

Nouveau rôle de la PI 3-kinase dans l'activation de NF- κ B

Un grand nombre de gènes impliqués dans les mécanismes de l'inflammation et de la réponse immunitaire, dans le développement des cellules B et T ainsi que dans la protection contre l'apoptose sont réglés par des facteurs de transcription appartenant à la famille NF- κ B/Rel [1, 2]. Ces facteurs comportent un domaine d'homologie d'environ 300 acides aminés responsable de la fixation à l'ADN, de la dimérisation et de la localisation nucléaire. Certains des membres de la famille possèdent, en outre, un domaine d'activation de la transcription. Le facteur NF- κ B prototypique est un hétérodimère composé d'une sous-unité de 50 kDa (p50 ou NF- κ B1) et d'une sous-unité de 65 kDa (p65 ou RelA), cette dernière étant responsable de l'activité transcriptionnelle du facteur. La fonction de NF- κ B est réglée au niveau post-translationnel par l'interaction avec une famille de protéines inhibitrices appelées I κ B. Ces complexes I κ B/NF- κ B sont séquestrés dans le cytoplasme, bloquant ainsi toute activité transcriptionnelle nucléaire.

Un grand nombre de stimulus tels que les cytokines pro-inflammatoires, la stimulation antigénique des cellules B et T, les lipopolysaccharides bactériens, les rayons ultraviolets, les infections virales, les esters de phorbols et les radicaux oxygénés, ont la capacité d'activer NF- κ B. Il en résulte une cascade d'événements conduisant à la dégradation d'I κ B, à la libération et à la translocation nucléaire du facteur NF- κ B (figure 1). Cette voie de transduction du signal a été étudiée en détail et implique une série de protéines kinases (NIK, IKK α et β) phosphorylant I κ B sur deux

sérines conservées (sérines 32 et 36 pour I κ B- α). Cette phosphorylation conduit à son tour à la polyubiquitinylation d'I κ B et à sa dégradation par le protéasome [3].

Activation de NF- κ B par le pervanadate et la réoxygénation

Plus récemment, une nouvelle voie d'activation de NF- κ B a été identifiée [4]. Cette voie, stimulée par le pervanadate (inhibiteur de protéine tyrosine-phosphatases) et par le phénomène de réoxygénation, fait intervenir la phosphorylation de I κ B- α sur la tyrosine 42 (pY-I κ B- α). Cette phosphorylation conduit à la dissociation du complexe NF- κ B/I κ B- α sans que l'inhibiteur I κ B- α ne soit dégradé. Contrairement au site de phosphorylation des sérines, le site de phosphorylation de la tyrosine n'est pas conservé parmi les membres de la famille I κ B. La protéine-kinase impliquée dans la phosphorylation d'I κ B- α sur la tyrosine 42 n'a toujours pas été identifiée mais des données préliminaires, dans les cellules T, suggèrent l'intervention de la protéine-tyrosine kinase Lck [4]. Dans un article récemment publié [5], nous avons recherché le mécanisme par lequel la phosphorylation de la tyrosine 42 d'I κ B- α conduit à la dissociation du complexe NF- κ B/I κ B- α . Pour cela, nous avons utilisé une approche biochimique pour purifier des protéines interagissant avec un peptide correspondant à la région de la tyrosine 42 d'I κ B- α . Nous avons ainsi identifié deux protéines interagissant uniquement avec le peptide phosphorylé. Le microséquençage et l'analyse par immunoblot nous ont permis d'identifier ces protéines comme

les sous-unités régulatrice (p85) et catalytique (p110) de la phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase). La PI 3-kinase appartient à une famille de lipide- et protéine-kinases qui sont activées par un nombre important de facteurs de croissance, de cytokines et d'hormones. Les PI 3-kinases engendrent les phosphatidylinositols PI(3)P, PI(3,4)P2 et PI(3,4,5)P3, activent les Akt sérine/thréonine-kinases, p70^{S6k} kinase et probablement certaines protéine-kinases C [6].

