

Le gène VHL (von Hippel-Lindau) : un nouveau complexe ubiquitine ligase ?

Lors de la découverte du gène *VHL* impliqué dans la maladie de von Hippel-Lindau [1], on se doutait bien que la compréhension du mécanisme de son fonctionnement apporterait de précieux renseignements sur l'homéostasie cellulaire et la régulation de l'hypoxie.

En effet, un des principaux caractères cliniques de cette phacomatose, transmise en dominance, est une prédisposition à développer toutes sortes de tumeurs : hémangioblastomes de la rétine et du cervelet ; tumeurs du rein (toutes les formes de cancers, mais surtout le carcinome à cellules claires ou RCC) ; tumeurs des surrénales (la maladie de von Hippel-Lindau avec phéochromocytome étant dite de type 2) ; kystes du foie, du pancréas et de l'épididyme.

Comme les hémangioblastomes se développent à partir de tissu vasculaire, et que, par ailleurs, le gène *VHL* limite la production de facteurs induits par l'hypoxie (comme le VEGF ou *vascular endothelial growth factor* et le transporteur de glucose 1 ou GLUT-1), on pouvait se demander si certaines mutations de ce gène *VHL*, dont de nombreuses preuves attestent qu'il est un gène suppresseur de tumeurs, n'avaient pas pour conséquence une libération de transcrits induits par l'hypoxie.

Le complexe VBC

Il apparut d'abord que la protéine VHL (pVHL) participe, avec les élongines C et B, au complexe d'élongation et intervient comme régulateur négatif sur l'élongine A, la sous-unité active qui facilite l'élongation de la transcription quand l'ARN polymérase rencontre des régions de gènes

entraînant des pauses transitoires (*m/s* 1995, n° 11, p. 1603). Puis, il fut démontré que ce complexe ternaire que l'on appelle désormais VCB (von Hippel-Lindau-élongines B et C) était lié à la Culline2 (par l'élongine C). En outre, le complexe élongine C-élongine B se lie aux protéines dénommées SOCS (*suppressor of cytokine signalling*) qui inhibent la transmission du signal des cytokines par la voie JAK-STAT [2] d'une part, et à l'élongine A d'autre part.

Analogies avec les complexes SCF

Alors que la pVHL ne ressemble à aucune protéine connue, les autres éléments du complexe ont des homologues avec les complexes multiprotéiques SCF (*Skp1-Cdc53-F-box protein*) [3]. Ceux-ci, très conservés au cours de l'évolution, ont été bien étudiés chez *Saccharomyces cerevisiae* où ils sont impliqués dans de nombreuses voies protéolytiques dépendantes de la phosphorylation. Ainsi, SCF^{F^{cdc4}} détruit l'inhibiteur Sic1, ce qui permet le passage de G1 à S au cours du cycle cellulaire. Or, l'élongine C a des séquences homologues à la protéine SCF Skp1, l'élongine B à l'ubiquitine et Cul2 à la protéine Cul1 du complexe SCF. De plus, en analysant la structure du complexe ternaire VCB, une équipe américaine a montré que pVHL a une structure bipartite avec un domaine à hélices α et un domaine à feuillet β . L'élongine C est liée à VHL et à l'élongine B par deux interfaces distinctes. C'est par le domaine α , qui a une structure homologue à une boîte SOCS, que l'élongine C se lie à pVHL. Les résidus qui contribuent à la stabilité de l'interface élongine C-domaine α de pVHL sont

