

Protéines Ras et transmission des signaux mitogènes

Les protéines Ras jouent un rôle central dans la transmission du signal qui, parti des facteurs de croissance et de leur interaction avec des récepteurs tyrosine kinases, aboutit à la stimulation de la transcription des gènes précoces. En s'autophosphorylant sur des tyrosines, le récepteur fournit un site d'interaction avec Gbr2, et, par son intermédiaire, un point d'ancrage aux protéines Sos. Celles-ci induisent l'échange GDP → GTP sur les protéines Ras, elles-mêmes liées à la membrane. Ras-GTP recrute à son tour Raf et permet son activation. Raf phosphoryle MEK qui phosphoryle ensuite les MAP-kinases. Après activation, ces MAP-kinases phosphorylent de nombreuses protéines et sont transloquées dans le noyau où elles activent des facteurs de transcription de la famille Ets qui contrôlent l'expression de *c-fos*. Ce schéma semble vérifié dans de nombreux tissus, mais on connaît encore mal le rôle précis des protéines GAP qui catalysent l'hydrolyse du GTP lié à Ras, la fonction de Ras dans les cellules qui ne se divisent pas, le rôle spécifique de chacune des trois protéines Ras, H-Ras, K-Ras et N-Ras.

Pierre Chardin

Les gènes *H-ras* et *K-ras* ont été découverts en tant qu'oncogènes, c'est-à-dire en tant que gènes d'origine cellulaire responsables du pouvoir transformant des rétrovirus dits de « Harvey » et de « Kirsten » qui induisent des sarcomes chez le rat et la souris. Ces deux gènes et un troisième fortement apparenté, *N-ras*, ont été redécouverts de façon indépendante par plusieurs équipes qui cherchaient à caractériser les altérations génétiques dans les tumeurs humaines. On trouve des gènes *RAS* mutés dans environ un tiers des tumeurs humaines, où l'allèle transformant ne diffère de l'allèle normal que par une seule mutation qui provoque la subs-

titution des acides aminés 12, 13 ou 61. Parallèlement, une équipe travaillant sur la protéine du virus de Harvey a montré que cette protéine pouvait s'autophosphoryler, non pas en utilisant l'ATP, comme c'est le cas le plus fréquent, mais le GTP. On s'est aperçu, par la suite, que cette autophosphorylation n'est qu'une réaction « parasite » de l'hydrolyse du GTP, limitée aux protéines Ras virales. Cependant, cette observation a permis de découvrir que les protéines Ras fixent le GDP et le GTP, suggérant une analogie avec les grandes protéines G hétérotrimériques impliquées dans la transduction de nombreux signaux hormonaux. Des anticorps bloquant l'activité de Ras et un mutant

ADRESSE ET TIRÉS A PART

P. Chardin : chargé de recherche à l'Inserm. Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, Cnrs, 660, route des Lucioles, 06560 Valbonne, France.

RÉFÉRENCES

1. Smith MR, DeGudicibus SJ, Stacey DW. Requirement for c-Ras proteins during viral oncogene transformation. *Nature* 1986; 320: 540-3.
2. Feig LA, Cooper GM. Inhibition of NIH3T3 cell proliferation by a mutant Ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 3235-43.
3. Pouliot JF, Béliveau R. Modifications post-traductionnelles des protéines par les lipides. *médecine/sciences* 1994; 10: 65-73.
4. Goud B. Le transport vésiculaire des cellules eucaryotes est contrôlé par des GTP-ases. *médecine/sciences* 1992; 8: 326-33.
5. Fort P, Vincent S. Transduction du signal mitogène, cytosquelette et petites protéines G: vers un réseau de protéines GAP? *médecine/sciences* 1993; 9: 59-65.
6. Camonis JH, Kaléline M, Gondré B, Garreau H, Boy-Marcotte E, Jacquet M. Characterization, cloning and sequence of the CDC25 gene which controls the cyclic AMP level of *S. cerevisiae*. *EMBO J* 1986; 5: 375-80.
7. Bowtell D, Fu P, Simon M, Senior P. Identification of murine homologues of the *Drosophila* *Son of sevenless* gene: potential activators of ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6511-5.
8. Chardin P, Camonis JH, Gale NW, van Aelst L, Schlessinger J, Wigler MH, Bar-Sagi D. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 1993; 260: 1338-43.
9. Galland F, Birnbaum D. Le proto-oncogène *mcf2/dbl* et les facteurs d'échange GDP/GTP. *médecine/sciences* 1992; 8: 819-26.
10. Cen H, Papageorge A, Vass WC, Zhang K, Lowy D. Regulated and constitutive activity by CDC25 Mm (GRF), a Ras-specific exchange factor. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7718-24.
11. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J. The SH2 and SH3 domain containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Cell* 1992; 70: 431-42.
12. Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, Bar-Sagi D, Margolis B, Schlessinger J. Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 1993; 363: 85-8.

