

# Dissection moléculaire des mécanismes d'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B : de nouvelles cibles thérapeutiques en prévision

Les protéines de la famille NF- $\kappa$ B sont des facteurs de transcription particulièrement importants pour l'élaboration et la coordination des réponses immunes et inflammatoires. NF- $\kappa$ B participe également à la régulation de la croissance et de la mort cellulaires [1].

De très nombreux stimulus physiopathologiques : antigènes, cytokines, contacts cellulaires, conditions de stress, virus, activent NF- $\kappa$ B. Le facteur contrôle, en retour, l'expression de gènes diversifiés codant pour des immunorécepteurs, des cytokines et leurs récepteurs, des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, des génomes viraux.

## Les mécanismes moléculaires de l'activation de NF- $\kappa$ B

Les protéines NF- $\kappa$ B sont présentes sous forme d'hétérodimères, retenus dans le cytoplasme sous une forme inactive par une sous-unité inhibitrice de la famille I $\kappa$ B dont les principaux membres sont I $\kappa$ B-a, b et e (pour revues voir [2, 3]).

La fixation d'I $\kappa$ B sur un dimère NF- $\kappa$ B masque le signal de localisation nucléaire présent sur chaque sous-unité du facteur de transcription, empêchant ainsi sa translocation dans le noyau.

L'activation de NF- $\kappa$ B requiert donc l'élimination de l'inhibiteur I $\kappa$ B. L'engagement de récepteurs de surface, comme ceux du TNF $\alpha$  ou de l'IL1, induit la phosphorylation des sérines 32 et 36 d'I $\kappa$ B-a. Comme le montre un article récent [4], la phosphorylation permet le recrutement d'une ubiquitine ligase, responsable de l'ajout d'une série de molécules

d'ubiquitine au niveau des lysines 21 et 23 d'I $\kappa$ B-a qui constituent un signal de reconnaissance pour le protéasome, un complexe multiprotéique enzymatique qui va alors dégrader I $\kappa$ B-a *in situ*, libérant NF- $\kappa$ B pour sa translocation nucléaire.

Un autre mécanisme d'activation a également été mis en évidence. Il utilise la phosphorylation de la tyrosine 42 d'I $\kappa$ B-a qui entraîne une dissociation des complexes sans dégradation de l'inhibiteur [5]. Les relations fonctionnelles entre ces deux voies d'activation de NF- $\kappa$ B restent à explorer. L'activation de NF- $\kappa$ B dépendante d'une tyrosine kinase pourrait être mise en jeu par certaines espèces de radicaux libres oxygénés produits lors de phénomènes d'ischémie et reperfusion [6].

La sous-unité inhibitrice s'apparente donc à un intégrateur des signaux d'activation. Les efforts intenses développés dans la recherche des mécanismes moléculaires de la phosphorylation d'I $\kappa$ B ont été couronnés par plusieurs découvertes ces deux dernières années.