également conservés dans les boîtes F et SOCS [3, 4]. Une telle ressemblance avec le complexe SCF, qui intervient dans la dégradation des protéines, pouvait faire envisager une fonction analogue pour VHL. La découverte d'une nouvelle protéine par le groupe de Conaway a sérieusement conforté cette hypothèse [5]. En purifiant le complexe endogène VHL de foie de rat, il a en effet isolé un autre composant, de 16 kDa, faisant partie du complexe VCB, et préalablement connu sous le nom de *RING-H2 finger like protein*. Il interagit avec les cullines et s'appelle désormais Rbx1 (*RING box protein*). Ainsi s'individualise une nouvelle sous-classe parmi les protéines contenant des motifs RING, petits domaines se liant aux métaux et très fréquents dans les sous-unités des complexes multiprotéiques. Rbx1 possède des homologues chez la drosophile, *C. elegans* et, chez *S. cerevisiae*, il correspond à la sous-unité APC11 du complexe APC promouvant l'anaphase (*anaphase promoting complex*). En produisant des levures déficientes en Rbx1, le même groupe vient de démontrer que cette protéine est un composant et un puissant activateur de l'ubiquitine protéine ligase nécessaire à l'ubiquitinylation de l'inhibiteur Sic1 de CDK (*cyclin dependent kinase*) et au passage de la phase G1 en phase S. En parallèle, il a pu aussi reconstituer *in vitro* l'ubiquitinylation de la cycline Cln1 (intervenant dans la phase G1 du cycle cellulaire) par un complexe SCF dans lequel Rbx1 favorise l'association de Cdc34 avec Cdc53 et stimule l'auto-ubiquitinylation de Cdc34 [6]. Il semble donc que, dans le cycle de l'ubiquitine, une nouvelle famille de ligases E3 se précise.

Dégradation des protéines par ubiquitinylation

On sait que la dégradation des protéines par ubiquitinylation passe par trois phases impliquant trois activités enzymatiques, E1, E2, E3 [2]. Les ligases E3 sont spécifiques de substrats [7] : la famille SCF en est un exemple avec ses sous-unités adaptatrices, les protéines à boîte F qui reconnaissent différents substrats par des domaines d'interaction spécifiques (*figure 1*) (*m/s 1999, n° 8/9, p. 1008 de ce numéro*). L'APC, autre ligase E3, utilise différents motifs pour reconnaître certains substrats, dont les cyclines et d'autres protéines réglant la mitose. Bien qu'il n'ait pas encore été démontré que le complexe VCB soit une ligase E3, l'ensemble de sa structure autorise à le supposer. Dans ce cas, il

devenait fort intéressant de trouver quels en étaient les substrats.

HIF-1, une cible de la protéine VHL

L'un d'eux vient d'être découvert qui permet de comprendre le caractère vasculaire des tumeurs de la maladie de von Hippel-Lindau [8]. On sait qu'un certain nombre de gènes (comme *VEGF*, *GLUT-1*, *AK-3*, *ALD-A*, *PGK-L* et *LDH-A*) codant pour des molécules contrôlant l'angiogenèse, le transport du glucose et la glycolyse sont réglés par l'hypoxie. Plusieurs équipes ont montré que, dans les cultures de cellules dépourvues de pVHL, les facteurs codés par ces gènes sont augmentés, même en l'absence de stimulus hypoxique [9]. Ces facteurs possèdent des HRE (éléments de réponse à l'hypoxie) qui se

fixent sur HIF-1. Dans des conditions normales d'oxygénation, ce facteur de transcription (*hypoxia inducible factor 1*), spécifique de la réponse à l'hypoxie (*m/s 1997, n° 13, p. 891*), est rapidement dégradé dans le protéasome, dégradation qui implique un domaine ODD (*oxygen degradation dependent*) [10]. Or, une équipe anglaise vient de démontrer que les deux sous-unités HIF-1 α et une molécule proche, HIF-2 α , se lie à la pVHL [8]. Celle-ci joue un rôle essentiel dans la régulation de HIF-1. Dans les cellules dépourvues de pVHL, les sous-unités HIF- α sont stabilisées et HIF-1 est activé en permanence. La réintroduction de pVHL restaure la dégradation des sous-unités α de HIF dans les conditions d'oxygénation normales (*figure 2*). De plus, ces chercheurs ont montré que pVHL co-précipite avec les sous-unités α de HIF-1 et que cette même protéine est présente dans le complexe de liaison ADN-HIF-1. On savait que les chélateurs ferriques comme DFO (desferrioxamine) et les ions cobalt entraînent l'activation de HIF-1. Le DFO, ajouté avant l'hypoxie, empêche la formation du complexe pVHL/HIF-1. Cette implication du fer dans la formation du complexe suggère qu'une protéine contenant du fer doit aussi être impliquée dans le processus de destruction de HIF-1 en présence d'oxygène qui requiert probablement une protéine VHL intacte.

