

Les ions superoxyde : médiateurs essentiels des effets mitogéniques induits par l'oncogène Ras

La transmission intracellulaire des signaux engendrés par la fixation à leurs récepteurs membranaires de ligands extracellulaires (hormones, cytokines, facteurs de croissance, etc.) met en jeu, parmi d'autres moyens, la synthèse ou la libération de composés de petite taille et de nature chimique variée souvent appelés seconds messagers. Ces médiateurs peuvent être classiquement des nucléotides cycliques, des ions métalliques et divers lipides. Il est apparu, au cours des dernières années, que la signalisation intracellulaire utilise également comme messagers les composés instables et très réactifs que sont les espèces activées de l'oxygène (*reactive oxygen species* ROS) et de l'azote (*reactive nitrogen species* RNS). Ainsi ces composés, qui étaient conventionnellement considérés comme des produits toxiques du métabolisme cellulaire, sont mis en jeu dans la régulation de phénomènes cellulaires tels que : l'action des facteurs de croissance et des cytokines, le transport ionique, la régulation des facteurs de transcription, l'apoptose [1].

Le mieux caractérisé des systèmes enzymatiques de production des ions superoxyde est le complexe de la NADPH oxydase (β -nicotine-amide adénine dinucléotide phosphate-oxydase), présent dans les cellules phagocytaires et les lymphocytes B. La production importante d'espèces réactives de l'oxygène par les phagocytes contribue activement à l'effet bactéricide par oxydation des structures biologiques (*m/s* n° 7, vol. 11, p. 1039). Le complexe NADPH oxydase se compose du cytochrome b558, flavocytochrome membranaire et hétérodimérique (comprenant la gp91phox et la p22phox) et d'au moins trois protéines cytosoliques régulatrices p47phox, p67phox et la protéine Rac, membre de la sous

famille des petites protéines G de type Rho [2-4]. Dans les cellules non phagocytaires dans lesquelles la production d' $O_2^{\cdot-}$ et d'autres espèces réactives est beaucoup moins importante, le système enzymatique générateur n'est pas bien défini. Il semble cependant que, dans de nombreux types cellulaires, il existe un complexe semblable par sa fonction à la NADPH oxydase des phagocytes [5]. Une série de travaux récents provenant du groupe de Goldschmidt-Clermont (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) vient de montrer que la production d'espèces réactives de l'oxygène est impliquée dans la transmission du signal mitogène induit par l'oncogène *Ras* [6, 7].

Ce groupe avait déjà montré que la protéine Rac, qui règle la production de ces espèces réactives de l'oxygène dans les cellules phagocytaires, semblait exercer la même fonction dans des fibroblastes [6]. En effet la surproduction des formes activées des protéines Ras et Rac1 dans des cellules NIH3T3 conduit à augmenter le niveau intracellulaire des superoxydes. Cette augmentation est comparable à celle observée en réponse à une stimulation des cellules par les facteurs de croissance EGF (*epidermal growth factor*) et PDGF (*platelet-derived growth factor*). La synthèse du dominant négatif de Rac1 (*Rac1N17*) inhibe cette augmentation. Rac1 réglerait donc la production des espèces réactives de l'oxygène en aval de Ras. De plus, cette production est inhibée par le DPI (diphénylène iodonium), un inhibiteur spécifique des flavoprotéines, alors qu'elle n'est pas affectée par la roténone, un inhibiteur d'oxydases mitochondriales. Le système enzymatique de production des superoxydes se compose probablement de flavoprotéines et semble donc très proche du com-

plexe de la NADPH oxydase décrit dans les cellules phagocytaires.

