

La protéine Vav, une mosaïque de domaines de signalisation

Francisco Romero
Isabelle Dusanter-Fourt
Siegfried Fischer

Le proto-oncogène *Vav* est exprimé essentiellement dans les cellules d'origine hématopoïétique. Cependant, très récemment *Vav2*, un nouveau gène apparenté à *Vav*, a été identifié, exprimé dans des contextes cellulaires très variés. Il pourrait jouer un rôle proche de celui de *Vav* dans les cellules non hématopoïétiques. Après activation de différents types de récepteurs, la protéine Vav est rapidement, et de manière transitoire, phosphorylée sur résidus tyrosine. Des molécules de signalisation présentes, soit dans le cytoplasme, soit dans le noyau sont associées à Vav. Cette protéine présente une étonnante diversité de domaines structuraux conservés qui ont, pour la plupart, été impliqués dans des interactions protéine-protéine nécessaires à la transmission intracellulaire de différents signaux. Indispensable au développement et au caractère fonctionnel des cellules lymphoïdes T et B, la protéine Vav constitue un passionnant sujet pour l'étude des diverses voies de transmission du signal.

L'activation de récepteurs à la surface d'une cellule (récepteurs de facteurs de croissance, d'hormones, de cytokines, d'antigènes...) est suivie de la formation de complexes de signalisation qui transmettent cette activation à l'intérieur de la cellule. L'identification de ces complexes est fondamentale pour comprendre comment une cellule se maintient en survie, comment elle prolifère et/ou s'engage vers une différenciation particulière, et comment elle se multiplie de manière anarchique au cours de processus tumoraux. Très fréquemment, immédiatement après l'activation d'un récepteur par son ligand, de nombreuses protéines sont phosphorylées

sur tyrosine de manière transitoire. Parmi ces protéines, la protéine p95^{Vav} (Vav) a été identifiée. Le gène *Vav* est exprimé exclusivement dans les cellules d'origine hématopoïétique. L'analyse de sa séquence primaire montre qu'elle ne contient pas de site de liaison de l'ATP ni de domaine caractéristique d'une activité kinase. La protéine Vav doit donc être le substrat d'une ou plusieurs protéine tyrosine kinases (PTK). L'originalité de Vav réside dans l'exceptionnelle variété de domaines structuraux présents dans cette protéine, ces domaines étant conservés dans différents types de molécules de transmission du signal. Cela suggère que la molécule Vav pourrait être elle-même impliquée

ADRESSE

F. Romero : *chercheur post-doctoral*. I. Dusanter-Fourt : *chargée de recherche à l'Inra*. S. Fischer : *directeur de recherche à l'Inserm*. Institut Cochin de génétique moléculaire, Inserm U.363, Hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

teurs transcriptionnels. Ce domaine est probablement impliqué dans des phénomènes d'hétérodimérisation protéine-protéine avec d'autres protéines à HLH. Il pourrait ainsi fonctionner comme un régulateur négatif en formant des hétérodimères inactifs. En outre, la perte du domaine HLH transforme le proto-Vav en une protéine oncogénique sur des lignées fibroblastiques [3].

Leucine-zipper (LZ)

La protéine Vav possède un domaine de dimérisation à glissière de leucine (*leucine-zipper*) (Leu-X₆-Leu-X₆-Phe-X₆-Leu) [3]. Il faut noter que les domaines conservés HLH et LZ présentent une convergence de séquence avec une région conservée dans la partie carboxy-terminale des membres de la famille Myc, ainsi qu'avec le domaine de liaison aux stéroïdes des récepteurs nucléaires [2].

Domaine d'homologie de la calponine (CH)

Un domaine conservé de la calponine a été décrit dans la molécule Vav et dans d'autres protéines de signalisation [8]. Les protéines de la famille des calponines sont impliquées dans la régulation de la contraction des muscles lisses. Les domaines CH ont été identifiés dans la région de liaison à l'actine de l' α -actinine et des molécules apparentées, suggérant qu'ils participeraient à l'association aux filaments d'actine et qu'ils interviendraient dans l'organisation du cytosquelette. Le domaine CH de Vav se superpose aux domaines HLH et LZ.

La région amino-terminale de Vav présente également 22 % d'identité avec un domaine interne de la protéine CDC24 de *Saccharomyces cerevisiae* qui participe à l'organisation du cytosquelette au cours du processus de bourgeonnement [4].

Domaine acide (Ac)

L'analyse détaillée de la partie amino-terminale de Vav révèle l'existence d'un sous-domaine de 45 acides aminés, composé principalement de résidus acides (23 Glu + Asp), qui pourrait également participer à des interactions protéine-protéine [1].

Domaine Dbl (DH)

Au centre de la molécule Vav se situe un domaine d'environ 230 acides aminés qui présente des similitudes avec le produit de l'oncogène humain *DBL*, du gène de levure *CDC24* et du gène humain *BCR*. La protéine Dbl est un facteur d'échange GDP-GTP pour CDC42Hs [9], un membre de la famille Rho/Rac (*m/s n° 7, vol. 11, p. 1039*). Les protéines CDC24Sc et CDC42Sc sont nécessaires à la mise en place d'une polarité à l'intérieur du cytoplasme de la levure bourgeonnante et à l'assemblage des microtubules et des filaments au site de bourgeonnement. La protéine Bcr possède une activité sérine-thréonine-kinase, une fonction de facteur d'échange de Rho/Rac de type Dbl et une activité GTPase pour certains membres de cette même famille Rho/Rac. Ces analogies structurales suggèrent que Vav pourrait fonctionner comme un facteur d'échange GDP-GTP pour les petites protéines G et participer à la régulation de l'architecture cellulaire, notamment au cours du cycle mitotique. L'analyse de l'analogie entre Vav et l'ensemble des protéines pouvant avoir une activité d'échange ou de libération du nucléotide guanine (*guanine nucleotide releasing factor, GRF*) parmi les membres de la superfamille des protéines Ras conduit à penser que Vav contrôle plutôt une activité d'échange de nucléotide sur les protéines de type Rho que sur les protéines de type Ras *stricto sensu*. Néanmoins, une équipe de recherche a pu montrer que la protéine Vav contrôle elle-même une activité d'échange de Ras à la suite de l'activation des récepteurs des IgM dans les cellules lymphoïdes B ou des récepteurs de l'antigène TCR dans les cellules lymphoïdes T [10]. De même, dans des cellules fibroblastiques exprimant la forme proto-oncogénique ou oncogénique de *Vav*, l'activité de Vav est corrélée à l'activité de Ras et des MAP kinases [11]. Au contraire, d'autres équipes ont démontré que Vav n'a pas d'activité de facteur d'échange guanine de Ras (*guanine exchange factor, GEF*) et que la surexpression de *Vav* n'augmente pas le niveau de la forme Ras-GTP [12]. Si les données concernant l'éventuelle activité de facteur d'échange