Conclusions

Ainsi s'expliquent la formation des hémangiomes et le rôle de pVHL entre tumorigenèse et dégradation protéique. Mais de nombreuses questions subsistent. pVHL se lie-t-elle à HIF-1 de façon directe ou indirecte ? Les deux groupes distincts de mutations qui séparent la maladie de von Hippel-Lindau de type 1 de celle de type 2 (avec phéochromocytome) (*m/s 1996, n° 6, p. 817*) – qui correspondent aux régions α et β de la protéine VHL – permettront-ils de distinguer des fonctions différentes de pVHL ? Puisqu'elle semble impliquée dans la formation de la matrice extracellulaire, la régulation du pH extracellulaire et le contrôle du cycle cel-

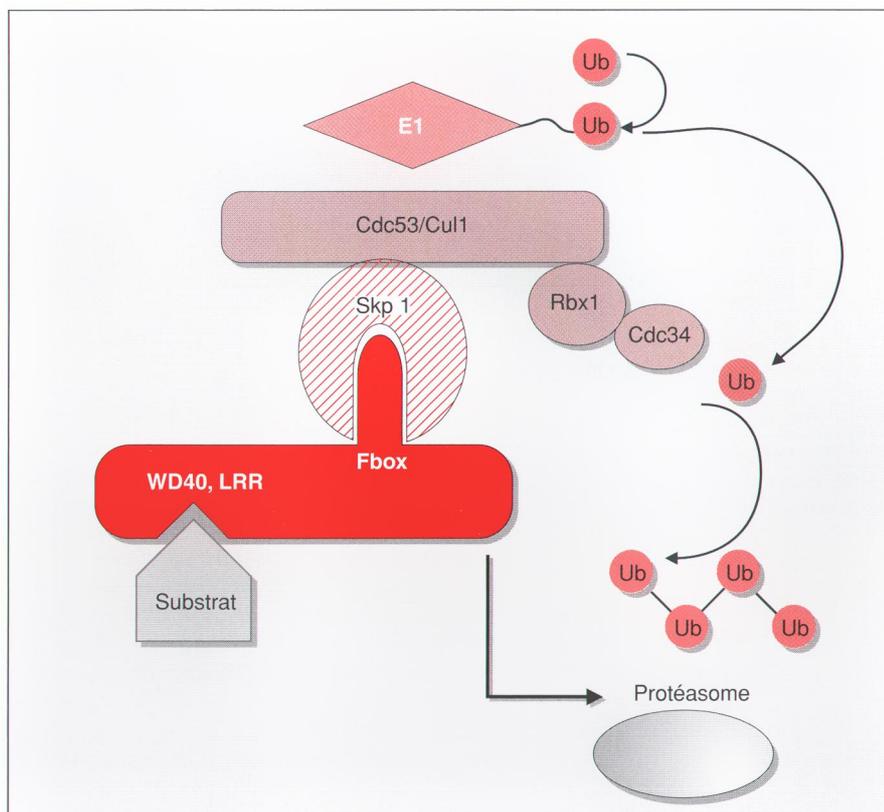


Figure 1. Le complexe SCF intervient comme ubiquitine ligase E3 dans l'étape finale de dégradation des protéines par ubiquitinylation. Il interagit avec un ensemble de protéines qui recrutent différents substrats par des domaines d'interaction protéine-protéine comme les répétitions WD40 ou LRR (riches en leucines). Étant donné la ressemblance architecturale du complexe VHL en raison de la découverte de Rbx, une fonction ligase E3 pourrait lui être attribuée. (D'après [10].) (Voir aussi p. 1008 de ce numéro.)