## L'activation de NF- $\kappa$ B : une cascade de kinases

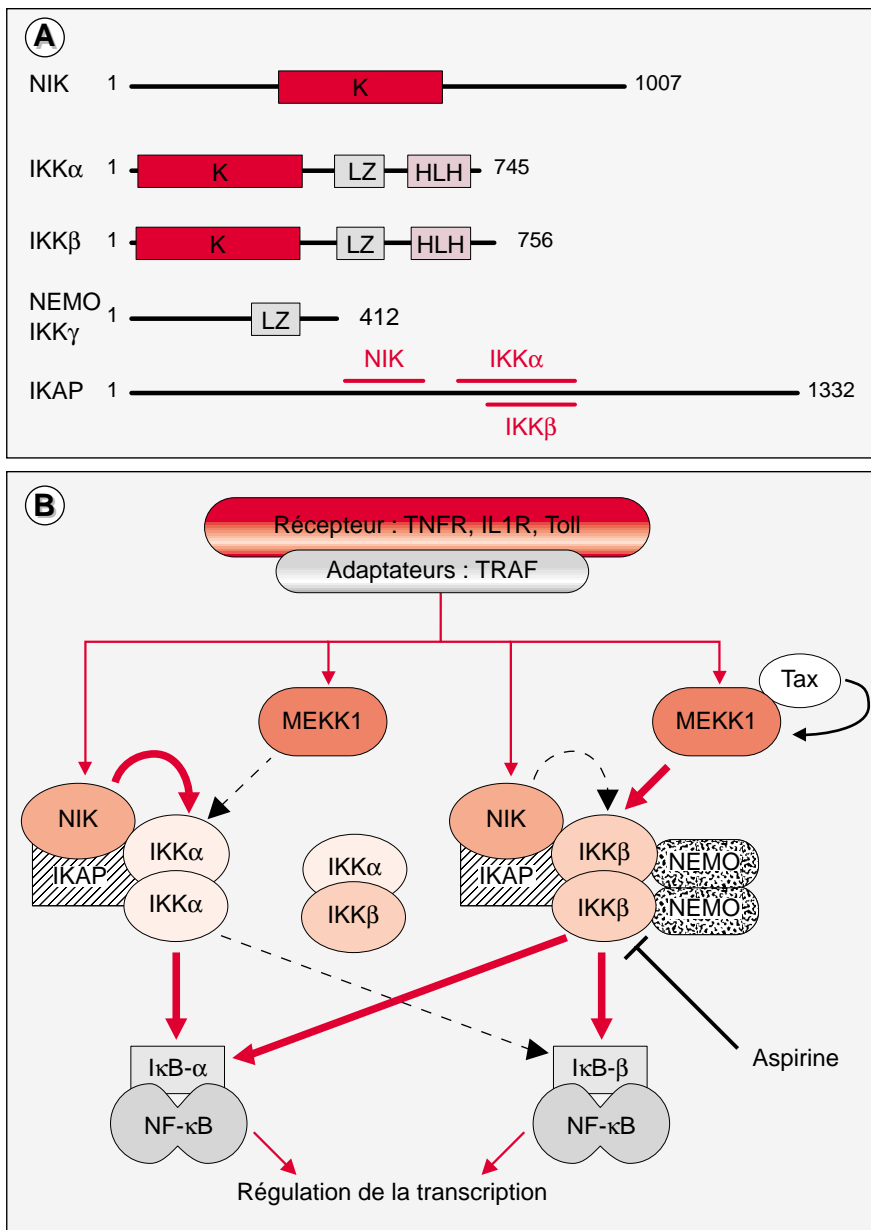
Une première sérine kinase, NIK, a été isolée par la technique du double hybride chez la levure, en utilisant comme appât TRAF-2 (*TNF-receptor-associated factor 2*), un adaptateur des récepteurs de l'interleukine 1 et du TNF $\alpha$  (figure 1) (*m/s* 1998, n° 4, p. 511) [7]. NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*) est capable d'activer NF- $\kappa$ B dans des expériences de transfection, mais pas de phosphoryler directement I $\kappa$ B-a.

Deux autres sérine kinases, capables de phosphoryler les sérines 32 et 36 d'I $\kappa$ B-a, ont été ensuite purifiées par des techniques classiques de biochimie à partir d'extraits cellulaires de cellules HeLa traitées par le TNF $\alpha$  [8-10]. IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  (pour I $\kappa$ B kinases a et b) sont les premières kinases capables de phosphoryler directement I $\kappa$ B-a *in vivo* et *in vitro* sur les sérines régulatrices.

La kinase IKK $\alpha$  a été aussi isolée par la technique du double hybride, avec NIK comme appât [11], et IKK $\beta$  par analyse des banques de données à la recherche d'un homologue de IKK $\alpha$  [12]. IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  possèdent un domaine kinase dans leur partie amino-terminale suivi d'une glissière de leucines (*leucine zipper*, LZ) et d'un domaine hélice-boucle-hélice (HLH) impliqués dans les interactions protéine/protéine. Ces deux kinases sont capables de former des homo- ou hétérodimères par l'intermédiaire de leur séquence LZ (figure 1A).