« dominant négatif » ont permis de montrer que les protéines Ras sont indispensables à la transformation par les oncogènes à activité tyrosine kinase, mais non par les oncogènes à activité sérine/thréonine kinase [1, 2]. Ces découvertes ont permis de placer les protéines Ras comme intermédiaires entre deux grandes classes d'oncogènes: les récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase et les sérine/thréonine kinases cytosoliques (comme Raf ou Mos). Au début des années 1980, on pouvait donc proposer le schéma: tyrosine kinase → Ras → Raf ou Mos → Myc ou Fos, mais on ne pouvait pas décrire en termes moléculaires les événements représentés par chacune de ces flèches. Il aura fallu une dizaine d'années pour découvrir les principaux acteurs de cette voie de transmission, et comprendre comment ils interagissent.

Modifications post-traductionnelles et localisation des protéines Ras

Immédiatement après leur synthèse sur le ribosome, les protéines Ras possèdent une séquence dite « CAAX » (C = cystéine, A = acide aminé aliphatique, X = n'importe quel acide aminé) à leur extrémité C-terminale; par exemple, la protéine H-Ras se termine par la séquence: Cys-Val-Leu-Ser. Une farnésyl-transférase vient ajouter un groupement farnésyl sur la cystéine, puis une protéase spécifique vient cliver les trois derniers résidus: AAX, et le groupement carboxyle de la cystéine, devenue terminale, est alors méthylé par une carboxyméthyl transférase (*m/s n° 8-9, vol. 9, p. 996*)*. La protéine possède alors une extrémité C-terminale fortement hydrophobe et une grande avidité pour les membranes. L'interaction avec la membrane est encore stabilisée, soit par la présence de plusieurs résidus chargés positivement qui interagissent vraisemblablement avec les charges négatives des phospholipides (c'est le cas de la forme majoritaire de la protéine K-Ras),

* Voir aussi Gingras D, et al. *médecine/sciences* 1994; 10: 55-64.

soit par la palmitoylation de cystéines situées quelques résidus avant la cystéine du « CAAX », dans le cas de la protéine H-Ras, d'une isoforme minoritaire (exon 4A) de K-Ras, et de N-Ras. Ces modifications ont été décrites en détail dans un numéro récent de cette revue [3]; elles permettent d'expliquer l'association des protéines Ras aux membranes. Cependant, elles n'expliquent pas pourquoi les protéines Ras sont très majoritairement associées à la membrane plasmique, alors que d'autres petites protéines G de la même famille sont associées à des compartiments membranaires intracellulaires comme l'appareil de Golgi [4]; on peut penser qu'il existe sur la membrane plasmique une « protéine d'ancrage » pour les protéines Ras.

Structure et cycle fonctionnel des petites protéines G

Les protéines Ras font partie d'une vaste famille de petites protéines fixant le GTP, subdivisée en quatre branches principales: Ras, Rho, Rab et Ran. Elles ont un poids moléculaire de 21 kDa, d'où l'appellation fréquente de « p21Ras », et sont constituées essentiellement d'un domaine globulaire de 160 acides aminés constituant le site de fixation du nucléotide (GDP ou GTP) et d'une région C-terminale variable, longue d'une vingtaine d'acides aminés, qui se termine par la « boîte CAAX ». On connaît les structures tridimensionnelles des deux formes de la protéine Ras: liée au GDP et liée au GTP. La comparaison montre essentiellement deux régions, en positions 30-38 et 61-77, qui changent de structure selon que le GDP ou le GTP est présent dans le site. Les protéines qui reconnaissent uniquement l'une des deux formes, par exemple Raf et GAP (*GTPase activating protein*) qui reconnaissent spécifiquement Ras-GTP, interagissent avec ces régions.

Bien qu'elles contrôlent des aspects différents de la vie cellulaire: transmission des signaux mitogènes pour Ras, réarrangements du cytosquelette pour Rho [5] et trafic intracellulaire pour Rab [4], ces protéines fonctionnent selon le même cycle

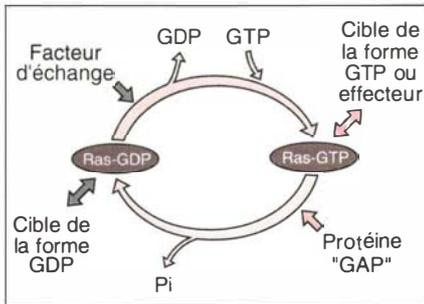


Figure 1. **Le cycle des petites protéines G.** Au repos la petite protéine G est complexée au GDP et interagit avec une cible spécifique de cette forme GDP; un facteur d'échange provoque le départ du GDP et permet au GTP de le remplacer dans le site nucléotidique; la petite protéine G interagit avec une cible spécifique de la forme GTP, l'effecteur, puis intervient une protéine de type GAP, qui provoque l'hydrolyse rapide du GTP et le retour à la forme de départ, complexée au GDP.