Des travaux publiés dans la revue *Science* du 14 mars dernier, provenant du même groupe, mettent clairement en évidence une concentration anormalement élevée de superoxydes intracellulaires dans des lignées de fibroblastes (lignée A6) transformées par l'oncogène *Ras* synthétisant de façon constitutive la forme active de la protéine Ras. Grâce à l'utilisation d'une technique très sensible fondée sur la résonance paramagnétique électronique (RPE), les auteurs ont pu mesurer la concentration de superoxyde intracellulaire. Dans les cellules A6, transfectées par le dominant négatif de *Ras* (*RasN17*), le signal RPE induit par les superoxydes est diminué, montrant que la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules A6 dépend de l'activation de l'oncogène *Ras*. Cherchant la cible de *Ras* qui conduit à la production de ces espèces, ils ont démontré que la voie Ras-Raf n'était pas impliquée. En effet, ils n'observent pas de radicaux oxygénés intracellulaires dans les cellules transformées par le gène *Raf* activé. En outre, le dominant négatif de *Rac1* (*Rac1N17*) inhibe la production d' $O_2^{\cdot-}$. Dans les cellules A6, Ras semble donc induire la production d' $O_2^{\cdot-}$ via Rac1. Par ailleurs, il a déjà été montré que la protéine Rac est essentielle à la transformation par *Ras* de fibroblastes de rat et qu'il existe une forte synergie pour la transformation entre *Rac1V12* et *Raf* activé [8]. L'oncogène *Ras* active donc à la fois la voie des MAP kinases via Raf et celle des superoxydes via Rac (*figure 1*).

Quelle(s) voie(s) est responsable de l'effet mitogénique de *Ras* et conduit à une synthèse d'ADN ? Les auteurs ont tenté de répondre à cette question en utilisant un agent antioxydant

(N-acétyl L cystéine). Ils observent alors que l'inactivation des superoxydes ne conduit pas à une inhibition totale de la synthèse d'ADN, indiquant que $O_2^{\cdot-}$ n'est pas le seul médiateur de la voie mitogénique des cellules transformées par *Ras*. Dans les cellules transformées par l'oncogène *Raf*, l'inhibition de la synthèse d'ADN après traitement des cellules par la N-acétyl L cystéine est faible. La voie mitogénique *via Raf* semble donc indépendante de la production des superoxydes. Les ions superoxyde ne sont pas la seule espèce réactive de l'oxygène ayant un effet mitogène. Un autre médiateur potentiel (moins important) pourrait être l'eau oxygénée, H_2O_2 . En effet, la surexpression de la catalase (enzyme du catabolisme de H_2O_2) conduit à une légère diminution de la synthèse d'ADN.

Il reste à comprendre comment, dans ces cellules, la voie de production des superoxydes induite par *Ras* et réglée par *Rac* peut conduire à la synthèse d'ADN. Il est généralement admis que les effets des espèces actives de l'oxygène sont relayés par des modifications covalentes de groupements sulfhydryl essentiels à la fonction de certaines protéines. Il a été décrit, en

particulier, qu'ils pouvaient modifier l'activité des phosphotyrosine-phosphatases et la capacité de certains facteurs de transcription de se lier à l'ADN [9, 10]. Au moins deux facteurs de transcription bien connus sont réglés par l'état redox intracellulaire : le facteur nucléaire NFκB qui active les gènes contribuant au phénomène d'inflammation et le complexe activateur AP1 qui contrôle la transcription de gènes impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire. Il se pourrait donc que les effets mitogènes des ions superoxyde soient reliés à l'activité de ces facteurs.

Dans certaines cellules l'activation des MAP kinases (MAPK) et de la Jun kinase (JNK) en réponse aux facteurs de croissance ou aux cytokines dépend de la production d'espèces réactives de l'oxygène [11, 12]. Cependant, dans les cellules A6, l'activité de la MAPK diminue et la JNK n'est pas activée, suggérant que la production de ces espèces dans les cellules transformées par *Ras* déclenche une voie intracellulaire dépendante de *Rac*, différente de celle activée par les facteurs de croissance ou les cytokines (figure 1). Cette voie pourrait permettre aux cellules A6 de progresser dans le cycle cellulaire en absence de facteurs de croissance. Dans un autre modèle, celui des cellules musculaires lisses vasculaires, la prolifération est également modulée par le niveau intracellulaire des radicaux actifs de l'oxygène. En effet, l'inactivation par le *transforming growth factor* TGFβ des enzymes qui contrôlent le catabolisme des radicaux oxygénés (catalase et glutathion peroxydase) augmente le signal de prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires induit par le PDGF [13]. La modulation de l'état redox intracellulaire semble être un moyen essentiel de la régulation des signaux mitogéniques. Cela pourrait expliquer l'effet thérapeutique d'agents antioxydants dans certains cancers humains.