IKK $\alpha$  et b possèdent une boucle d'activation de type MAPkinase kinase (motif SxxxS) et sont activées à la suite de la phosphorylation de cette boucle par NIK qui est une kinase de type MAP3K (*mitogen activated protein kinase kinase kinase*).

Elles sont également activées par MEKK1, une MAP3K de la voie de transmission intracellulaire des signaux de stress, aboutissant à la phosphorylation du facteur de transcription c-Jun [13]. MEKK1 est une cible de la protéine transactivatrice Tax du virus HTLV-1. Tax stimule MEKK1, entraînant une activation constitutive du complexe IKK et par conséquent de NF- $\kappa$ B [14].



**Figure 1. Le « signalsome ».** **A.** Structure protéique schématique de ses différents composants. Il faut noter que deux de ses constituants ne sont pas des kinases, NEMO et IKAP. K: domaine kinase, SxxxS: sites de phosphorylation de la boucle d'activation de type MAP kinase kinase, LZ leucine zipper, HLH hélice-boucle-hélice. **B.** Interactions fonctionnelles entre les différents composants du signalsome. Les flèches rouges indiquent une phosphorylation optimale. Les flèches en pointillés dénotent une phosphorylation suboptimale.

Ces différentes kinases font partie d'un complexe de haut poids moléculaire (700 à 900 kDa) appelé aussi « signalsome » [9]. Deux nouveaux composants de ce complexe ont été identifiés récemment. Une approche génétique par complémentation de cellules déficientes pour l'activation

de NF- $\kappa$ B a permis l'identification de NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*) (*m/s 1998, n° 11, p. 1281*) [15]. Cette protéine a été aussi purifiée et séquencée à partir du signalsome et appelée IKK $\gamma$  [16].

Contrairement à ce que suggère cette dernière dénomination ambiguë,

NEMO n'est pas une kinase mais plutôt un composant structural essentiel, son absence empêchant la formation du complexe IKK. NEMO/IKK $\gamma$  possède une séquence LZ potentielle, d'autres motifs d'interaction de type *coiled-coil*, et s'associe préférentiellement à IKK $\beta$ . Puis a été identifiée IKAP (*IKK-complex associated protein*), une protéine qui lie NIK, IKK $\alpha$  et  $\beta$  et les assemble dans un complexe actif (*figure 1B*) [17].

### Spécificité des signaux

Chaque niveau de la voie d'activation de NF- $\kappa$ B fait intervenir des familles de protéines: adaptateurs de type TRAF, NIK et MEKK1, IKK $\alpha$  et  $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\epsilon$  et, enfin, différents dimères NF- $\kappa$ B, offrant des possibilités de combinaisons très importantes. Ces protéines ne sont pas équivalentes: NIK phosphoryle préférentiellement IKK $\alpha$  alors que MEKK1 « préfère » IKK $\beta$  [18]. En aval, IKK phosphoryle les deux sérines d'I $\kappa$ B- $\alpha$  mais une seule sérine sur I $\kappa$ B- $\beta$  [12]. La phosphorylation d'I $\kappa$ B $\epsilon$  par les IKK est moins efficace et requiert la co-expression de NIK [19].

Enfin, les inhibiteurs I $\kappa$ B s'associent à des dimères NF- $\kappa$ B différents qui, eux-mêmes, ont une sélectivité de fixation et d'affinité pour les nombreux sites  $\kappa$ B existant au niveau des promoteurs. La combinaison de ces différences détermine, sans aucun doute, la spécificité de la transcription dépendante de NF- $\kappa$ B. Les protéines d'assemblage ou d'échafaudage (*scaffold*) pourraient être des déterminants importants de la spécificité des signaux.