de base, analogue à celui des autres protéines G (figure 1). Sous forme GDP, la petite protéine G est complexée à une cible spécifique (GDI (GDP-dissociation inhibiting protein) dans le cas de Rho et Rab), et un facteur d'échange provoque l'ouverture du site et le départ du GDP. Lorsque le GTP entre dans le site, la protéine spécifique de la forme GDP se dissocie, et la petite protéine G sous forme GTP peut interagir avec une cible spécifique de la forme GTP, ou « effecteur ». Après interaction avec cet effecteur, intervient une protéine de type GAP. La rencontre de GAP provoque une hydrolyse rapide du GTP et le retour à la forme de repos liée au GDP. Plusieurs points de ce cycle sont encore mal connus. Dans le cas de Ras, on ne connaît pas la cible de la forme GDP (il pourrait s'agir d'une protéine permettant l'ancrage

spécifique de Ras à la membrane plasmique, une fonction très différente de celle des protéines GDI qui permettent vraisemblablement à Rho et Rab de recycler à travers le cytosol); on ne sait pas si le facteur d'échange se dissocie après le passage de la petite protéine G sous forme GTP; et on ne comprend pas ce qui provoque la dissociation du complexe Ras-GTP/effecteur, pour permettre l'accès de GAP. Dans certains cas GAP et l'effecteur pourraient faire partie d'un même complexe.

On voit cependant que ces petites protéines G se comportent comme des « interrupteurs » moléculaires et contrôlent la formation de deux types de complexes: l'un sous forme GDP, prédominant au repos, et l'autre spécifique de la forme GTP, essentiellement responsable de l'activité de ces protéines (m/s n° 10, vol. 8, p. 1097).

Facteurs d'échange

On appelle « facteur d'échange » toute protéine capable de stimuler de façon catalytique l'échange GDP → GTP sur une petite protéine G

Comme beaucoup de protéines essentielles au contrôle de la division cellulaire, les protéines Ras ont été extrêmement conservées au cours de l'évolution. On trouve chez la drosophile, ou même chez la levure, des protéines Ras très homologues à celles des mammifères. L'efficacité des techniques de génétique chez la levure a permis de découvrir chez cet organisme les premiers facteurs d'échange de Ras appelés CDC25 et SDC25 [6]. Quelques années plus tard, la découverte par l'équipe de Rubin de la protéine Sos (*Son of Sevenless*) de drosophile, impliquée dans la transduction du signal par le récepteur à activité tyrosine kinase, *Sevenless*, et qui possède un domaine homologue aux protéines CDC25 et SDC25, a fortement stimulé les recherches des facteurs d'échange de Ras chez les mammifères et permis de découvrir deux protéines de souris: mSos1 et mSos2 [7], puis humaines: hSos1 et hSos2 [8], qui ont une activité de facteur d'échange spécifique de Ras,

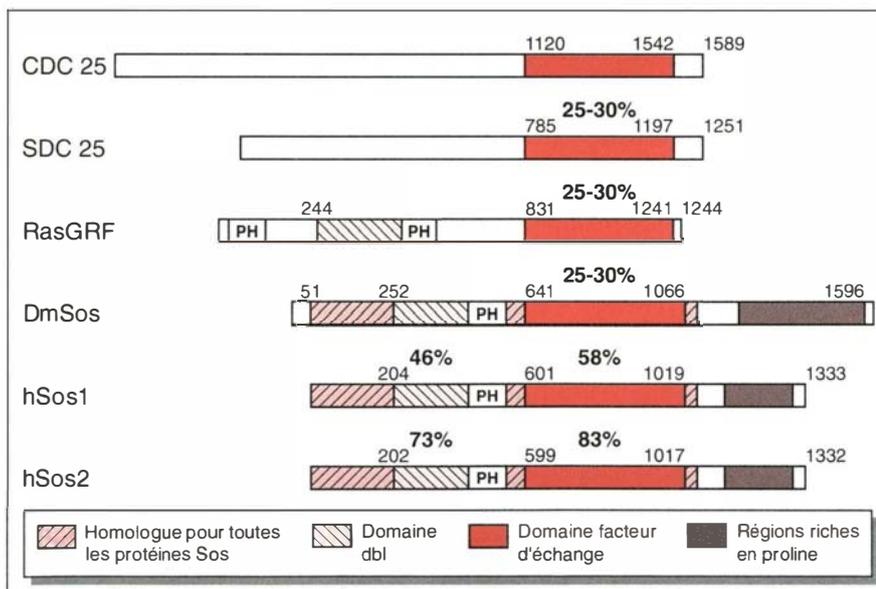


Figure 2. **Structure schématique des principaux facteurs d'échange de Ras.** De haut en bas: les deux premiers facteurs d'échange découverts chez la levure: CDC25 et SDC25; RasGRF: un facteur d'échange de mammifères fortement exprimé dans le cerveau; puis les protéines Sos de drosophile (DmSos) et humaines (hSos1 et 2). Les différents domaines sont représentés par des boîtes de couleurs différentes. Les domaines responsables de l'activité facteur d'échange, représentés en rouge, sont alignés. Les pourcentages indiqués représentent le degré d'identité entre ces différentes protéines dans les domaines concernés. Domaine dbl = domaine homologue pour l'oncogène dbl. PH = domaines d'homologie avec la Pleckstrine, substrat majeur de la PKC dans les plaquettes.