de Ras de Vav sont contradictoires, il n'en reste pas moins vrai que : (1) la surexpression de *Vav* ne compense pas l'inhibition de croissance de cellules exprimant le mutant ponctuel dominant négatif de Ras, RasN17; (2) la morphologie des cellules NIH3T3 transformées par *Vav*, caractérisée par le développement de fibres de *stress* et de plaques d'adhérence, est totalement différente de celle des cellules transformées par Ras ou RasCDC25 (à activité de facteur d'échange de Ras) et s'apparente bien plus à la morphologie de cellules transformées par Rho; (3) ni Vav ni Dbl ne peuvent induire l'activation transcriptionnelle à partir d'éléments de réponse de promoteurs activés par la voie Ras. L'ensemble de ces éléments suggère que Vav et Ras interviendraient dans des voies de signalisation distinctes.

Domaine d'homologie de la pleckstrine (PH)

La protéine Vav contient un domaine conservé de la pleckstrine, d'environ 100 acides aminés. Ce domaine PH est présent dans de nombreuses protéine kinases, certaines isoformes de phospholipases C (PLC), de GTPases, de GAP (*GTPases activating proteins*) et facteurs d'échange GEF. Il est maintenant connu que ce domaine permet une interaction spécifique avec certains phospholipides, des protéines liant le GTP et des résidus sérine-thréonine phosphorylés (*voir aussi, p. 639 et p. 731 de ce numéro*) [13].

Domaine riche en cystéine

La protéine Vav possède également un domaine riche en cystéine contenant deux motifs possibles en doigt de zinc (Cys-X₂-Cys-X₁₃-Cys-X₂-Cys et His-X₂-Cys-X₆-Cys-X₂-His). Le motif amino-terminal est totalement conforme au motif conférant l'activité transactivatrice de la protéine d'adénovirus E1A, du facteur Gal4 de levure ou de certains récepteurs stéroïdes. Ces motifs facilitent la liaison protéine-ADN ou protéine-protéine [1, 3]. Une analyse plus approfondie de l'alignement des résidus cystéine permet de proposer une structure alternative à la précédente (Cys-X₂-Cys-X₁₃-Cys-X₂-Cys-X₇-Cys-X₆-Cys), se rapprochant de celle des domaines

RÉFÉRENCES

13. Musacchio A, Gibson T, Rice P, Thompson J, Saraste M. The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 343-8.

14. Gulbins E, Coggeshall KM, Baier G, Telford D, Langlet C, Baier-Bitterlich G, Bonnefoy-Berard N, Burn P, Wittinghofer A, Altman A. Direct stimulation of Vav guanine nucleotide exchange activity for Ras by phorbol esters and diglycerides. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4749-58.

15. Clevenger CV, Ngo W, Sokol DL, Luger SM, Gewirtz AM. Vav is necessary for prolactin-stimulated proliferation and is translocated into the nucleus of a T-cell line. *J Biol Chem* 1995; 270: 13246-53.

16. Cussac D, Frech M, Chardin P. Binding of the Grb2 SH2 domain to phosphotyrosine motifs does not change the affinity of its SH3 domains for Sos proline-rich motifs. *EMBO J* 1994; 13: 4011-21.

17. Hobert O, Jallal B, Schlessinger J, Ullrich A. Novel signaling pathway suggested by SH3 domain-mediated p95^{Vav}/heterogeneous ribonucleoprotein K interaction. *J Biol Chem* 1994; 269: 20225-8.

18. Bustelo XR, Suen KL, Michael WM, Dreyfuss G, Barbacid M. Association of the Vav proto-oncogene product with poly(rC)-specific RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1324-32.

19. Romero F, Dargemont C, Pozo F, Reeves WH, Camonis J, Gisselbrecht S, Fischer S. p95^{Vav} associates with the nuclear protein Ku-70. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 37-44.

20. Hobert O, Schilling JW, Beckerle MC, Ullrich A, Jallal B. SH3 domain-dependent interaction of the proto-oncogene product Vav with the focal contact protein zyxin. *Oncogene* 1996; 12: 1577-81.

21. Ramos-Morales F, Romero F, Schweighoffer F, Bismuth G, Camonis J, Tortolero M, Fischer S. The proline-rich region of Vav binds to Grb2 and Grb3-3. *Oncogene* 1995; 11: 1665-9.

22. Ye ZS, Baltimore D. Binding of Vav to Grb2 through dimerization of Src homology 3 domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12629-33.

23. Bustelo XR, Barbacid M. Tyrosine phosphorylation of the Vav proto-oncogene product in activated B cells. *Science* 1992; 256: 1196-9.

de fixation des esters de phorbol et du diacylglycérol (DAG) dans les protéines kinases C (PKC) et dans les diacylglycérol kinases [2]. Les travaux montrant que Vav possède elle-même une activité de facteur d'échange de Ras ont ultérieurement mis en évidence que cette activité de facteur d'échange dépendait de la présence des esters de phorbol, nécessitait l'intégrité du domaine cystéine, et mettait en jeu l'activation de voies de transmission du signal dépendantes des diglycérides [14, 15]. L'activité de facteur d'échange de Vav pourrait ainsi être contrôlée par deux éléments: l'état de phosphorylation de Vav dépendant des PTK et l'association de seconds messagers lipidiques indépendante des PTK. L'ensemble de ces données reste néanmoins controversé et certains groupes ont montré que Vav ne fixait pas d'esters de phorbols [12]. Quelle que soit la fonction précise de cette région riche en cystéine, le remplacement de certains résidus cystéine ou histidine abolit totalement l'activité transformante de onc-Vav, démontrant l'importance de ce domaine dans le fonctionnement de Vav.

