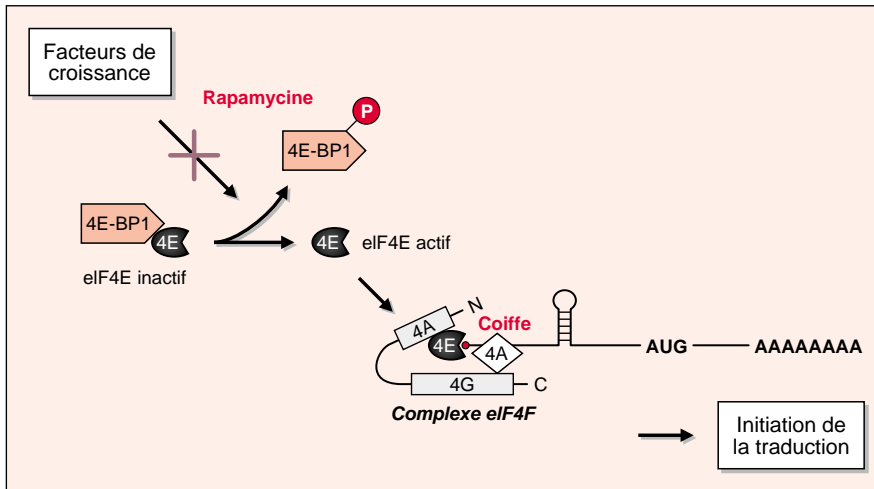


Figure 1. **Mise en route de la traduction dépendante de la coiffe.** Le complexe eIF4F se lie à la coiffe présente à l'extrémité 5' de l'ARNm et met en route la traduction. Ce complexe est formé de 3 protéines : 4E : facteur d'initiation eIF4E qui reconnaît spécifiquement la coiffe de l'ARNm ; 4A : facteur d'initiation eIF4A qui, par son activité hélicase, déroule les structures secondaires de l'ARNm ; 4G : facteur d'initiation eIF4G dont la fonction n'est pas encore connue. La mise en route de la traduction est inhibée en réponse à la rapamycine, quand eIF4E interagit avec la forme déphosphorylée de 4E-BP1.

l'activation de l'étape d'initiation. La phosphorylation et l'activation de p70S6k sont observées en réponse aux signaux mitogéniques sur une grande variété de cellules. La rapamycine bloque l'activité de la p70S6k et ainsi la phosphorylation de S6. L'inhibition de p70S6k semble responsable, en particulier, de l'inhibition sélective de la traduction des ARNm comprenant un domaine riche en polypyrimidine à leur extrémité 5' [12].

Sa voie de transduction

La voie des MAP-kinases et RSK déjà connue qui intervient dans la régulation des facteurs mitogènes n'est pas modifiée par la rapamycine. La première étape de la nouvelle voie de signalisation est la liaison de la rapamycine à une protéine appartenant à la famille des FKBP (*FK506-binding proteins*). Les membres de cette famille FKBP se distinguent par leur masse moléculaire, leur distribution intracellulaire et leurs affinités de liaison de la rapamycine. La première FKBP identifiée est une petite protéine de 12 kD et, bien que les FKBP impliquées dans l'action de la rapamycine ne soient pas identifiées sans équivoque, FKBP12 est la candidate la

plus probable. La génétique de la levure a permis d'identifier deux gènes nouveaux codant pour des cibles du complexe FKBP12-rapamycine, *TOR1* et *TOR2* (*target of rapamycin*) [13]. On a isolé chez les mammifères une protéine qui se lie également au complexe FKBP12-rapamycine et présente une grande analogie avec les TOR. Elle a plusieurs appellations, FRAP (*FKBP12-rapamycin associated protein*) [14], RAFT1 (*rapamycin and FKBP12 target*) [15], ou encore mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Ces protéines possèdent toutes des analogies avec le domaine catalytique des phosphatidylinositol-kinases et une activité d'auto-phosphorylation sur résidus sérine. L'activité des TOR est bloquée par la rapamycine et est nécessaire à la phase G1 du cycle cellulaire [16]. L'activité de p70S6k ainsi que la phosphorylation de 4E-BP1 sont contrôlées par mTOR mais ces deux cibles de mTOR appartiennent à des voies de signalisation parallèles et non pas séquentielles [17-19] (*figure 2*).

