

## **L**es protéines Rel/NF- $\kappa$ B et I $\kappa$ B : nouvelles données sur la structure, la fonction et la régulation

Une série d'articles récents apporte des lumières nouvelles sur la structure, les mécanismes de régulation et la fonction des protéines de la famille Rel/NF- $\kappa$ B.

Cette famille de facteurs de transcription est impliquée dans le contrôle de l'expression de nombreux gènes au cours de la réponse immunitaire ou inflammatoire, ainsi que de virus comme le VIH (pour une revue récente, voir [1]). On connaît actuellement cinq membres de la famille Rel/NF- $\kappa$ B qui, presque tous, peuvent former des homo- ou des hétérodimères capables de lier une séquence d'ADN du type GGGRN-NYYCC\* : p50, p52, p65 (renommé récemment RelA), le produit du proto-oncogène *c-rel*, et RelB. Cette dernière molécule ne peut former des hétérodimères qu'avec p50 ou p52. Toutes ces molécules présentent en position N-terminale un domaine d'homologie d'environ 300 acides aminés (DHR : domaine d'homologie Rel), contenant les régions impliquées dans la dimérisation et dans la liaison à l'ADN, ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire. Les complexes transactivateurs rencontrés le plus souvent sont p50/p65 (qui correspond à l'activité NF- $\kappa$ B décrite initialement) et p50/ c-Rel. Les sous-unités p50 et p52 sont synthétisées sous forme de précurseurs cytoplasmiques, p105 et p100. Par ailleurs, p50 et p52 présentent des activités

transcriptionnelles très faibles, alors que les trois autres membres de la famille contiennent dans leur région C-terminale un domaine d'activation transcriptionnel fort.

Les complexes NF- $\kappa$ B sont normalement retenus dans le cytoplasme par interaction avec une molécule de la famille I $\kappa$ B [2] : les gènes codant pour deux molécules de cette famille ont été clonés, I $\kappa$ B $\alpha$  [3] et I $\kappa$ B $\beta$  [4], le second très récemment. Ces molécules sont essentiellement formées de 5-6 répétitions d'un motif d'une trentaine d'acides aminés appelé répétition ankyrine, suivies dans la partie C-terminale de séquences de type PEST, considérées en général comme des déterminants de dégradation [5]. Les molécules I $\kappa$ B agissent en empêchant l'accès aux séquences de localisation nucléaire des protéines Rel/NF- $\kappa$ B. A la suite de divers signaux (TNF [*tumor necrosis factor*], esters de phorbol, lipopolysaccharides, interleukine 1...) les molécules I $\kappa$ B sont phosphorylées puis dégradées et les complexes NF- $\kappa$ B sont alors transportés dans le noyau où ils peuvent se fixer sur les séquences régulatrices de leurs gènes-cibles. Seules les cellules B et certaines cellules de la lignée monocyte/macrophage présentent une activité NF- $\kappa$ B constitutivement nucléaire. Il a été montré récemment que les précurseurs p105 et p100, qui contiennent aussi des répétitions ankyrine dans leur région C-terminale, peuvent se comporter comme des molécules de type I $\kappa$ B et sont capables de retenir dans le cytoplasme d'autres membres de la famille comme p50, p52, c-Rel ou p65.

Au cours de ces derniers mois sont

parus plusieurs articles très importants : d'une part, la structure cristalline d'un homodimère p50 lié à l'ADN a été résolue ; d'autre part, la construction de souris dont les gènes *p50* et *relB* ont été invalidés a permis de mieux appréhender la fonction réelle de ces deux sous-unités ; finalement, une série de publications a permis de mieux comprendre le mécanisme de dégradation de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ .

### **L'homodimère p50 : lointain parent des immunoglobulines ?**

La séquence des DHR des protéines de la famille Rel/NF- $\kappa$ B ne montre pas d'homologie évidente avec les domaines de liaison à l'ADN et de dimérisation connus à l'heure actuelle (glissière à leucines, motif hélice-tour-hélice ou hélice-boucle-hélice, boîte homéo...). La résolution de la structure cristalline d'un homodimère p50 lié à son site a confirmé cette impression, et a révélé un nouveau mode de liaison à l'ADN, qui permet de comprendre l'affinité extrêmement élevée des complexes pour l'ADN ( $K_d = 10^{-12}$  M) [6, 7]. Au lieu de lier l'ADN à l'aide d'une série de petites hélices  $\alpha$ , les deux molécules p50 contactent l'ADN par l'intermédiaire de boucles, qui entourent complètement l'ADN et donnent au complexe l'apparence d'un papillon ; de manière inattendue, cette structure ressemble aux molécules d'immunoglobulines, bien que la signification évolutive de cette similitude soit peu claire à l'heure actuelle. On savait par des expériences de délétion que la partie C-terminale du

Voir aussi l'article de synthèse de R. Costello et al., page 957 de ce numéro.