Domaines SH3

La région carboxy-terminale de Vav présente des domaines de type SH2 et SH3 identifiés dans de multiples molécules de signalisation comme des enzymes de types PTK et PLC γ , phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) et Ras-GAP, et des molécules adaptatrices comme Crk, Nck, Grb2, Shc, et d'autres substrats de tyrosine kinases (*m/s n° 6/7, vol. 10, p. 709*) [16]. Les domaines SH3 ont environ 50 acides aminés et sont connus pour fixer des séquences protéiques riches en proline et être responsables ainsi d'interactions protéine-protéine. Ces domaines semblent participer à la localisation des protéines au niveau de sites particuliers à l'intérieur de la cellule. La protéine Vav possède deux domaines SH3 (N-SH3 et C-SH3) flanquant un domaine SH2. A l'heure actuelle, Grb2 est la seule protéine identifiée pour interagir avec un motif riche en proline du domaine N-SH3 alors que plusieurs protéines comme hnRNP K, Ku-70, ou la protéine zyxine s'associent au domaine C-SH3 [17-20].

Motif riche en proline

Curieusement, la protéine Vav contient un motif riche en proline [1, 21] situé dans le domaine N-SH3 lui-même. Nous avons pu montrer que l'association entre Vav et Grb2 met en jeu le domaine C-SH3 de Grb2 et le motif riche en proline de Vav [21, 22].

Domaine SH2

La protéine Vav possède un domaine SH2. Les domaines SH2 sont des domaines d'environ 100 acides aminés permettant l'interaction avec des protéines contenant des résidus tyrosine phosphorylés (*m/s n° 6/7, vol. 10, p. 709*) [23, 24]. Chaque type de domaine SH2 présente une spécificité de reconnaissance de trois à quatre résidus situés du côté carboxy-terminal du résidu tyrosine phosphorylé. Ces domaines participent à la régulation de l'activité des PTK et des substrats phosphorylés. La séquence optimale de reconnaissance du domaine SH2 de Vav est pTyr-(Met/Leu/Glu)-Glu-Pro [25]. Ce domaine SH2 de Vav participe à l'association de Vav aux récepteurs de l'EGF (*epidermal growth factor*) et du PDGF (*platelet derived growth factor*) qui suit immédiatement l'association ligand-récepteur dans des cellules non hématopoïétiques de type NIH3T3 ou des cellules de rein embryonnaire exprimant Vav [24, 26]. De même, l'activation des récepteurs des IgM dans les cellules lymphoïdes B induit l'association dépendante de SH2 de Vav avec une protéine phosphorylée sur tyrosine (P-Tyr) de 70 kDa, Vap-1 [23]. Dans les cellules lymphoïdes T activées via le TCR (*T-cell antigen receptor*) plusieurs protéines phosphorylées sur tyrosine s'associent au domaine SH2 de Vav, dont la protéine tyrosine kinase Zap-70 (*m/s n° 2, vol. 11, p. 268*) [27]. De même, Vav et la kinase Jak2 co-précipitent dans des cellules activées par le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), l'association entre Jak2 et le seul domaine SH2 de Vav ayant été mise en évidence *in vitro* [28]. Le domaine SH2 peut également lier la forme phosphorylée de PTP1C (phosphotyrosine phosphatase 1C), mais cette interaction est fortement augmentée en présence des deux domaines SH3 [29].

Sites de phosphorylations

Selon nos connaissances actuelles des sites consensus de phosphorylation par les PTK, Vav possède 11 sites potentiels de phosphorylation sur tyrosine (Tableau I). Nous avons pu montrer que la forme phosphorylée de Vav (P-Tyr Vav) peut interagir avec plusieurs protéines à domaines SH2 dont Shc, PI3K, et Ras-GAP. Ces données suggèrent ainsi que Vav serait phosphorylée sur plusieurs sites. Néanmoins, les sites de phosphorylation n'ont encore jamais été identifiés *in vivo*.

Autres caractéristiques

La protéine Vav présente un site potentiel de phosphorylation par la protéine kinase A, et est phosphorylée sur résidus sérine et thréonine *in vivo*. Elle possède également deux

séquences de localisation nucléaire possibles, et quatre sites consensus de glycosylation [1] (Tableau I) mais l'on ignore tout de leur éventuel caractère fonctionnel.

Activité transformante de Vav

La protéine onc-Vav présente une délétion de la partie amino-terminale comprenant tout le domaine HLH de proto-Vav (figure 1). Alors que Vav n'est pas transformante, cette seule délétion du domaine amino-terminale la rend capable de transformer les cellules NIH3T3 [3]. L'intégrité des domaines SH2 de multiples PTK, et notamment des membres de la famille Src, joue un rôle important dans leur pouvoir transformant. Une mutation ponctuelle de certains résidus conservés de ce domaine (Trp

148, Arg 155, ou Gly 170 de c-Src) active leur pouvoir transformant. La plupart des domaines SH2 présentent également un motif conservé Phe-Leu-Val-Arg-Glu-Ser (FLVRES). La mutation du résidu arginine présent dans ce motif abolit totalement l'activité transformante des PTK de la famille Src. Le domaine SH2 de Vav présente des caractéristiques structurales bien différentes des domaines SH2 de Src, Abl ou Fps [30]. Aucune des mutations ponctuelles du domaine SH2 de Vav équivalentes aux mutations activatrices ou inhibitrices des kinases de type Src n'a d'effet sur le pouvoir transformant de Vav. En revanche, la mutation d'autres résidus conservés du domaine SH2 ou de certains résidus cystéine ou histidine du domaine riche en cystéine abolit l'activité transformante de onc-Vav [2]. Cependant, l'étude du pouvoir oncogène des formes normales ou mutantes de Vav n'a été effectuée que dans des cellules d'origine fibroblastique n'exprimant pas normalement le gène *Vav*. Il serait particulièrement intéressant de réaliser les mêmes types d'expériences dans un contexte de cellules hématopoïétiques où les protéines interagissant normalement avec Vav sont également présentes.