L'interaction entre pY-I κ B- α et la PI 3-kinase

L'interaction entre pY-I κ B- α et la PI 3-kinase a été confirmée *in vivo* dans la lignée cellulaire T Jurkat après traitement au pervanadate. La sous-unité régulatrice p85 de la PI 3-kinase possède deux domaines SH2 (*Src homology domain 2*), connus pour leur interaction spécifique avec des protéines ayant une tyrosine phosphorylée. Le domaine SH2 de p85 interagit spécifiquement avec le motif consensus pY-(M/V/I/E)-X-M [7]. Outre la tyrosine phosphorylée, la méthionine en position +3 est extrêmement importante pour la fixation de pY-I κ B à la PI3-kinase puisque seule sa chaîne latérale est capable de pénétrer dans l'étroite poche hydrophobe du domaine SH2 de p85 [8]. Le site Y-E-Q-M (tyr, etc.) présent dans I κ B- α correspond parfaitement au consensus pour l'interaction avec le domaine SH2 de p85. Nous avons ainsi montré expérimentalement que cette interaction dépend non seulement de la phosphorylation de la tyrosine mais aussi de la présence de la méthionine en position +3. L'interaction de pY-I κ B- α avec p85

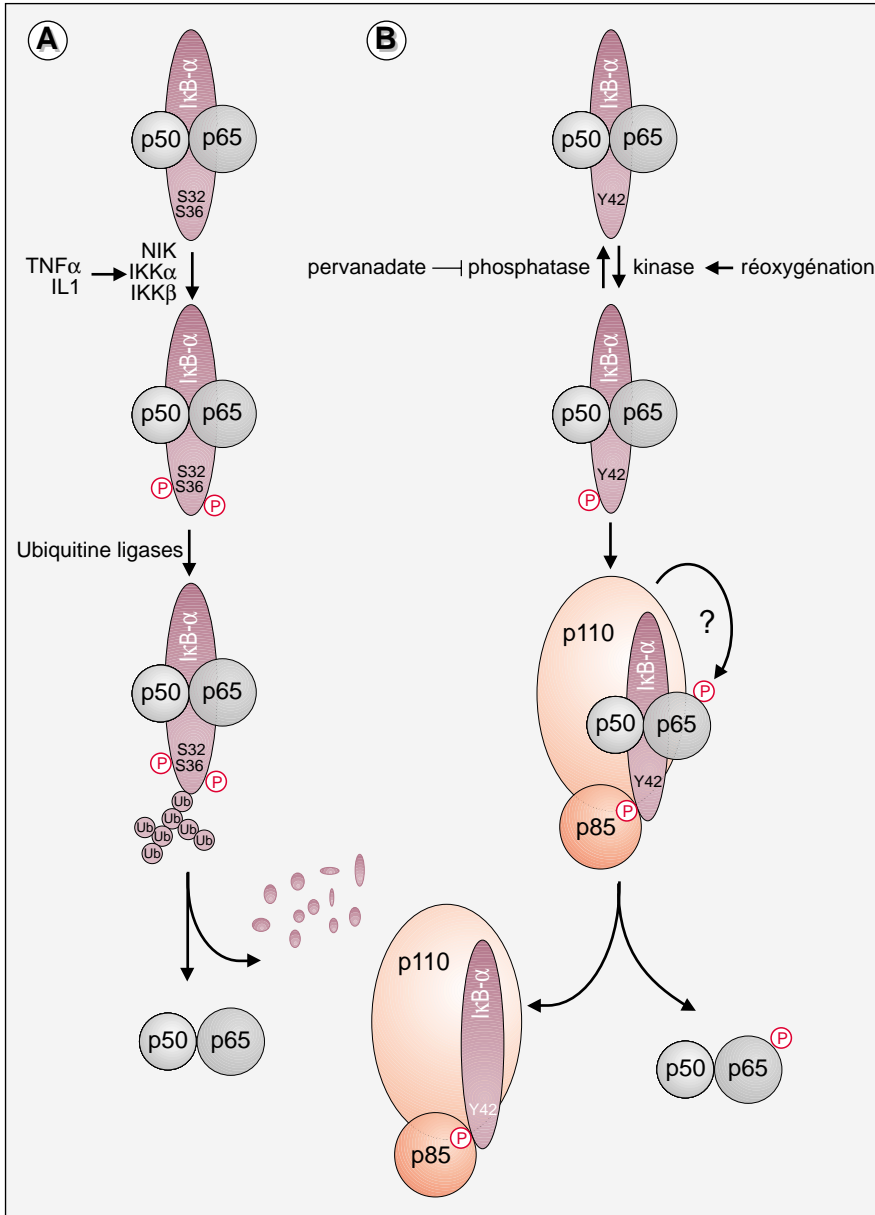


Figure 1. Les deux voies d'activation de NF-κB. A. L'induction par le TNFα ou l'IL-1 active les kinases NIK, IKKα et β. La phosphorylation de IκB-α sur les sérines 32 et 36 qui s'ensuit déclenche la polyubiquitination de IκB-α et sa dégradation par le protéasome, libérant ainsi le facteur NF-κB actif. B. L'induction par le pervanadate ou le phénomène de réoxygénation induit la phosphorylation de IκB-α sur la tyrosine 42. Cette phosphorylation provoque l'interaction de la PI 3-kinase avec IκB-α phosphorylé par l'intermédiaire de sa sous-unité régulatrice p85. Cette interaction rompt le complexe IκB-α/NF-κB libérant ainsi le facteur NF-κB actif. La sous-unité catalytique p110 joue aussi un rôle dans le mécanisme d'activation, peut-être en induisant la phosphorylation de p65, augmentant ainsi son activité transcriptionnelle intrinsèque.

est donc extrêmement spécifique et met en jeu les deux domaines SH2 présents dans p85.

La phosphorylation d'IκB-α sur la

tyrosine 42 permet son interaction avec la PI-3-kinase. La formation d'un complexe IκB-α/PI 3-kinase au détriment du complexe NF-κB/IκB-α

conduit ainsi à la libération de NF-κB sans dégradation d'IκB-α. Il est peu vraisemblable que la phosphorylation d'IκB-α sur la tyrosine 42 soit par elle-même suffisante pour dissocier le complexe NF-κB/IκB-α. En effet, la phosphorylation des sérines 32 et 36 adjacentes ne conduit pas à la dissociation du complexe [9]. La tyrosine 42 fait, en outre, partie d'un domaine qui n'est pas nécessaire à l'interaction avec NF-κB [10].