\* Où N est n'importe quel nucléotide et Y un nucléotide à base pyrimidique.

DHR était spécifiquement impliquée dans la dimérisation [8], mais c'est en fait l'ensemble du DHR qui établit des contacts avec l'ADN: à peu près 38 contacts sont ainsi établis sur l'ensemble de la double hélice correspondant au site de fixation, laissant libre seulement le petit sillon. L'établissement de cette structure devrait permettre de comprendre, d'une part, comment divers types d'homo- ou hétérodimères de membres de la famille Rel/NF- $\kappa$ B reconnaissent différentes séquences cibles avec des affinités différentes et, par ailleurs, comment les inhibiteurs I $\kappa$ B interagissent avec les molécules Rel/NF- $\kappa$ B et, en particulier, comment ils peuvent dissocier des complexes NF- $\kappa$ B déjà liés à l'ADN. De manière peut-être plus importante, ces données devraient permettre de mettre au point des réactifs capables de bloquer la dimérisation ou la liaison à l'ADN de ces protéines et donc, éventuellement, de contrôler la réponse inflammatoire ou d'interférer avec la réplication de virus comme le VIH.

### Inactivation des gènes codant pour p50 et RelB: quelques idées reçues s'écroulent

L'inactivation récente par recombinaison homologue des gènes codant pour les protéines p50 et RelB a éclairé d'un jour nouveau le rôle de ces molécules dans le développement et le fonctionnement du système immunitaire.

L'inactivation du gène *p50* [9] n'empêche pas les souris d'atteindre l'âge adulte en bonne santé apparente. Les souris *p50*<sup>-/-</sup> possèdent une quantité normale de cellules B qui synthétisent des quantités normales de chaîne  $\kappa$  d'immunoglobulines. Néanmoins, ces cellules présentent des défauts d'activation et de production d'anticorps spécifiques; par exemple, les lipopolysaccharides (LPS) n'induisent pas d'activité NF- $\kappa$ B ni de différenciation des cellules B, contrairement à un traitement par des anticorps anti-immunoglobulines M, ce qui indique que ces deux *stimuli* utilisent des voies de signalisation différentes. De plus, l'absence