Le gène *VAV* est localisé sur le chromosome 19 chez l'homme dans une région présentant de multiples anomalies caryotypiques dans certaines hémopathies (p12-p13.2) [7]. Il est possible que la surexpression ou la présence de formes mutées de *VAV* puisse participer au processus transformant. L'analyse systématique de patients présentant différents types de désordres hématologiques ne semble pas avoir encore été entreprise.

Localisation subcellulaire

Les travaux initiaux, utilisant une approche cytochimique, avaient permis de conclure à une localisation de Vav principalement cytoplasmique [5]. Ces données étaient tout à fait en accord avec le concept selon lequel Vav est phosphorylée sur tyrosine immédiatement après l'activation de récepteurs à la surface des cellules hématopoïétiques. Néanmoins, certaines caractéristiques structurales de Vav suggéraient une localisation

Tableau I

DOMAINES STRUCTURAUX IDENTIFIÉS DANS LA PROTÉINE VAV ET LEURS PARTENAIRES CONNUS

Domaine	Position (aa)	Partenaires	Références
HLH	27-68		[3]
LZ	72-93	ENX-1	[3, 43]
CH	3-115	Filaments d'actine ?	[8]
Ac	132-176		[1]
DH	198-434	Rho/Rac ?	[4, 12]
PH	397-508		[13]
Domaine cystéine	529-567	Lipides (phorbol esters) ?	[1, 12, 14, 15]
N-SH3	603-659		[16]
SH2	671-765	R-EGF, R-PDGF, Vap-1, Zap-70, Syk, Jak2, PTP1C, SLP-76	[23, 24, 26-28]
C-SH3	787-841	hnRNP K, Ku-70, hnRNP C, Zyxine	[16-20]
Motif proline	607-610	Grb2	[1, 21]
SLN	487-494 et 576-583		[1]
Tyr(P)	142, 160, 174, 209, 423, 441, 604, 745, 826, 841 et 844	Shc, PI3K, Ras-GAP, Crk, Nck, PLC γ	[37]
Sites de glycosylation	377-379, 510-512, 641-643 et 687-689		[1]
Substrat pour PKA	440		[1]

HLH, domaine à motif hélice-boucle-hélice ; LZ, motif leucine zipper ; CH, domaine conservé des calponines ; Ac, région riche en acides aminés acides ; DH, domaine conservé de Dbl ; PH, domaine conservé de la pleckstrine ; SH3 et SH2, domaines conservés de Src ; SLN, séquence de localisation nucléaire ; Tyr(P), sites potentiels de phosphorylation sur tyrosine. La position des acides aminés se réfère à la protéine Vav humaine.

RÉFÉRENCES

24. Bustelo XR, Ledbetter JA, Barbacid M. Product of Vav proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates. *Nature* 1992; 356: 68-71.

25. Songyang Z, Shoelson SE, McGlade J, Olivier P, Pawson T, Bustelo XR, Barbacid M, Sabe H, Hanafusa H, Yi T, Cantley LC. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2777-85.

26. Margolis B, Hu P, Katzav S, Li W, Oliver JM, Ullrich A, Weiss A, Schlessinger J. Tyrosine phosphorylation of Vav proto-oncogene product containing SH2 domain and transcription factor motifs. *Nature* 1992; 356: 71-4.

27. Katzav S, Sutherland M, Packham G, Yi T, Weiss A. The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav. *J Biol Chem* 1994; 269: 32579-85.

28. Matsuguchi T, Inhorn RC, Carlesso N, Xu G, Druker B, Griffin JD. Tyrosine phosphorylation of p95^{Vav} in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3 and steel factor and is constitutively increased by p210^{BCR/ABL}. *EMBO J* 1995; 14: 257-65.

29. Kon-Kozlowsky M, Pani G, Pawson T, Siminovitch KA. The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 3856-62.

30. Seidel-Dugan C, Meyer BE, Thomas SM, Brugge JS. Effects of SH2 and SH3 deletions on the functional activities of wild-type and transforming variants of c-Src. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 1835-45.

31. Huby RD, Carlile GW, Ley SC. Interactions between the protein tyrosine kinase ZAP-70, the proto-oncoprotein Vav, and tubulin in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 30241-4.

32. Wu J, Katzav S, Weiss A. A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95^{Vav} activity. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4337-46.

33. Gouy H, Debre P, Bismuth G. The proto-oncogene Vav product is constitutively tyrosine-phosphorylated in normal human immature T cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 3030-4.

34. Miura O, Miura Y, Nakamura N, Quelle FW, Witthuhn BA, Ihle JN, Aoki N. Induction of tyrosine phosphorylation of Vav and expression of Pim-1 correlates with Jak2-mediated growth signaling from the erythropoietin receptor. *Blood* 1994; 84: 4135-41.

nucléaire de cette protéine. Non seulement Vav présente deux séquences potentielles de localisation nucléaire (leur caractère fonctionnel n'a pas encore été démontré), mais Vav possède aussi un domaine acide, un domaine LZ et un domaine HLH qui sont fréquemment présents sur des facteurs nucléaires. Par des techniques de fractionnement subcellulaire, des expériences d'immunofluorescence, de microscopie confocale et de microscopie électronique sur des cellules lymphoïdes T normales, des cellules de lymphomes type Jurkat ou encore des cellules mégacaryoblastiques type UT-7, il a été montré que Vav est localisée dans le cytoplasme et dans le noyau, même en l'absence d'activation cellulaire ([15, 19], résultats non publiés). En outre, il a été montré qu'il existe une translocation de Vav depuis le cytoplasme vers le noyau dans des cellules lymphoïdes T activées par la prolactine [15].

Certaines données suggèrent également un rôle de Vav dans l'organisation du cytosquelette [4, 8, 20, 31]. Néanmoins, la localisation de Vav au niveau du cytosquelette ou de plaques d'adhérence n'a encore jamais été recherchée.