RÉFÉRENCES

13. Rozakis-Adcock M, Fernley R, Wade J, Pawson T, Bowtell D. The SH2 and SH3 domains of Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 1993; 363: 83-5.
14. Buday L, Downward J. Epidermal growth factor regulates p21Ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 1993; 73: 611-20.
15. Barlat I, Schweighoffer F, Chevallier-Multon MC, Duchesne M, Fath I, Landais D, Jacquet M, Tocqué B. The *Saccharomyces cerevisiae* gene product SDC25 C-domain functions as an oncoprotein in NIH3T3 cells. *Oncogene* 1993; 8: 215-8.
16. Van Aelst L, Barr M, Marcus S, Polverino A, Wigler M. Complex formation between Ras and Raf and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6213-7.
17. Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 1993; 74: 205-14.
18. Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR, Avruch J. Normal and oncogenic p21Ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* 1993; 364: 308-13.
19. Warne PH, Rodriguez Viciana P, Downward J. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 *in vitro*. *Nature* 1993; 364: 352-5.
20. Koide H, Satoh T, Nakafuku M, Kaziro Y. GTP dependant association of Raf-1 with Ha-Ras: identification of Raf as a target downstream of Ras in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8683-6.
21. Morrison DK, Heidecker G, Rapp UR, Copeland TD. Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem* 1993; 268: 17309-16.
22. Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahldi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marmé D, Rapp UR. Protein kinase C α activates Raf-1 by direct phosphorylation. *Nature* 1993; 364: 249-52.
23. Fabian JR, Daar IO, Morisson DK. Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7170-9.
24. Cai H, Erhardt P, Troppmair J, Diaz-Meco MT, Sivanandam G, Rapp UR, Moscat J, Cooper GM. Hydrolysis of phosphatidylcholine couples Ras to activation of Raf protein kinase during mitogenic signal transduction. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7645-15.

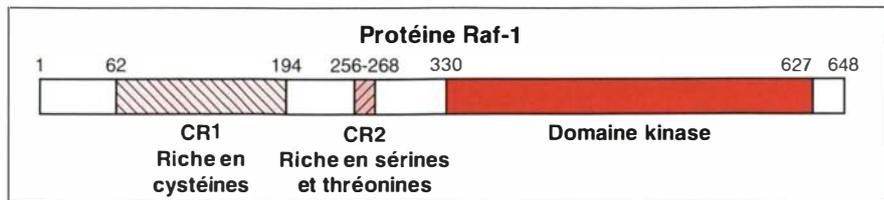


Figure 3. Structure schématique de la protéine Raf, effecteur de Ras. Les différents domaines sont représentés par des boîtes de couleurs différentes. La partie N-terminale porte deux régions régulatrices appelées CR1 et CR2, l'activité sérine/thréonine kinase est portée par la moitié C-terminale. Ras-GTP est en interaction directe avec l'extrémité N-terminale de Raf. L'extrémité C-terminale de Raf forme un complexe avec la kinase MEK (dénommée aussi MAP-kinase-kinase), immédiatement en aval dans la transmission du signal.

sans effet sur les protéines apparentées comme Rap et Ral. Leur poids moléculaire est d'environ 160 kDa; cependant, différents épissages alternatifs pourraient engendrer des formes plus courtes dans certains tissus. La structure primaire des protéines hSos1 et hSos2 (figure 2) montre au moins trois domaines distincts: (1) l'extrémité N-terminale d'environ 600 résidus où l'on trouve une région «dbl» qui pourrait être impliquée dans l'interaction avec des petites protéines G de la famille Rho/Rac [9] et une région d'homologie à la pleckstrine (substrat majeur de la PKC dans les plaquettes), de fonction inconnue pour l'instant, mais qui est trouvée dans de nombreuses autres protéines de transmission; (2) le domaine central qui porte la région «facteur d'échange», homologue des facteurs d'échange de levure CDC25 et SDC25; (3) l'extrémité C-terminale qui porte plusieurs régions riches en prolines. Comme les protéines Ras, ces deux protéines hSos1 et hSos2 sont exprimées de façon ubiquitaire, leurs niveaux d'expression sont semblables dans tous les tissus testés, et leur abondance est très faible (environ 1 ADNc sur 100 000).