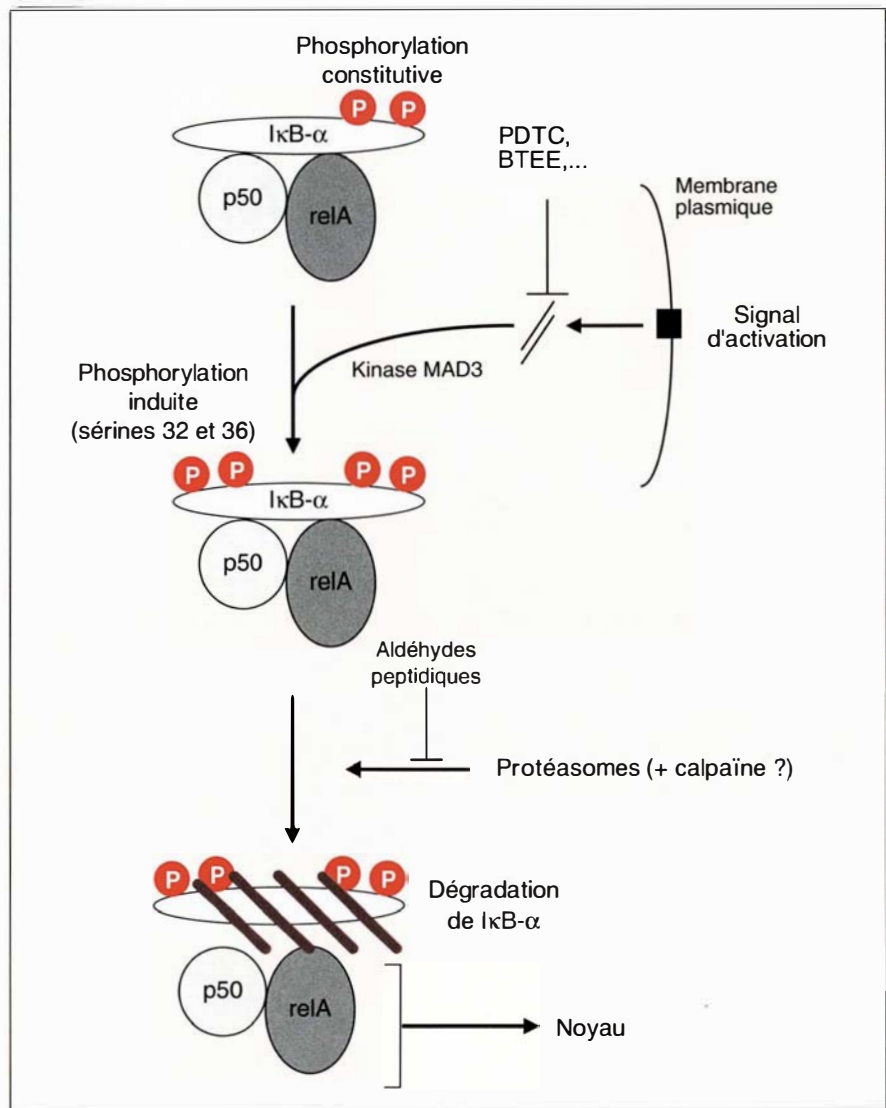


Figure 1. **Un modèle d'activation de NF- $\kappa$ B par la voie I $\kappa$ B $\alpha$ .** Les complexes p50/RelA sont retenus dans le cytoplasme par I $\kappa$ B $\alpha$ . Suite à un signal extracellulaire, la molécule I $\kappa$ B $\alpha$  est phosphorylée sur les sérines 32 et 36, mais reste associée à NF- $\kappa$ B (une phosphorylation constitutive dans la région C-terminale est indiquée). Cette phosphorylation fait de I $\kappa$ B $\alpha$  une cible pour les protéases responsables de sa dégradation, ce qui permet la libération et le transport nucléaire des complexes NF- $\kappa$ B. Les inhibiteurs de calpaïne et de protéasomes du type aldéhydes peptidiques bloquent cette dégradation mais pas la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$ , alors que certains inhibiteurs de sérines protéases comme le BTEE (N-benzoyl-L-tyrosine éthyl ester) et les antioxydants comme le PDTC (pyrrolidinedithiocarbamate) agissent en amont de l'étape de phosphorylation. Les mécanismes de rétention par les précurseurs p105 et p100, ou par l'inhibiteur I $\kappa$ B $\beta$ , n'ont pas été représentés pour des raisons de simplicité. De même, la phosphorylation des membres de la famille NF- $\kappa$ B (p50, relA...) induite par un signal extracellulaire n'a pas été évoquée car le rôle de ces modifications n'est pas compris à l'heure actuelle.

de p50 induit une sensibilité nettement plus importante à certaines infections bactériennes, mais paradoxalement une résistance accrue à certaines infections virales, probablement liée à une synthèse augmentée d'interféron  $\beta$ . Cette synthèse accrue peut s'expliquer par l'absence d'homodimères p50 qui semblent être normalement responsables de l'inhibition du niveau de base d'expression de ce gène, et par le remplacement des hétérodimères p50/p65 manquants par des complexes du type c-Rel/p65.

L'inactivation du gène *relB* n'a pas non plus d'effet sur le développement embryonnaire des souris manipulées [10]. La protéine RelB est spécifiquement exprimée dans les tissus lymphoïdes, et diverses données récentes suggèrent que les hétérodimères contenant RelB sont responsables de l'activité NF- $\kappa$ B constitutive présente dans la rate et le thymus: la raison de cet état constitutif semble être l'affinité très faible de ces complexes pour l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ . En accord avec ces données, on observe effectivement un phénotype qui se manifeste après le dixième jour par une pathologie complexe: d'une part, l'activité NF- $\kappa$ B constitutive extrêmement réduite dans le thymus et la rate semble aboutir, entre autres défauts, à une réduction importante de la population des cellules dendritiques thymiques et, d'autre part, divers organes dont les poumons et le foie sont le siège d'une infiltration inflammatoire importante. En outre, ces animaux présentent une immunité cellulaire très réduite. Ces résultats indiquent que *relB* joue un rôle fondamental dans le système hématopoïétique, et que son absence ne peut être compensée par les autres membres de la famille.

On constate donc avec ces deux exemples que les molécules p50 et RelB jouent des rôles totalement différents: la molécule p50, essentiellement sous la forme d'hétérodimères p50/p65, appartient à des complexes rapidement inductibles au cours des réponses immunes et inflammatoires. Au contraire, l'activité constitutive représentée par RelB contrôle le développement et

l'homéostasie du système immunitaire après la naissance. Il est clair que dans l'avenir l'inactivation des gènes codant pour les autres membres de la famille et la construction de souris inactivées pour deux gènes ou plus apporteront des renseignements précieux.