Phosphorylation de Vav

L'activation d'une multitude de récepteurs de surface, qu'ils soient membres de la superfamille des récepteurs de cytokine, des récepteurs à activité tyrosine-kinase, des récepteurs à sept domaines transmembranaires, de la famille des récepteurs d'antigènes ou de la superfamille des molécules d'adhérence, déclenche la phosphorylation sur tyrosine de Vav, de manière rapide et transitoire (figure 2).

Les récepteurs de cytokines comme les récepteurs de l'interleukine (IL)-2, IL-3, IL-5, du GM-CSF, de l'éry-

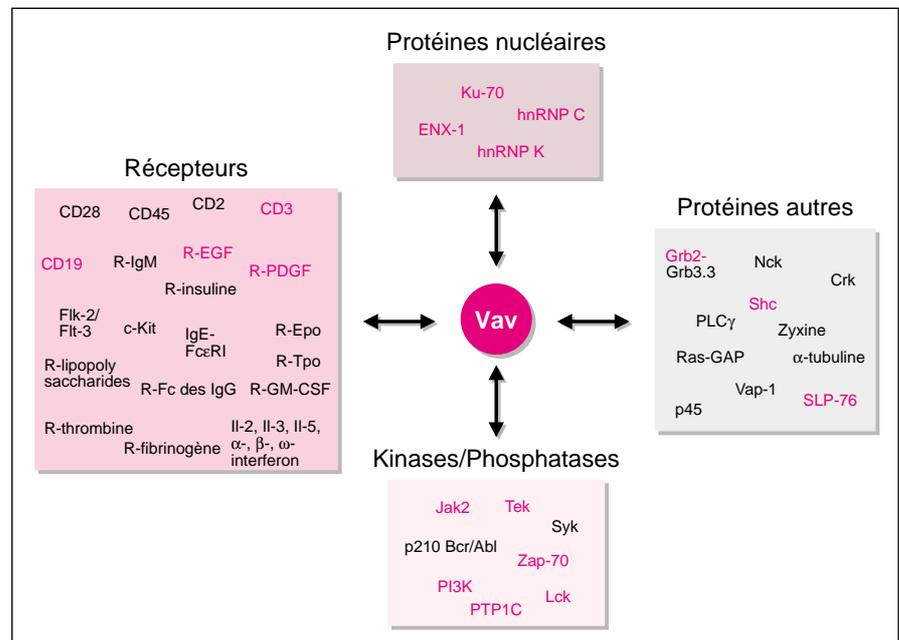


Figure 2. **Schéma récapitulatif des différentes protéines interagissant avec Vav.** Les partenaires de Vav ont été séparés de manière très schématisée en quatre familles : les protéines transmembranaires de type récepteur, les protéines à activité enzymatique de type tyrosine kinase ou tyrosine phosphatase, les protéines à localisation principalement nucléaire et les protéines ne présentant aucune des caractéristiques précédentes. Il est évident que certains partenaires peuvent appartenir à plusieurs familles, mais par souci de clarté chaque partenaire n'a été figuré que dans une seule famille. Les protéines identifiées comme associées à Vav par des expériences de co-immunoprécipitation (in vivo) sont en rouge.

thropoïétine (Epo), de la thrombopoïétine (Tpo), les récepteurs des interférons α , β , ω , les récepteurs des facteurs de croissance de type EGF, PDGF, insuline ou c-Kit, Flk-2/Flt-3, ainsi que le récepteur de la thrombine et le récepteur du fibrinogène induisent tous la phosphorylation sur tyrosine de Vav après fixation de leurs ligands respectifs.

De même, les récepteurs Fc ϵ RI sur les cellules basophiles, les différents récepteurs des fragments Fc des IgG, le récepteur CD28, le récepteur de l'antigène des cellules lymphoïdes T (TCR), les récepteurs des IgM, le récepteur CD19 des cellules lymphoïdes B ou les récepteurs des lipopolysaccharides des monocytes/macrophages. Par des tests de co-précipitation, on a montré que Vav s'associe au récepteur de l'EGF, du PDGF et au TCR activés [24, 26, 32], la phosphorylation dépendante du TCR de Vav étant perdue dans des cellules n'exprimant plus un complexe CD3-TCR fonctionnel [32]. En revanche, Vav est présente sous une forme déjà phosphorylée sur tyrosine dans des cellules lymphoïdes intrathymiques fraîchement isolées sans que l'on connaisse précisément le déterminisme de cette phosphorylation [33].

Parmi les récepteurs dont l'activation entraîne la phosphorylation sur tyrosine de Vav, beaucoup ne présentent pas d'activité kinase intrinsèque, mais activent des PTK cytoplasmiques. Les PTK de type Jak sont fréquemment associées aux récepteurs de cytokine et pourraient être responsables de la phosphorylation de Vav. En effet, la région juxta-membranaire du récepteur de l'érythropoïétine (R-Epo) est nécessaire à la phosphorylation de Vav, cette région étant également la région de liaison de Jak2 [34]. En outre, dans les cellules stimulées par l'érythropoïétine, Vav se lie directement à Jak2 phosphorylée et associée au récepteur de l'érythropoïétine [28]. Par ailleurs, des expériences de co-précipitation indiquent que la kinase Tec peut également se lier à Vav dans les cellules activées en présence d'érythropoïétine ou d'IL-3, suggérant ainsi que Vav pourrait interagir avec et/ou être phosphorylée par plusieurs tyrosine kinases différentes. Dans les cellules lymphoïdes T activées en présence de ligand du TCR,

Vav est phosphorylée avec une cinétique identique à celle de l'activation de la tyrosine kinase Lck. Différents éléments suggèrent que Lck participerait à la phosphorylation de Vav dans ces cellules. D'une part, une partie de Vav est co-précipitée avec Lck, d'autre part, la molécule recombinante de Lck phosphoryle Vav *in vitro*. Enfin, les cellules dans lesquelles les deux copies du gène *Lck* sont délétées (*Lck*^{-/-}) semblent ne plus pouvoir induire la phosphorylation de Vav [35]. Dans ce même contexte cellulaire, il existe également une interaction très forte entre Vav et la forme phosphorylée sur tyrosine d'une autre tyrosine kinase, Zap-70, pouvant impliquer jusqu'à 5% des protéines Zap-70 des cellules T activées (type Jurkat) [27]. L'interaction Vav/Zap-70 met en jeu la participation du domaine SH2 de Vav, l'association spécifique entre Zap-70 (ou même certains peptides de Zap-70) et la protéine de fusion GST-Vav (SH2) étant possible *in vitro* [27]. Pourtant, la cinétique de phosphorylation de Vav semble incompatible avec celle de Zap-70, le maximum de phosphorylation de Vav se situant environ 0,5-1 minute après la stimulation du récepteur CD3-TCR des cellules T alors que celui de Zap-70 se situe après environ 10 minutes. Ces données suggèrent ainsi que, bien qu'interagissant avec Vav, Zap-70 n'est pas la kinase qui phosphoryle Vav.