Dans le cerveau, il existe une autre protéine: RasGRF (ou «mouse CDC25»), beaucoup plus fortement exprimée que Sos, et qui pourrait être le principal facteur d'échange de Ras dans les cellules nerveuses. Différentes formes de cette protéine sont exprimées à des taux beaucoup plus faibles dans d'autres types de

cellules, et l'activité de la forme la plus longue pourrait être modulée par les facteurs de croissance [10]. L'extrémité C-terminale des protéines Sos a une composition très particulière: elle est très riche en prolines. Comme les domaines SH3 reconnaissent des motifs riches en prolines (voir mini-synthèse p. 709 de ce numéro) et que la protéine Grb2, constituée de deux domaines SH3 entourant un domaine SH2, joue un rôle essentiel dans la transmission du signal entre récepteurs tyrosine kinase et Ras [11], on était tenté de penser que les domaines SH3 de la protéine Grb2 pouvaient interagir directement avec l'extrémité C-terminale de Sos, le complexe Grb2/Sos représentant le «chaînon manquant» entre récepteurs et Ras. Deux des régions riches en prolines de Sos interagissent effectivement avec les deux domaines SH3 de Grb2, et l'on peut co-immunoprécipiter hSos1 avec Grb2 [12]. La quantité de protéine Sos associée à Grb2 est la même, que les cellules aient été stimulées ou non par un facteur de croissance; en revanche, on voit une association rapide de ce complexe Grb2/Sos avec le récepteur de l'EGF après stimulation [12-14]. On peut donc proposer le modèle suivant: la fixation de l'EGF sur son récepteur provoque sa dimérisation et une transphosphorylation sur différentes tyrosines; une de ces tyrosines phosphorylées (en position 1068) lie le domaine SH2 de Grb2, ce qui a pour effet de «transloquer» le com-

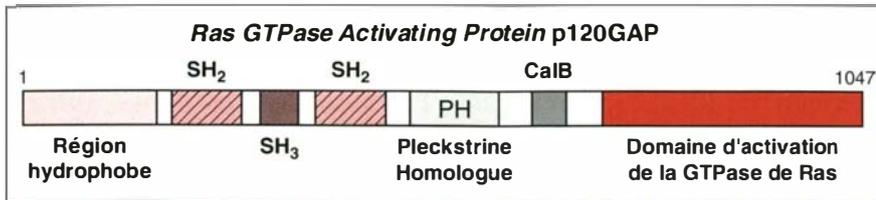


Figure 4. **Structure schématique de la protéine p120-GAP, responsable de l'hydrolyse du GTP sur Ras.** Les différents domaines sont représentés par des boîtes de couleurs différentes. La région N-terminale très hydrophobe pourrait permettre une association avec les membranes. La partie N-terminale porte aussi deux domaines SH2 entourant un domaine SH3, qui pourraient être des sites d'interaction avec les deux protéines p190 et p62. La région notée CalB (calcium binding) est semblable à celle de la phospholipase A2, ce qui pourrait permettre une translocation sous l'effet du calcium. Le domaine responsable de la stimulation de l'hydrolyse du GTP sur Ras (boîte rouge) est situé en C-terminal.

plexe Grb2/Sos à proximité de Ras sous la membrane plasmique. La protéine Sos se trouve alors en position pour promouvoir l'échange GDP → GTP sur Ras.

On trouve des protéines Ras activées par mutation dans environ un tiers des cancers, ce qui montre l'importance de ces protéines dans la transformation et suggère qu'elles pourraient être activées par d'autres mécanismes dans les tumeurs où on ne trouve pas de mutations. Il a déjà été montré que l'expression d'un facteur d'échange déréglé peut conduire à la transformation [15]. Des réarrangements ou des mutations capables d'activer les protéines Sos pourraient donc aussi contribuer à la transformation. Le gène hSos1 est situé sur le chromosome 2 humain (2p16-2p22) et le gène hSos2 sur le chromosome 14 (14q21-14q22) ; ces localisations ne correspondant pas à des régions fréquemment amplifiées ou réarrangées dans les tumeurs, les protéines Sos ne sont donc pas souvent activées par ce type de réarrangement. Il serait intéressant de rechercher une surexpression ou des mutations ponctuelles des protéines Sos dans certaines tumeurs.

Effecteurs

On appelle effecteur la cible spécifique d'une petite protéine G sous forme GTP, partenaire essentiel pour son activité

Plusieurs études récentes montrent que Ras-GTP est capable d'interagir

directement avec l'extrémité N-terminale (domaine régulateur) de la sérine/thréonine kinase Raf (figure 3). Cette interaction a été montrée en recherchant des protéines capables d'interagir avec Ras par le système des « doubles hybrides » chez la levure (*m/s n° 2, vol. 10, p. 206*), dans les deux sens : d'une part, en recherchant des protéines capables d'interagir avec Ras, on a trouvé Raf [16, 17] et, d'autre part, en recherchant des protéines capables d'interagir avec Raf, on a trouvé Ras [18]. Différentes mutations dans le domaine effecteur de Ras (en position 32-42) empêchent l'interaction avec Raf, et l'on observe une corrélation stricte entre la perte de la capacité d'interagir avec Raf et la perte du pouvoir transformant. L'affinité du domaine N-terminal de Raf pour Ras peut être estimée à 50-150 nM [18, 19], ce qui est meilleur que l'affinité de NF-1 (0,25 µM) ou GAP (5 µM), et l'on peut co-immunoprécipiter Ras et Raf [20]. Il est donc clair que Ras-GTP a une bonne affinité pour l'extrémité N-terminale de Raf. Cependant, il reste à comprendre comment l'activité sérine/thréonine kinase de Raf peut être réglée par Ras. L'extrémité C-terminale de Raf est capable de former un complexe stable avec la kinase située immédiatement en aval : MEK, et il semble possible de former un complexe Ras/Raf/MEK, Ras interagissant avec le N-terminal de Raf alors que MEK interagit avec le C-terminal. La phosphorylation de la sérine 621 de Raf