Les composants de la voie des MAPK et, ceux de la voie des IKK, sont activés par des stimulus très variés. La mise en jeu de complexes multimoléculaires différents dont la composition est dictée par des protéines d'échafaudage, permettrait d'orienter et de moduler les réponses physiologiques [20].

### Thérapie et NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B est un élément central de l'établissement de la réponse immune. Cependant, son activation contribue à amplifier et à perpétuer

les réactions d'inflammation, par la production de chimiokines, cytokines ou molécules d'adhérence [21].

Les différentes kinases et les protéines d'assemblage récemment identifiées dans la voie de transmission du signal NF- $\kappa$ B sont donc des cibles particulièrement intéressantes pour un traitement pharmacologique des maladies chroniques de l'inflammation. Des données nouvelles sur le mode d'action de l'aspirine offrent des perspectives encourageantes. Si l'aspirine agit, à faible dose, sur les cyclooxygénases pour bloquer la production des médiateurs de la douleur et de la fièvre que sont les prostaglandines, il vient d'être montré qu'à forte dose (IC<sub>50</sub> = 50 m M), l'aspirine bloque l'activation de IKK $\beta$  [22], expliquant son effet inhibiteur déjà observé sur NF- $\kappa$ B [23].

Ces fortes doses d'aspirine sont connues et utilisées pour apporter un soulagement durable des douleurs de l'arthrite rhumatoïde, mais produisent aussi des effets secondaires comme maux de tête et vertiges. L'identification d'IKK $\beta$  comme une des cibles moléculaires de l'aspirine permet d'envisager la synthèse de composés inhibiteurs, sur la base de la structure de l'aspirine, plus efficaces et plus sélectifs, permettant d'éviter les effets secondaires [24].

De tels composés seront sans doute utilisés pour le traitement de maladies faisant intervenir NF- $\kappa$ B, notamment les maladies neurodégénératives. Ainsi, au cours de la maladie d'Alzheimer, NF- $\kappa$ B est activé par les peptides amyloïdes  $\beta$ , dans les neurones entourant les plaques séniles [25]. Comme l'aspirine est décrite pour induire une protection des neurones vis-à-vis des effets toxiques du glutamate [26], des inhibiteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B pourraient donc être associés à des traitements conventionnels pour limiter la dégénérescence neuronale. Les thérapeutiques anticancéreuses pourraient également bénéficier de tels inhibiteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B. En effet, il a été démontré dans de nombreux systèmes, que NF- $\kappa$ B empêche la mort cellulaire ou apoptose par l'expression de gènes de survie [27, 28].

Or, la plupart des molécules utilisées en chimiothérapie, ainsi que

l'irradiation aux rayons  $\gamma$ , entraînent une activation de NF- $\kappa$ B, ce qui diminue leur efficacité thérapeutique. L'expression d'un oncoprotéine négative de I $\kappa$ B, qui empêche l'activation de NF- $\kappa$ B, permet d'augmenter la sensibilité des lignées cancéreuses à la daunorubicine et aux rayonnements  $\gamma$  [29].

Ces résultats suggèrent qu'un bénéfice important peut être espéré dans le traitement de certains cancers, en associant un blocage de NF- $\kappa$ B à une chimiothérapie conventionnelle. Ces quelques exemples montrent que des molécules capables d'agir sélectivement sur les différentes kinases impliquées dans l'activation de NF- $\kappa$ B promettent d'avoir des vertus thérapeutiques considérables. Nul doute que l'industrie pharmaceutique se trouve déjà sur la piste de tels composés.