Jusqu'à présent, on connaissait la propagation du signal dans la cellule par des interactions protéine-protéine, par la phosphorylation-déphosphorylation des protéines et par des seconds messagers chimiquement stables. La nature éphémère des radicaux libres et la difficulté de mesurer leur concen-

tration ont été des facteurs limitants pour mettre en évidence leur fonction potentielle de second messenger. Mais des résultats de plus en plus nombreux indiquent clairement que de faibles concentrations d'espèces réactives de l'oxygène sont capables de moduler des voies diverses de transmission du signal. L'activité de second messenger de ces espèces peut être réglée au niveau de leur production ou de la disponibilité de leur cible ou, enfin, de leur élimination par les enzymes de leur catabolisme.

C.A.
R.L.

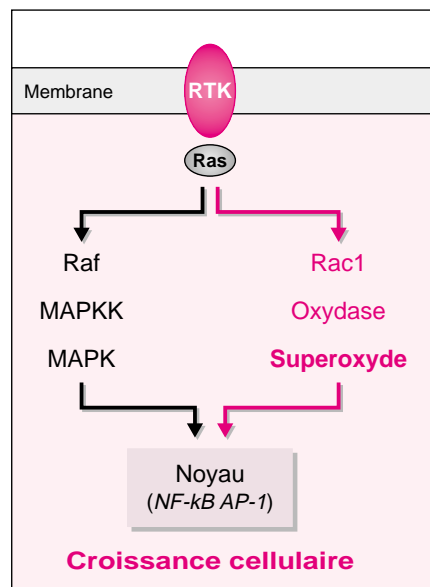


Figure 1. **Voies de transmission du signal mitogénique du produit de l'oncogène Ras.** Ras active deux voies indépendantes : la voie des MAP kinases, passant par Raf et la voie des superoxydes, passant par Rac.

- Lander, HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997; 11 : 118-24.
- Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 1991; 254: 1512-5.
- Dorseuil O, Reibel L, Bokoch GM, Camonis J, Gacon G. The Rac target NADPH oxidase p67phox interacts preferentially with Rac2 rather than Rac1. *J Biol Chem* 1996; 271 : 83-8.
- Fuchs A, Dagher MC, Vignais, PV. Mapping the domains of interaction of p40phox with both p47phox and p67phox of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system. *J Biol Chem* 1995; 270 : 5695-7.
- Jones SA, Wood JD, Coffey MJ, Jones OT. The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts. *FEBS Lett* 1994; 355: 178-82.
- Sundaresan M YZ-X, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T. Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J* 1996; 318: 379-82.
- Irani K XY, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ. Mitogenic Signaling Mediated by Oxidants in Ras-Transformed Fibroblasts. *Science* 1997 ; 275 : 1649-52.
- Qiu RG, Chen J, Kirn D, McCormick F, Symons M. An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 1995; 374: 457-9.
- Hecht D, Zick Y. Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H_2O_2 and vanadate *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 773-9.
- Abate C, Patel L, Rauscher FJd, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity *in vitro*. *Science* 1990; 249: 1157-61.
- Lo YYC WJ, Cruz TF. Reactive Oxygen Species Mediate Cytokine Activation of c-JunNH₂-terminal Kinases. *J Biol Chem* 1996; 271 : 15703-7.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270 : 296-9.
- Nishio E WY. Transforming growth factor β is a modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells: a possible role for catalase activity and glutathione peroxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232 : 1-4.