pourrait être indispensable à son activité, mais la kinase responsable de cette phosphorylation reste à découvrir ; on observe aussi la phosphorylation des sérines 43 et 259 [21], et la protéine kinase C (PKC) pourrait jouer un rôle important dans l'activation de Raf, par phosphorylation des sérines 497 ou 499 [22]. Certaines études suggèrent aussi un rôle des tyrosine kinases de la famille Src dans l'activation de Raf, par phosphorylation des tyrosines 340 et 341 [23]. Le rôle de Ras-GTP est vraisemblablement de « transloquer » Raf, ou le complexe Raf/MEK, du cytosol à la membrane plasmique. Ce recrutement à proximité de la membrane pourrait être essentiel à l'activation de Raf, soit par interaction directe de Raf avec certains lipides [24], soit par l'intervention d'une autre protéine associée à la membrane (PKC, Src, phosphatase ?).

Dans les fibroblastes, une augmentation de l'AMPc bloque l'activation de la MAP kinase par Ras, très vraisemblablement en empêchant l'interaction Ras-Raf [25]. Sachant que la protéine Rap1 est phosphorylée par la PKA [26], et interagit avec Raf [18], elle apparaît comme un bon candidat pour inhiber l'interaction Ras-Raf. Il est possible aussi que la PKA phosphoryle directement Raf, sur la sérine 43, et diminue son affinité pour Ras-GTP (*m/s n° 2, vol. 10, p. 235, [27]*). Au contraire, dans les cellules Swiss3T3, Rap-1 stimule la synthèse de l'ADN, sans effet antagoniste sur Ras, et l'AMPc a un effet mitogène. Cet exemple illustre bien la variabilité des effets d'un même second messager selon le contexte cellulaire.

La technique des doubles hybrides a permis de montrer aussi une interaction de Ras-GTP avec l'extrémité C-terminale du facteur d'échange de Ras : RalGDS (Anne Vojtek, communication personnelle), ce qui suggère que l'activation de Ras pourrait aussi contrôler l'activité d'une petite protéine G apparentée, Ral, et renforce la notion de « réseau de petites protéines G » [5]. La protéine Raf est très vraisemblablement l'effecteur responsable de l'activité mitogène de Ras ; cependant, dans certains types cellulaires comme les

RÉFÉRENCES

25. Burgering B, Pronk G, van Weeren P, Chardin P, Bos JL. cAMP antagonizes p21 Ras directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *EMBO J* 1993; 12: 4211-20.

26. Lerosey I, Pizon V, Tavitian A, de Gunzburg J. The cAMP-dependant protein kinase phosphorylates the Rap1 protein *in vitro* as well as in intact fibroblasts, but not the closely related AP2 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 430-6.

27. Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 1993; 262: 1065-8.

28. Kahn A. Les protéines Ras et GAP, des relais sur la voie de transmission du signal passant par l'activation de tyrosine kinases. *médecine/sciences* 1992; 8: 471-5.

29. Ridley AJ, Self AJ, Kasmi F, Paterson HF, Hall A, Marshall CJ, Ellis C. Rho family GTPase activating proteins p190, Ber and RhoGAP show distinct specificities *in vitro* and *in vivo*. *EMBO J* 1993; 12: 5151-60.

30. McGlade J, Brunkhorst B, Anderson D, Mbamalu G, Settleman J, Dedhar S, Rozakis-Adcock M, Chen L, Pawson T. The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J* 1993; 12: 3073-81.

31. Zhang Y, Zhang G, Mollat P, Carles C, Riva M, Frobert Y, Malassiné A, Rostène W, Thang D, Beltshev B, Tavitian A, Thang M. Purification, characterization and cellular localization of the 100 kD human placental GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 1993; 268: 18875-81.

32. Maekawa M, Nakamura S, Hattori S. Purification of a novel RasGTPase-activating protein from rat brain. *J Biol Chem* 1993; 268: 22948-52.

33. Johnson MR, Look AT, DeClue JE, Valentine MB, Lowy DR. Inactivation of the NF1 gene in human melanoma and neuroblastoma cell lines without impaired regulation of GTP-Ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5539-43.

34. Medema RH, de Vries-Smits AMM, van der Zon GCM, Maassen JA, Bos JL. Ras activation by insulin and EGF through enhanced exchange of guanine nucleotides on p21Ras. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 155-62.