**J.F.P.  
A.L.**

1. Bours V, Dejardin E, Bonizzi G, Merville M, Piette J. Le facteur transcriptionnel NF- $\kappa$ B: rôle au cours de l'oncogénèse et de la réponse au traitement anticancéreux. *Med Sci* 1998; 14: 566-71.
2. Costello R, Lecine P, Kahn-Perlès B, et al. Activation du système de facteurs de transcription Rel/NF- $\kappa$ B. *Med Sci* 1995; 11: 957-65.
3. Israël A. Les protéines Rel/NF- $\kappa$ B et I $\kappa$ B: nouvelles données sur la structure, la fonction et la régulation. *Med Sci* 1995; 11: 1017-20.
4. Yaron A, Hatzubai A, Davis M, et al. Identification of the receptor component of the I $\kappa$ B-ubiquitin ligase. *Nature* 1998; 396: 590-4.
5. Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, et al. Tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B-a activates NF- $\kappa$ B without proteolytic degradation of I $\kappa$ B-a. *Cell* 1996; 86: 787-98.
6. Zwacka R, Zhang Y, Zhou W, Halldorson J, Engelhardt J. Ischemia/reperfusion injury in the liver of Balb/c mice activates AP-1 and nuclear factor  $\kappa$ B independently of I $\kappa$ B degradation. *Hepatology* 1998; 28: 1022-30.
7. Malinin N, Boldin M, Kovalenko A, Wallach D. MAP3K-related kinase involved in NF- $\kappa$ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 1998; 385: 540-4.
8. DiDonato J, Hayakawa M, Rothwarf D, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 1998; 388: 548-54.
9. Mercurio F, Zhu H, Murray B, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinases essential for NF- $\kappa$ B activation. *Science* 1997; 278: 860-6.

10. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 1997; 91: 243-52.
11. Régnier C, Song H, Gao X, Goeddel D, Cao Z, Rothe M. Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase. *Cell* 1997; 90: 373-83.
12. Woronicz J, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel D. I $\kappa$ B Kinase- $\beta$ : NF- $\kappa$ B activation and complex formation with I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  and NIK. *Science* 1997; 278: 866-9.
13. Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, Maniatis T. Activation of the I $\kappa$ B $\alpha$  kinase complex by MEKK1 a kinase of the JNK pathway. *Cell* 1997; 88: 213-22.
14. Yin M, Christerson L, Yamamoto Y, et al. HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate I $\kappa$ B Kinase activity and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 1998; 93: 875-84.
15. Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, et al. Complementation cloning of NEMO a component of the I $\kappa$ B kinase complex essential for NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 1998; 93: 1231-40.
16. Rothwarf D, Zandi E, Natoli G, Karin M. IKK- $\gamma$  is an essential regulatory subunit of the I $\kappa$ B kinase complex. *Nature* 1998; 395: 297-300.
17. Cohen L, Henzel W, Baeuerle P. IKAP is a scaffold protein of the I $\kappa$ B kinase complex. *Nature* 1998; 395: 292-6.
18. Ling L, Cao Z, Goeddel D. NF- $\kappa$ B-inducing kinase activates IKK $\alpha$  by phosphorylation of ser-176. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3792-7.
19. Nakano H, Shindo M, Sakon S, et al. Differential regulation of I $\kappa$ B kinase a and b by two upstream kinases, NF- $\kappa$ B-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/erk kinase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3537-42.
20. Whitmarsh A, Davis R. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 481-5.
21. Barnes P, Karin M. Nuclear factor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-71.
22. Yin M, Yamamoto Y, Gaynor R. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I $\kappa$ B kinase- $\beta$ . *Nature* 1998; 396: 77-80.
23. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF- $\kappa$ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; 265: 956-9.
24. O'Neill E. A new target for aspirin. *Nature* 1998; 396: 15-6.
25. Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle P, Kaltschmidt C. Transcription factor NF- $\kappa$ B is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2642-7.
26. Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- $\kappa$ B activation. *Science* 1996; 274: 1383-5.
27. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science* 1996; 274: 787-9.
28. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death. *Science* 1996; 274: 782-4.
29. Wang CY, Mayo MW, Baldwin Jr AS. TNF- $\alpha$  and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- $\kappa$ B. *Science* 1996; 274: 784-7.