Si le rôle de p85 semble bien défini, celui de la sous-unité catalytique p110 présente dans le complexe pY-IκB-α/p85 nous a conduits à analyser l'effet de l'activité kinase sur l'activation de NF-κB. La wortmannine, un inhibiteur spécifique des PI 3-kinases [11], inhibe l'induction de NF-κB par le TNFα (*tumor necrosis factor α*) ou l'IL-1 (interleukine-1). Cette spécificité suggère l'importance de l'activité kinase de PI 3-kinase pour l'activation de NF-κB par le biais d'une phosphorylation sur résidus tyrosine mais pas sur résidus sérine. Mais le mécanisme n'est pas élucidé. Nous avons cependant observé que, même si la stimulation par le TNFα entraîne une plus forte activité de fixation à l'ADN de NF-κB comparée à celle observée en présence de pervanadate, l'activité transcriptionnelle est, en revanche, plus élevée lors de l'induction par le pervanadate. Il a été montré que la phosphorylation de p65 à son extrémité carboxy-terminale augmente l'activité transcriptionnelle de ce facteur [12]. Il est donc possible que p110 phosphoryle p65 lors de son interaction avec le complexe pY-IκB-α/NF-κB et, par conséquent, entraîne non seulement la libération de NF-κB mais aussi une augmentation de son activité transcriptionnelle (*figure 1B*). Alternativement, il est aussi possible que l'activation de PI 3-kinase induise, indépendamment, d'autres facteurs qui agiraient en synergie avec NF-κB en aval. La phosphorylation potentielle de certains membres du complexe NF-κB/IκB-α par la PI 3-kinase pourrait aussi être impliquée dans la dissociation du complexe.

Perspectives

L'activation de NF- κ B par certains stimulus comme le pervanadate et le phénomène de réoxygénation met en jeu la phosphorylation de l'inhibiteur I κ B- α sur la tyrosine 42. Cette phosphorylation induit l'interaction de I κ B- α avec la PI 3-kinase conduisant à la libération du facteur NF- κ B. NF- κ B active de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et par conséquent son activation et par conséquent son activation à la suite d'un événement d'ischémie/reperfusion pourrait contribuer à la perte de fonction et à la destruction des tissus au cours de la période post-ischémique. Cette nouvelle voie d'activation de NF- κ B devient donc une cible intéressante pour le développement de traitements qui n'affecteraient que

la réponse inflammatoire après un tel épisode.

C.B.

1. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: ten years later. *Cell* 1996; 87: 13-20.
2. Israël A. Les protéines Rel/NF- κ B et I κ B: nouvelles données sur la structure, la fonction et la régulation. *Med Sci* 1995; 11: 1017-20.
3. Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- κ B puzzle? *Curr Biol* 1998; 8: R19-22.
4. Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, et al. Tyrosine phosphorylation of I κ B- α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I κ B- α . *Cell* 1996; 86: 787-98.
5. Béraud C, Henzel WJ, Baeuerle PA. Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF- κ B activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 429-34.
6. Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 267-72.

7. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993; 72: 767-78.

8. Nolte RT, Eck MJ, Schlessinger J, Shoelson SE, Harisson SC. Crystal structure of the PI 3-kinase p85 amino-terminal SH2 domain and its phosphopeptide complexes. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 364-74.

9. Sun SC, Elwood J, Béraud C, Greene WC. Human T-cell leukemia virus type I Tax activation of NF- κ B/Rel involves phosphorylation and degradation of I κ B- α and RelA (p65)-mediated induction of the c-rel gene. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 7377-84.

10. Sun SC, Elwood J, Greene WC. Both amino- and carboxy-terminal sequences with I κ B- α regulate its inducible degradation. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1058-65.

11. Ui M, Okada T, Hazeki K, Hazeki O. Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 303-7.

12. Schmitz ML, dos Santos Silva MA, Baeuerle PA. Transactivation domain 2 (TA2) of p65 NF- κ B. Similarity to TA1 and phorbol ester-stimulated activity and phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 15576-84.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Détachement des choses matricielles... à en mourir!** La plupart des cellules s'attachent à une matrice extracellulaire qui constitue la trame des tissus, et cet attachement est nécessaire à leur propre survie. Les cellules adhèrent par des récepteurs, les intégrines – protéines hétérodimériques transmembranaires (d'où leur nom) – associant une chaîne α et une chaîne β [1]. Plus de 25 intégrines sont connues, et beaucoup (en particulier les intégrines β 1 et β 3) se lient à des composants de la matrice extracellulaire. Certains (le prototype en est la fibronectine) contiennent un tripeptide arginine-glycine-aspartate (RGD en code à une lettre des acides aminés). De précédentes expériences avaient mis en évidence le fait que le peptide RGD, administré sous forme soluble, provoquait un détachement des cellules de la matrice extracellulaire et, conséquence néfaste, leur entrée en apoptose, l'anoikis. La substitution d'un seul des trois acides aminés, même par un homologue, suffit à abolir l'effet du peptide RGD. Or il vient d'être démontré [2] que le

peptide RGD lui-même, indépendamment de la stimulation de l'intégrine, provoque l'entrée en apoptose de la cellule. En effet, le peptide, sous sa forme soluble et non matricielle, pénètre spontanément dans la cellule puis se lie à la pro-caspase-3 qu'il active [3]. Des cellules qui n'expriment pas la caspase-3, comme les cellules tumorales mammaires MCF-7, sont résistantes à l'effet pro-apoptotique du peptide RGD. De plus, la structure des caspases inclut des séquences RGD qui pourraient, en s'appariant aux séquences de liaisons DDX également présentes dans ces enzymes, expliquer leur auto-activation. Cet effet serait favorisé par la présence de grandes concentrations de caspases recrutées au niveau des molécules adaptatrices telles que FADD. Les auteurs font eux-mêmes remarquer qu'il reste à démontrer le caractère physiologique de l'observation, le peptide RGD n'étant pas présent sous forme soluble, sauf en cas de protéolyse ou de remodelage de la matrice extracellulaire. De fait, des séquences de liaison des RGD existent dans de nombreuses molé-

cules impliquées dans l'apoptose: par exemple APAF1 en présente 6, dont 5 dans les séquences WD40 connues pour être des motifs d'interaction protéine-protéine. Autre exemple, mais maintenant d'une protéine pro-apoptotique portant le motif RGD (R78GD), la protéine Tat de HIV-1, qui induit l'apoptose des lymphocytes qui l'internalisent. Ce travail permet déjà d'envisager de nombreuses nouvelles stratégies thérapeutiques: l'effet anti-angiogénique de peptides dérivés de protéines de la matrice extracellulaire, tel que l'angiostatine, est-il lié à des séquences RGD? Est-il possible de rendre ces peptides spécifiques d'une caspase donnée en ajoutant certains acides aminés au motif central? Peut-on provoquer la sécrétion endogène de peptides RGD pour contrôler l'inflammation ou certaines tumeurs?

- [1. Hynes R. *Cell* 1992; 69: 11-25.]
- [2. Buckley C, et al. *Nature* 1999; 397: 534-9.]
- [3. Mignon A, et al. *Med Sci* 1998; 14: 9-17.]