35. Li W, Nishimura R, Kashishian A, Batzer A, Kim WJH, Cooper J, Schlessinger J. A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking Grb2/Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 509-17.

cellules nerveuses, Ras n'induit pas la prolifération mais au contraire la différenciation; dans ces cellules, les effecteurs de Ras pourraient donc être différents.

Protéines GAP

On appelle « protéine de type GAP » toute protéine capable de stimuler de façon catalytique l'hydrolyse du GTP sur une petite protéine G

L'hydrolyse du GTP par les protéines Ras isolées est extrêmement lente; pourtant, dans une cellule au repos, Ras se trouve majoritairement sous forme GDP; il doit donc exister une protéine capable de stimuler l'hydrolyse du GTP sur Ras. Au moins deux protéines de ce type ont été découvertes: d'abord la p120-GAP [28], puis la neurofibromine (*m/s n° 1, vol. 8, p. 91*).

La structure de la protéine p120-GAP est schématisée sur la figure 4; l'extrémité N-terminale est très hydrophobe, ce qui pourrait permettre une association avec les membranes; on trouve ensuite deux domaines SH2 qui entourent un domaine SH3 (*mini-synthèse dans ce numéro*) puis une région d'homologie à la pleckstrine, une région notée « CalB » semblable à celle de la phospholipase A2, qui pourrait permettre une translocation membranaire sous l'effet du calcium, et, à l'extrémité C-terminale, la région responsable de la stimulation de l'hydrolyse du GTP sur Ras. Les domaines SH2 de la p120-GAP permettent son interaction avec différents récepteurs tyrosine kinases comme celui du PDGF (*mini-synthèse dans ce numéro*) lorsqu'ils sont activés et autophosphorylés, puis sa phosphorylation sur tyrosine.

Au moins deux protéines sont associées à la p120-GAP: une p190 prédominante et une p62 présente en plus faible quantité. La p190, qui pourrait être un des substrats importants de Src, possède une activité GAP pour Rho [29], ce qui suggère l'existence d'un réseau de petites protéines G [5]. La p62 contient plusieurs motifs riches en prolines qui pourraient interagir avec le domaine SH3 de la p120-GAP; fortement phosphorylée sur des tyrosines après stimulation de nombreux

récepteurs, elle pourrait alors interagir aussi avec l'un des domaines SH2 de la p120-GAP.

La chronologie de fixation des différentes protéines à domaines SH2 sur un récepteur activé est probablement une donnée essentielle qui nous manque pour comprendre en détail ces mécanismes. On peut penser que la fixation du complexe Grb2/Sos intervient précocement, pour activer Ras, alors que le recrutement de la p120-GAP par ses domaines SH2 interviendrait seulement dans une deuxième phase, avec un effet de la partie N-terminale pour réarranger le cytosquelette, peut-être par l'intermédiaire de la p190 et de Rho [30], et un effet de la partie C-terminale pour inactiver Ras. La présence de ces deux activités sur la même protéine suggère qu'elles doivent s'exercer de façon coordonnée.

Une forme plus courte de GAP, dépourvue de l'extrémité N-terminale hydrophobe, la p100-GAP, qui pourrait posséder des propriétés biologiques différentes de la p120-GAP, est présente en quantité importante dans les trophoblastes du placenta [31]. Une protéine de drosophile, Gap1, qui possède une région homologue au domaine d'interaction avec Ras de p120-GAP, joue un rôle de régulateur négatif dans la transduction du signal par le récepteur tyrosine kinase Sevenless. En dehors de sa région « GAP », la protéine Gap1 a peu ou pas d'homologie avec la p120-GAP, alors qu'il y a une forte homologie entre les neurofibromines de drosophile et de l'homme, sur toute leur longueur; on peut donc penser qu'il existe une autre protéine humaine fortement apparentée à Gap1 de drosophile. Des études biochimiques suggèrent aussi la présence chez les mammifères d'une troisième protéine capable de stimuler l'hydrolyse du GTP sur Ras [32]. La neurofibromine, codée par le gène *NF-1*, est impliquée dans la neurofibromatose de type 1, une maladie comportant des symptômes hétérogènes tels que des neurofibromes dégénérant fréquemment en neurofibrosarcomes, des taches « café au lait », et une forte incidence de phéochromocytomes et de

gliomes. La neurofibromine pourrait interagir avec les microtubules, et semble être le principal régulateur négatif de Ras dans les cellules de Schwann, mais pas dans les mélanocytes, ni dans les fibroblastes, où c'est vraisemblablement la p120-GAP qui est le régulateur négatif de Ras [33].

On voit donc la complexité des mécanismes permettant le retour de Ras à sa forme de repos : au moins deux, peut-être trois, protéines « GAP » différentes pourraient être utilisées selon le type de tissu et le type de signal.