L'ensemble de ces études a permis de caractériser une nouvelle voie de transmission du signal contrôlant la croissance cellulaire et, plus particulièrement, la phase G1 du cycle ; elle

implique un contrôle traductionnel de l'expression des gènes.

Conséquences sur les infections

Outre le mécanisme d'initiation de la traduction décrit préalablement, il existe un autre mécanisme pour recruter le complexe 43S sur l'ARNm ; on l'appelle initiation interne et il est indépendant de la coiffe de l'ARNm. Dans ce cas, la sous-unité 40S du ribosome se lie directement au milieu de la séquence 5' non codante de l'ARNm à un élément appelé IRES (*internal ribosome entry site*). Ce mécanisme a été décrit en premier pour l'ARNm du poliovirus et depuis, il a été montré que tous les ARNm des picornavirus ainsi que d'autres virus (l'EMCV, le virus de l'hépatite A, celui de l'hépatite C, etc.) possèdent des structures IRES. La rapamycine, en agissant sur la protéine 4E-BP1, inhibe spécifiquement le début de la traduction qui dépend de la coiffe alors que l'initiation interne n'est pas affectée [5]. Il était alors intéressant d'étudier l'effet de la rapamycine sur la synthèse des protéines virales lors d'infections par certains virus. Dans le cas du poliovirus et de l'EMCV on a montré que la rapamycine augmente la synthèse des protéines virales et accélère ainsi les effets de l'infection [20]. Cette observation est d'une grande importance sachant que l'immunosuppression majeure le risque d'infections virales, qu'il s'agisse de primo-infections ou de réactivations. Il serait en particulier important de tester les effets de la rapamycine sur le virus de l'hépatite C dont l'ARNm débute sa traduction par ce mécanisme d'initiation interne. En effet, si la rapamycine accélère l'infection par le virus de l'hépatite C, cette molécule ne pourrait pas être utilisée comme agent immunosuppresseur dans les transplantations hépatiques, certains décès de patients après transplantation pouvant être liés à des récives d'une hépatite subfulminante.

Conclusions

L'étude des mécanismes d'action de la rapamycine a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de signalisation reliant les signaux mitogènes