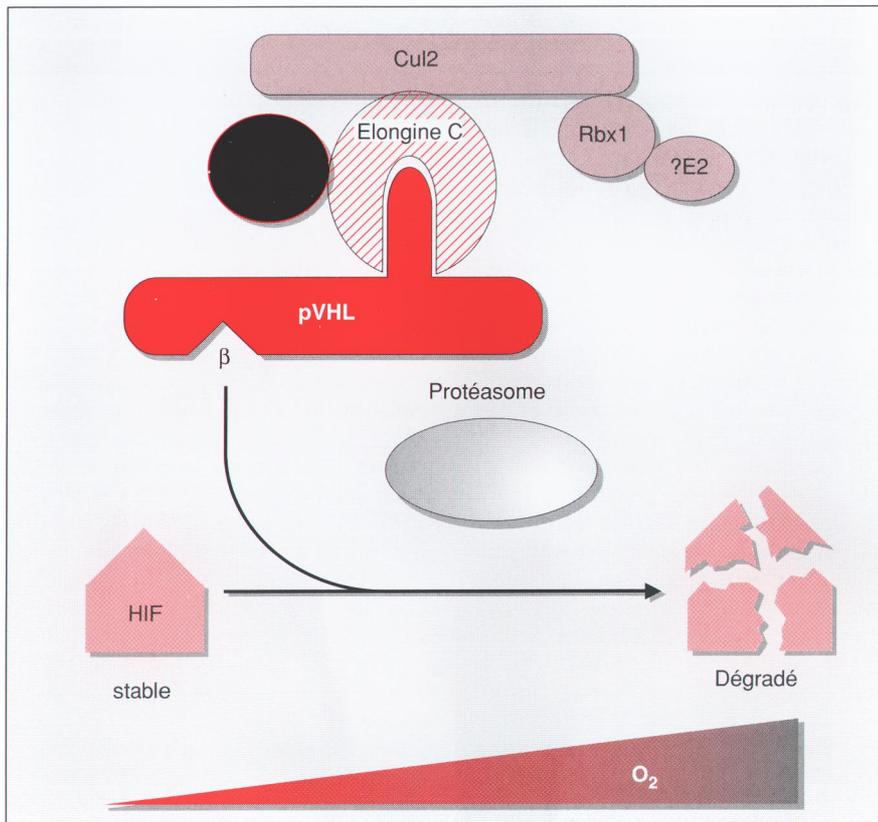


Figure 2. **Mécanisme d'action de la protéine VHL qui dégrade les sous-unités α du facteur HIF sous la dépendance de l'oxygène.** Dans la maladie de von Hippel-Lindau, l'absence de liaison pVHL-HIF explique la persistance du facteur HIF (d'où la formation de tumeurs angiogéniques, même en présence de quantité normale d'oxygène). E2, enzyme encore inconnue. (D'après [11].)

lulaire, a-t-elle d'autres protéines cibles que HIF-1? Même s'il reste encore quelques points à élucider, et notamment celui du rôle direct de la protéine VHL dans le processus tumoral initial, l'on se prend déjà à espérer de nouveaux moyens de traitement des cancers par le contrôle de l'angiogenèse (*m/s* 1999, n° 6/7, p. 892), si importante dans le développement de toutes les tumeurs.

1. Richard S, Olschwang S, Chauveau D, Resche F. La maladie de von Hippel-Lindau. *Med Sci* 1995 ; 11 : 43-51.
2. Starr R, Willson TA, Viney EM, *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997 ; 387 : 917-21.
3. Margottin F, Kroll M, Concordet JP, *et al.* Phosphorylation et adressage au protéasome : la « F-Box Connexion » ou comment la β -TrCP contrôle la dégradation de I κ b α , de la β -caténine, et dans

les cellules infectées par le HIV-1, de CD4. *Med Sci* 1999 ; 8/9 : 1008-14.

4. Stebbins CE, Kaelin WG, Pavlevitch NP. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex : implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 1999 ; 284 : 455-8.

5. Kamura T, Koepp DM, Conrad MN, *et al.* Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 1999 ; 284 : 657-61.

6. Skowyra D, Koepp DM, Kamura T, *et al.* Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCF Grr1 and Rbx1. *Science* 1999 ; 284 : 662-5.

7. Carillo S, Pariat M, Jariel-Encontre I, Steff A, Piechaczyk M. Le catabolisme protéique intracellulaire : une fonction biologique majeure. Partie I : les mécanismes de dégradation. *Med Sci* 1995 ; 11 : 723-34.

8. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999 ; 399 : 271-5.

9. Kaelin WG, Maher ER. The VHL tumour-suppressor gene paradigm. *Trends Genet* 1998 ; 14 : 423-6.

10. Huang IE, GU J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an oxygen dependant domain *via* the ubiquitin proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 7987-92.

11. Tyers M, Willems AR. One ring to rule a superfamily of ubiquitin E3 ligases. *Science* 1999 ; 284 : 601-4.

12. Kaelin WG. Many vessels, faulty genes. *Nature* 1999 ; 399 : 203-4.

Simone Gilgenkrantz

9, rue Basse, 54330 Clerey-sur-Brenon, France.