### Contrôle de l'activité NF- $\kappa$ B : phosphorylation et dégradation

Des expériences de purification déjà relativement anciennes avaient démontré la présence de deux types de molécules I $\kappa$ B,  $\alpha$  et  $\beta$ . Le clonage de l'ADNc codant pour I $\kappa$ B $\alpha$  [3] et l'obtention d'anticorps spécifiques a permis de préciser le comportement de cette molécule à la suite des signaux capables d'activer NF- $\kappa$ B: on a ainsi pu montrer qu'à la suite de ces signaux la molécule I $\kappa$ B $\alpha$  était d'abord phosphorylée, puis dégradée, cette dégradation ayant lieu sans dissociation du complexe NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B. Cette disparition n'est que transitoire et on observe une réapparition rapide de l'inhibiteur, due en partie à la stimulation du promoteur du gène *I $\kappa$ B $\alpha$*  par les complexes NF- $\kappa$ B. Le clonage récent du gène codant pour la molécule I $\kappa$ B $\beta$  [4] a permis d'observer un comportement différent: cette molécule, bien qu'apparemment associée dans la cellule aux mêmes complexes NF- $\kappa$ B que I $\kappa$ B $\alpha$ , n'est dégradée qu'à la suite de signaux induisant une réponse persistante, comme les LPS ou l'interleukine 1, et reste absente tant que l'activité NF- $\kappa$ B est détectable dans le noyau, suggérant que le gène *I $\kappa$ B $\beta$*  n'est pas réglé positivement par NF- $\kappa$ B, contrairement à *I $\kappa$ B $\alpha$* . En revanche, les signaux du type PMA ou TNF (*tumor necrosis factor*) qui induisent une réponse NF- $\kappa$ B transitoire ne provoquent pas de dégradation de I $\kappa$ B $\beta$ .

Depuis deux ans, les mécanismes impliqués dans la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  ont été l'objet de nombreuses investigations; tout d'abord, on a pu bloquer la dégradation de cette molécule à l'aide d'inhibiteurs de protéases connus pour inhiber l'activité des protéasomes (et aussi, pour certains, de la calpaïne) [11-16]. Les

protéasomes sont des complexes multicatalytiques présents dans toutes les cellules eucaryotes et responsables de la dégradation de protéines anormales ou à demi-vie courte [5]. Ainsi, l'usage d'inhibiteurs du type aldéhyde peptidique comme ALLN (acétyl leucyl leucyl norleucinal) a permis d'observer l'accumulation d'une forme hyperphosphorylée de I $\kappa$ B $\alpha$  à la suite de divers signaux d'activation. Ces résultats ont mené à l'hypothèse selon laquelle la molécule I $\kappa$ B $\alpha$  serait dégradée par la voie ubiquitine-protéasomes. Cette hypothèse a été renforcée par une série de résultats portant sur la maturation du précurseur p105 de la protéine p50: cette maturation se traduit par la dégradation de la région C-terminale du précurseur et par la libération de la molécule p50 représentant sa partie N-terminale. Les résultats obtenus récemment indiquent que la molécule p105 est ubiquitinylée et que sa maturation est probablement due à l'action des protéasomes [5, 15]. On observe donc un parallèle entre les mécanismes de dégradation et de maturation de deux types de molécules possédant toutes deux une activité de type I $\kappa$ B, p105 et I $\kappa$ B $\alpha$ .

Une des questions qui vient immédiatement à l'esprit concerne le rôle de la phosphorylation dans la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$ . L'accumulation d'une forme hyperphosphorylée de I $\kappa$ B $\alpha$  à la suite des signaux d'activation n'implique pas nécessairement que la phosphorylation soit nécessaire à la dégradation. Des résultats récents obtenus par le groupe de Siebenlist [17] et par le nôtre montrent que l'activation de NF- $\kappa$ B par divers signaux (PMA, TNF, LPS) aboutit à la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  sur les sérines 32 et 36. La mutation d'une de ces sérines abolit la dégradation mais pas la phosphorylation sur l'autre sérine. De manière inattendue, la délétion de la région C-terminale de la molécule, riche en acides aminés de type PEST, abolit aussi la dégradation, mais pas la phosphorylation. On se trouve donc en présence de deux déterminants nécessaires à la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  et séparés par plus de 200 acides aminés correspondant aux répétitions

tions ankyrine : deux sites de phosphorylation en N-terminal et une région de type PEST en C-terminal. Il est intéressant de noter que dans la molécule I $\kappa$ B $\beta$  on trouve en N-terminal deux sérines dans un environnement très semblable à celui de I $\kappa$ B $\alpha$ , ainsi qu'une région de type PEST en C-terminal.