La protéine Vav se trouve également phosphorylée sur tyrosine dans des cellules exprimant l'oncogène *Bcr/Abl*. Si un mutant thermosensible de *p210^{Bcr/Abl}* est introduit dans ce même contexte cellulaire, la phosphorylation de Vav s'avère strictement dépendante de l'activité kinase de *p210^{Bcr/Abl}*.

Il n'existe pas, à notre connaissance, de données concernant l'identité des résidus tyrosine phosphorylés sur Vav *in vivo*. En revanche, *in vitro*, en utilisant une série de peptides contenant des résidus tyrosine dérivés de Vav, la forme purifiée de la kinase Syk (très proche de Zap-70) phosphoryle sélectivement le résidu Tyr174 de Vav [36]. Nos propres données dans les cellules T (Jurkat) activées suggèrent également que Vav serait phosphorylée sur plusieurs résidus tyrosine, Vav étant immunoprécipitée par une

grande variété de protéines de fusion GST-SH2 issues des molécules de signalisation telles que Crk, Nck, GAP, et PLC γ dont la spécificité de reconnaissance de séquence P-Tyr est très différente [37].

Si la phosphorylation sur tyrosine de Vav est rapidement induite dans les cellules hématopoïétiques en présence de nombreux ligands de récepteurs, cette phosphorylation est tout à fait transitoire. Plusieurs tyrosine phosphatases semblent participer, de manière directe ou indirecte, à cette déphosphorylation.

Le rôle des différentes isoformes de CD45 a été récemment analysé. Elles forment une famille de protéine tyrosine phosphatases (PTP) transmembranaires qui jouent un rôle déterminant dans l'activation des cellules T. Lorsque des cellules T *CD45*^{-/-} sont analysées après réintroduction des isoformes CD45(0) ou CD45(ABC), respectivement l'isoforme la plus courte et la plus longue de CD45, l'induction de la phosphorylation de Vav dépendante de CD3 apparaît beaucoup plus forte dans les cellules exprimant CD45(ABC).

Dans ces cellules, la précipitation de Vav entraîne avec elle une protéine phosphorylée sur tyrosine de 76 kDa, appelée SLP-76, dont la phosphorylation dépend de CD45. La protéine SLP-76 se fixe à Vav avec une plus grande affinité dans les cellules CD45(ABC) et présente un motif tyrosine phosphorylé défini comme le motif optimal de reconnaissance par le domaine SH2 de Vav.

La protéine SLP-76 s'associe de manière constitutive à Grb2 *via* le domaine C-SH3 de Grb2 et perd la faculté de s'associer à Vav en présence du peptide contenant le site de fixation au motif SH2 de Vav.

En outre, Vav et SLP-76 s'associent dans des cellules T activées en présence de concentrations physiologiques d'antigène/CMH. La protéine SLP-76 présentant un domaine SH2, il sera intéressant de déterminer l'identité de molécules associées au complexe SLP-76/Vav.

La protéine PTP1C est une tyrosine phosphatase cytoplasmique contenant un domaine SH2, synthétisée de manière prépondérante dans les cellules hématopoïétiques. Dans les cellules spléniques ou les cellules de mastocytomes stimulées en présence

RÉFÉRENCES

35. Gupta S, Weiss A, Kumar G, Wang S, Nel A. The T-cell antigen receptor utilizes Lck, Raf-1, and MEK-1 for activating mitogen-activated protein kinase. Evidence for the existence of a second protein kinase C-dependent pathway in an Lck-negative Jurkat cell mutant. *J Biol Chem* 1994; 269: 17349-57.
36. Brunati AM, Donella-Deana A, Ruzzene M, Marin O, Pinna LA. Site specificity of p72^{Syk} protein tyrosine kinase: efficient phosphorylation of motifs recognized by Src homology 2 domains of the Src family. *FEBS Lett* 1995; 367: 149-52.
37. Ramos-Morales F, Druker BJ, Fischer S. Vav binds to several SH2/SH3 containing proteins in activated lymphocytes. *Oncogene* 1994; 9: 1917-23.
38. Wulf GM, Adra CN, Lim B. Inhibition of hematopoietic development from embryonic stem cells by antisense Vav RNA. *EMBO J* 1993; 12: 5065-74.
39. Zmuidzinas A, Fischer KD, Lira SA, Forrester L, Bryant S, Bernstein A, Barbacid M. The Vav proto-oncogene is required early in embryogenesis but not for hematopoietic development *in vitro*. *EMBO J* 1995; 14: 1-11.
40. Fischer KD, Zmuidzinas A, Gardner S, Barbacid M, Bernstein A, Guidos C. Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4⁺ CD8⁺ thymocytes. *Nature* 1995; 374: 474-7.
41. Tarakhovsky A, Turner M, Schaal S, Mee PJ, Duddy LP, Rajewsky K, Tybulewicz VL. Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature* 1995; 374: 467-70.
42. Zhang R, Alt FW, Davidson L, Orkin SH, Swat W. Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the Vav proto-oncogene. *Nature* 1995; 374: 470-3.
43. Hobert O, Jallal B, Ullrich A. Interaction of Vav with ENX-1, a putative transcriptional regulator of homeobox gene expression. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3066-73.
44. Cichowski K, Brugge JS, Brass LF. Thrombin receptor activation and integrin engagement stimulate tyrosine phosphorylation of the pro-oncogene product, p95^{Vav}, in platelets. *J Biol Chem* 1996; 271: 7544-50.
45. Weng WK, Jarvis L, Le Bien TW. Signaling through CD19 activates Vav/mitogen-activated protein kinase pathway and induces formation of a CD19/Vav/phosphatidylinositol 3-kinase complex in human B cell precursors. *J Biol Chem* 1994; 269: 32514-21.

du facteur Steel (*stem cell factor*), Vav et PTP1C sont associées, suggérant que PTP1C pourrait déphosphoryler Vav [29].