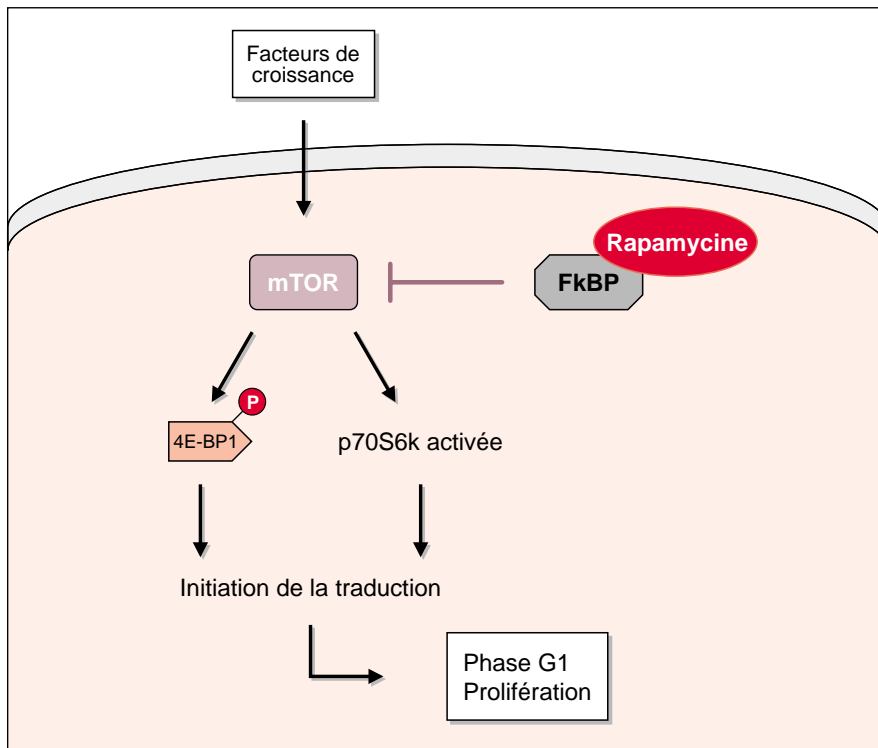


Figure 2. Schéma représentant la voie de signalisation des facteurs mitogéniques, sensible à la rapamycine et contrôlant la mise en route de la traduction. mTOR (mammalian target of rapamycin) activée par certains facteurs de croissance, règle parallèlement la fonction de 2 protéines impliquées dans l'initiation de la traduction : 4E-BP1 et p70S6 kinase. mTOR est inhibée par sa liaison au complexe rapamycine-FKBP.

extracellulaires à la régulation de la traduction [21]. La rapamycine est maintenant un très bon outil pour explorer l'activation du lymphocyte et d'autres types cellulaires ainsi que la signalisation impliquant un contrôle traductionnel de l'expression des gènes, mécanisme encore à ce jour relativement peu caractérisé. Également, l'analyse des fonctions de 4E-BP1, en particulier, permettra d'éclaircir les mécanismes de la croissance cellulaire sensibles à la rapamycine et peut-être de développer de nouvelles approches d'immunosuppression ■

RÉFÉRENCES

- Halloran PF. Immunosuppressive agents in clinical trials in transplantation. *Am J Med Sci* 1997; 313: 283-8.
- Sehgal SN. Rapamune (Sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action. *Therapeutic Drug Monitoring* 1995; 17: 660-5.
- Dumont FJ, Su Q. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci* 1996; 58: 373-95.

- Sonenberg N. mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. In *Translational Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY 1996; 245-70.
- Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 1996; 15: 658-64.
- Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the « polypyrimidine tract » mRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4441-5.
- Terada N, Patel HR, Takase K, Kohno K, Nairn AC, Gelfand EW. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11477-81.
- Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donzé O, Lin TA, Lawrence JC Jr, Sonenberg N. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 1994; 371: 762-7.
- Gingras A, Donzé O. Régulation par l'insuline de la synthèse protéique. *Med Sci* 1995; 11: 866-72.
- Price DJ, Grove JR, Calvo V, Avruch J, Bierer BE. Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* 1992; 257: 973-7.

- Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 1992; 69: 1227-36.
- Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70S6k. *EMBO J* 1997; 16: 3693-704.
- Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991; 253: 905-9.
- Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994; 369: 756-8.
- Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994; 78: 35-43.
- Zheng XF, Florentino D, Chen J, Crabtree GR, Schreiber SL. TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell* 1995; 82: 121-30.
- Von Manteuffel SR, Dennis PB, Pullen N, Gingras AC, Sonenberg N, Thomas G. The insulin-induced signalling pathway leading to S6 and initiation factor 4E binding protein 1 phosphorylation bifurcates at a rapamycin-sensitive point immediately upstream of p70S6k. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5426-36.
- Hara K, Yonezawa K, Kozlowski MT, Sugimoto T, Andrabi K, Weng QP, Kasuga M, Nishimoto J, Avruch J. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem* 1997; 272: 26457-63.
- Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence JC Jr, Abraham RT. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian Target of rapamycin. *Science* 1997; 277: 99-101.
- Beretta L, Svitkin YV, Sonenberg N. Rapamycin stimulates viral protein synthesis and augments the shutoff of host protein synthesis upon picornavirus infection. *J Virol* 1996; 70: 8993-6.
- Brown EJ, Schreiber SL. A signaling pathway to translational control. *Cell* 1996; 86: 517-20.

Laura Beretta
Annabelle Grolleau

Inserm U. 365, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, Pavillon Pasteur, 75005 Paris, France.

TIRÉS À PART

L. Beretta.