La question qui se pose maintenant est donc la suivante : quelles sont les kinases impliquées dans ces événements de phosphorylation, et quelles voies de signalisation sont responsables de l'activation de ces kinases (sachant qu'il peut, en fait, s'agir non pas de l'activation d'une ou de plusieurs kinases mais de l'inactivation d'une phosphatase, car les inhibiteurs de phosphatase comme l'acide okadaïque ou la calyculine A sont capables à eux seuls d'activer NF- $\kappa$ B) ? Par ailleurs, comment peut-on expliquer que des signaux aussi dissemblables que le PMA, le TNF ou le LPS convergent tous vers les deux mêmes sites de phosphorylation de la molécule I $\kappa$ B $\alpha$ . La question de l'identification de la (ou des) voie(s) d'activation de NF- $\kappa$ B qui se posait déjà lors de la découverte de l'inductibilité de cette activité en 1986 n'a malheureusement guère progressé depuis. On peut espérer que l'identification de ces deux sites de phosphorylation va enfin permettre d'avancer un peu dans cette voie. En effet, la compréhension des mécanismes menant à la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B devrait permettre de pouvoir éventuellement bloquer cette activation, et ainsi de contrôler certains aspects des réponses immunes et inflammatoires ■

## RÉFÉRENCES

1. Baeuerle PA, Henkel H. Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-79.
2. Beg AA, Baldwin AS. The I $\kappa$ B proteins - multifunctional regulators of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Genes Dev* 1993; 7: 2064-70.
3. Haskill S, Beg AA, Tompkins SM, Morris JS, Yurochko AD, Sampson JA, Mondal K, Ralph P, Baldwin AJ. Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I $\kappa$ B-like activity. *Cell* 1991; 65: 1281-9.
4. Thomson JE, Philips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. I $\kappa$ B- $\beta$  regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- $\kappa$ B. *Cell* 1995; 80: 573-82.
5. Carillo S, Pariat M, Jariel-Encontre I, Steff AM, Piechaczyk M. Le catabolisme protéique intracellulaire. Partie 1 : les mécanismes de dégradation. *médecine/sciences* 1995; 11: 723-34.
6. Ghosh G, Vanduyne G, Ghosh S, Sigler PB. Structure of NF- $\kappa$ B p50 homodimer bound to a  $\kappa$ B site. *Nature* 1995; 373: 303-10.
7. Muller CW, Rey FA, Sodeoka M, Verdine GL, Harrison SC. Structure of the NF- $\kappa$ B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 1995; 373: 311-7.
8. Logeat F, Israel N, Ten R, Blank V, Le BO, Kourilsky P, Israel A. Inhibition of transcription factors belonging to the rel/NF- $\kappa$ B family by a transdominant negative mutant. *EMBO J* 1991; 10: 1827-32.
9. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF- $\kappa$ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 1995; 80: 321-30.
10. Weih F, Carrasco D, Durham SK, Barton DS, Rizzo CA, Ryseck RP, Lira SA, Bravo R. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- $\kappa$ B/Rel family. *Cell* 1995; 80: 331-40.
11. Miyamoto S, Maki M, Schmitt MJ, Hatanaka M, Verma IM. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  is a signal for its degradation but not dissociation from NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12740-4.
12. Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Jung S, Avraham A, Gerlitz O, Pashutlavon I, Ben Neria Y. *In vivo* stimulation of I $\kappa$ B phosphorylation is not sufficient to activate NF- $\kappa$ B. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1294-301.
13. Didonato JA, Mercurio F, Karin M. Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  precedes but is not sufficient for its dissociation from NF- $\kappa$ B. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1302-11.
14. Lin YC, Brown K, Siebenlist U. Activation of NF- $\kappa$ B requires proteolysis of the inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ : signal-induced phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  alone does not release active NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 552-6.
15. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. *Cell* 1994; 78: 773-85.
16. Traenckner EBM, Wilk S, Baeuerle PA. A proteasome inhibitor prevents activation of NF- $\kappa$ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I $\kappa$ B- $\alpha$  that is still bound to NF- $\kappa$ B. *EMBO J* 1994; 13: 5433-41.
17. Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I $\kappa$ B $\alpha$  proteolysis by site-specific, signal induced phosphorylation. *Science* 1995; 267: 1485-8.

Alain Israël

Unité de biologie moléculaire de l'expression génique, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

TIRÉS À PART

A. Israël.