Il existe des animaux dépourvus de PTP1C fonctionnelle (souris motheaten *me* ou *me^e*). Ces animaux présentent de graves désordres hématopoïétiques. Le rôle éventuel de Vav dans l'émergence de ces désordres n'est actuellement pas connu.

La protéine Vav est également phosphorylée sur résidus sérine et thréonine, mais le rôle et la modulation possibles de ces phosphorylations sont inconnus. Il semble que la prolactine augmente le niveau de phosphorylation Ser/Thr dans les cellules lymphoïdes T type Nb2 [15] et qu'il existe une activité Ser/Thr kinase co-précipitée avec Vav [27].

Fonctions biologiques de Vav

Les fonctions biologiques de Vav ont été étudiées en utilisant des approches techniques très différentes.

Les oligonucléotides antisens

L'introduction d'oligonucléotides antisens de *Vav* dans les cellules souches embryonnaires (cES) inhibe profondément la différenciation hématopoïétique, suggérant que Vav pourrait être nécessaire au développement hématopoïétique précoce [38]. Ces données sont en contradiction avec celles des invalidations géniques (*knock-out*) de *Vav*. L'introduction d'antisens de *Vav* dans des cellules hématopoïétiques normales ou malignes bloque la croissance et la différenciation des cellules progénitrices de la lignée érythroïde de type BFU-E et inhibe partiellement la différenciation des progéniteurs plus immatures de type CFU-mix. Les autres types de cellules hématopoïétiques ne sont pas affectés.

Les invalidations de gène (expériences de *knock-out*)

L'analyse des cellules et des animaux présentant une invalidation fonctionnelle des deux copies du gène *Vav* a apporté une vision intéressante de la fonction de Vav. Les cellules ES *Vav^{-/-}* se différencient normalement en culture et produisent des cellules

hématopoïétiques de type érythroïde, myéloïde et mastocytaire [39].

Cependant, les embryons *Vav^{-/-}* meurent au moment de l'implantation, suggérant un rôle de Vav dans le développement embryonnaire précoce et/ou le processus d'implantation [39]. L'étude des animaux *Vav^{-/-}*, n'a donc pu se faire qu'à travers l'obtention d'animaux chimériques *Vav^{-/-}*, *Rag2^{-/-}* (*recombinase activating gene-2*), pour lesquels le déficit d'implantation et/ou de développement embryonnaire précoce dû à l'absence des gènes *Vav* est complétement. Chez de tels animaux, il est apparu que Vav a un rôle important dans l'expansion des cellules lymphoïdes B et T, ainsi que dans la maturation dépendante du TCR des cellules T intrathymiques, en particulier le passage des cellules double positive à simple positive [40-42].

L'absence de *Vav* conduit également à une réduction considérable de la réponse à l'activation antigénique des cellules B et T [40-42], alors que l'activation de ces mêmes cellules, indépendante de l'antigène, n'est pas altérée (par les phorbol esters ou l'IL-2) [42]. Il se pourrait que le rôle de Vav dans l'implantation et/ou le développement embryonnaire ne fût qu'artefactuel, l'obtention de nouveaux animaux *Vav^{-/-}* semblant indiquer que ces animaux sont fertiles et à développement global normal (Tybulewicz, communication personnelle).

Surexpression du gène *Vav*

La transfection de *Vav* dans des cellules lymphoïdes T permet d'obtenir des cellules qui surexpriment *Vav* à un niveau 5 à 10 fois plus élevé que la normale. Ces cellules répondent nettement mieux à une stimulation antigénique (*via* le TCR) en terme d'induction des facteurs transcriptionnels NF-AT et NF-IL-2A [32]. De manière intéressante cette induction du facteur NF-AT nécessite l'intégrité de la partie N-terminale de Vav, qui se trouve délétée dans la forme oncogénique de Vav [2, 3]. En revanche, l'activation du facteur NF-AT par les récepteurs couplés à des protéines G n'est absolument pas affectée par la surexpression de *Vav*, suggérant ainsi un rôle sélectif de Vav dans la transmission du signal issu du récepteur CD3/TCR activé.

Protéines partenaires de Vav

Tout récemment, un certain nombre de protéines partenaires de Vav, identifiées surtout par leur interaction avec Vav selon la méthode du double hybride en levure, ont été caractérisées et semblent révéler des fonctions inattendues de Vav (figure 2).

On a montré que Vav interagit avec des protéines liant l'ARN de manière spécifique de poly(rC), en particulier hnRNP K et une nouvelle protéine p45. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de l'épissage, de la stabilisation et/ou du transport des ARN hors du noyau, suggérant ainsi un rôle de Vav dans ces processus [17, 18].

La protéine hnRNP K contient trois motifs riches en proline chacun interagissant avec le domaine C-SH3 de Vav [17, 18]. Ces motifs sont adjacents à une région qui fixe une kinase sensible à l'IL-1. Cette kinase phosphoryle hnRNP K, cette phosphorylation étant dépendante de la présence de poly(rC). La protéine hnRNP K pourrait être ainsi une protéine pivot rassemblant protéines et ARN.

Le domaine C-SH3 de Vav interagit également avec deux autres protéines, Ku-70 et hnRNP C, ces protéines étant principalement nucléaires ([19] et résultats non publiés). La protéine Ku-70 est l'élément liant l'ADN du complexe protéine kinase dépendant de l'ADN (*DNA-dependent protein kinase*) impliqué dans les processus de réparation de l'ADN, de réplication, de recombinaison et certains événements transcriptionnels [19]. L'interaction entre le domaine C-SH3 de Vav et Ku-70 pourrait mettre en jeu de nouveaux types d'interaction protéine-protéine puisque Ku-70 ne contient pas de motifs riches en proline (Pro-X₂-Pro). La protéine hnRNP C est, quant à elle, impliquée dans la maturation et l'épissage d'ARN pré-messagers.

La protéine Vav s'associe aussi à la protéine nucléaire ENX-1 [43], une nouvelle protéine humaine apparentée à la protéine codée par le gène *Drosophila Enhancer of Zeste*. Ce gène est un membre du groupe des gènes *Polycomb* dont les produits sont des régulateurs transcriptionnels de

l'expression des gènes à homéoboîte. On peut co-précipiter Vav et ENX-1 à partir d'extraits nucléaires de lignées de cellules de type Jurkat (lymphoïde T) et HEL (érythroïde), ainsi que, à un niveau moindre, à partir d'extraits cytoplasmiques.

Cette interaction fait participer une région qui inclut le domaine LZ de Vav. Par ailleurs, l'expression de *Enx-1* semble se superposer à celle de Vav dans le système hématopoïétique. En effet, *Enx-1* est exprimé de manière ubiquitaire pendant les toutes premières étapes de l'embryogenèse ; plus tard au cours du développement de l'embryon, cette expression se restreint à certains sites du système nerveux central et périphérique ainsi qu'aux sites principaux de l'hématopoïèse fœtale. Dans les stades tardifs du développement embryonnaire ENX-1 est seulement détectable dans le thymus [43]. Il est donc envisageable que Vav participe à la régulation de la transcription de gènes à homéoboîte importants dans le développement ou le maintien du système hématopoïétique, y compris dans le développement intrathymique où Vav semble avoir un rôle prépondérant (voir les expériences de *knock-out*) [40-42].

La protéine Vav s'associe également à l' α -tubuline qui est constitutivement phosphorylée sur tyrosine. Cette interaction suggère que Vav pourrait participer à l'organisation du cytosquelette en interagissant avec la tubuline [31].

Un tel rôle serait parfaitement en accord avec les données selon lesquelles de nombreux agents induisant une modification du cytosquelette des plaquettes sanguines humaines, comme la thrombine, le collagène, ou le fibrinogène, activent tous la phosphorylation rapide et transitoire de Vav, bien que la thrombine active un récepteur lié aux protéines G et que le fibrinogène active un récepteur intégrine [44]. De même, des données récentes indiquent que le domaine C-SH3 de Vav s'associe avec le motif riche en prolines d'une protéine des plaques d'adhérence, la protéine zyxine. Cette protéine pourrait servir de point d'ancrage de Vav au niveau des plaques d'adhérence et autres zones de contacts intercellulaires. Cela permet ainsi la transmission des impor-

tants réarrangements du cytosquelette et l'induction des structures adhésives, phénomènes qui ont lieu au cours de processus de différenciation (différenciation mégacaryocytaire), ou de différentes formes d'activation cellulaire.

En dehors de ces nouvelles interactions, Vav participe à la formation de complexes multimoléculaires, et en particulier le complexe trimérique Shc-Grb2-Vav [37] ou le complexe CD19-PI3K-Vav [45], mais le rôle fonctionnel de ces complexes n'est pour l'instant pas connu.

Perspectives et orientations futures

L'ensemble des données récentes concernant Vav a mis en évidence un rôle prépondérant de Vav dans l'expansion des cellules lymphoïdes B et T et leur activation en présence d'antigène. Néanmoins, les étapes précises où la molécule Vav devrait intervenir sont encore tout à fait inconnues.

Si l'identification des partenaires de Vav tels que hnRNP K, hnRNP C, Ku-70 et ENX-1 a permis de révéler un rôle possible de Vav dans des événements nucléaires tels que la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN ou la maturation des ARN, la fonction particulière de Vav dans ces processus reste à préciser.

De même, plusieurs données convergent pour suggérer une fonction de Vav dans l'organisation du cytosquelette (comme la présence d'un domaine à activité de facteur d'échange de Rho/Rac, l'interaction de Vav avec des protéines liées au cytosquelette comme l' α -tubuline ou la zyxine) sans que l'on sache encore comment Vav participerait à cette organisation.

Compte tenu de l'expression exclusivement hématopoïétique de Vav et de sa mosaïque de motifs de signalisation il reste à étudier si Vav ne serait pas impliquée dans certaines formes de désordres hématologiques. Compte tenu également de la grande parenté de structure entre Vav et Vav2, il reste à établir si Vav2 détient le même rôle que Vav dans les cellules non hématopoïétiques et, en particulier, si la délétion de la partie amino-terminale de Vav2 produit une molécule transformante ■

Summary

Vav, a protein with multiple signaling domains

The proto-oncogene *Vav* is expressed solely in cells of hematopoietic origin regardless of their differentiation lineage. However, a new homologue of *Vav* has recently been identified, *Vav2*, which is widely expressed. *Vav* is an interesting molecule which contains a large variety of structural motives involved in cell signaling. *Vav* has a leucine-rich region, a leucine-zipper, a calponin homology domain, an acidic domain, a Dbl-homology domain, a pleckstrin homology domain, a cysteine-rich domain, two Src homology 3 and one Src homology 2 domains and a proline rich region in the amino-SH3 domain. These domains may be responsible for protein-protein interactions which suggest an important role for *Vav* in signaling events. *Vav* is rapidly and transiently tyrosine phosphorylated through the activation of multiple receptors. A number of signaling molecules present in either cytoplasm or nucleus were shown to associate with *Vav*. Recently, the generation of knock-out (*Vav*^{-/-}) mice pointed to an essential role of *Vav* in proliferation/activation of T and B cells. The purpose of this review is to summarize the current knowledge on *Vav* and its role in cellular activation.

Remerciements

Ce travail n'a pu être réalisé que grâce à un financement de la communauté européenne (FR, bourse CE) et à l'aide de l'Association de la Recherche contre le Cancer (projets de SF et ID-F).

TIRÉS À PART

S. Fischer.