Rôle des protéines Ras dans la transmission des signaux mitogènes

Dans les cellules au repos, les protéines Ras sont très majoritairement

complexées au GDP (> 90 % de Ras-GDP) ; la stimulation par des facteurs de croissance, tels que l'EGF ou le PDGF, le NGF, l'insuline, l'IL2, l'IL3 et le GM-CSF, ou la stimulation du récepteur des cellules T, provoquent une augmentation importante de la forme liée au GTP (entre 20 % et 50 % de Ras-GTP, selon les conditions). Ces effets de l'EGF, de l'insuline, et du PDGF sont dus à une stimulation de l'activité du facteur d'échange de Ras [34]. Une fois activé, Ras va, à son tour, provoquer l'activation de la cascade Raf/MAP kinase. Cette voie de transmission des récepteurs tyrosine kinase au noyau est récapitulée sur la figure 5.

La fixation d'un facteur de croissance comme l'EGF provoque la dimérisation de son récepteur et sa transphosphorylation sur plusieurs

tyrosines. Une des tyrosines phosphorylées est spécifiquement reconnue par le domaine SH2 de Grb2, et le complexe Grb2/Sos se retrouve donc à proximité de Ras sous la membrane plasmique, ce qui permet à Sos de promouvoir l'échange GDP → GTP sur Ras. Ras-GTP permet à son tour de « transloquer » Raf (ou le complexe Raf/MEK ?) sous la membrane plasmique, où Raf est activé par une autre protéine associée à la membrane (PKCα ou Src, PC-PLC, phosphatase ?). Après activation, Raf peut phosphoryler MEK, qui, à son tour, phosphoryle la MAP kinase. Cette MAP kinase phosphorylée peut ensuite pénétrer dans le noyau et phosphoryler Elk-1 et/ou Sap-1, des protéines aussi appelées TCF (*ternary complex factors*), qui contrôlent la transcription du gène *c-fos*, et d'autres gènes activés très tôt au cours du cycle cellulaire. La protéine c-Fos forme alors un complexe avec c-Jun, et ce complexe est capable de stimuler la transcription de nombreux gènes impliqués dans la division cellulaire. La MAP kinase pourrait aussi contrôler directement l'activité de c-Jun, Myc, et d'autres facteurs de transcription, par phosphorylation. On peut donc écrire le schéma suivant : récepteur tyrosine kinase → Grb2/Sos → Ras → Raf → MEK → MAP kinase → Elk-1, facteurs de transcription.

Ce type de schéma a été retrouvé dans des cellules humaines et murines, chez la drosophile pour les récepteurs Ellipse, Sevenless et Torso, chez le nématode dans une voie de différenciation, et chez la levure pour la cascade de kinases ; il est donc très vraisemblablement proche de la réalité. Cependant, il pourrait exister de nombreuses variantes : pour certains récepteurs, comme celui de l'insuline, il existe un adaptateur supplémentaire entre le récepteur et Grb2, la protéine Shc (*m/s n° 3, vol. 9, p. 334*) ; une fraction de cette protéine Shc pourrait même ne pas se fixer directement au récepteur mais reconnaître IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*), principale protéine phosphorylée par le récepteur de l'insuline. Shc porte un domaine SH2 capable de s'associer aux motifs contenant des phosphotyrosines de nombreux

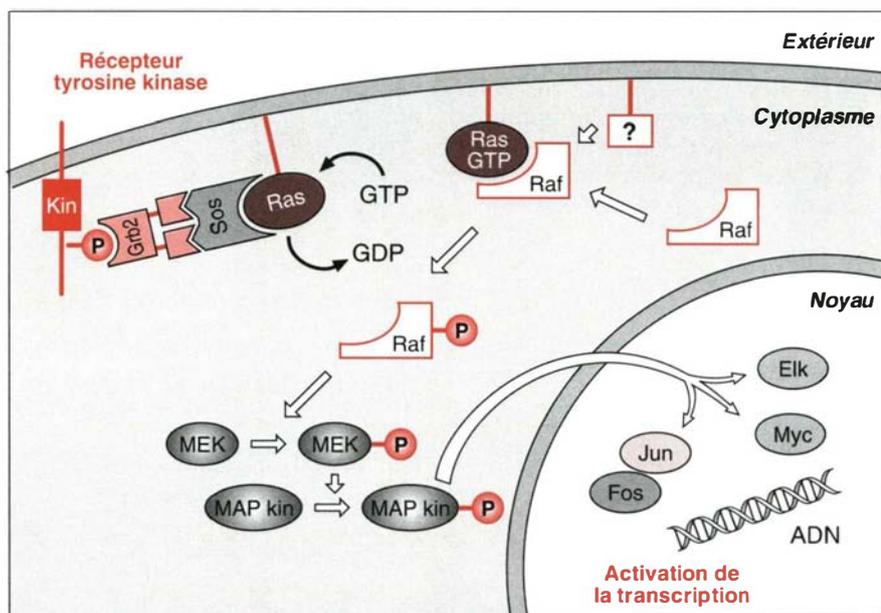


Figure 5. **Rôle de Ras dans la transmission des signaux mitogènes.** La fixation du facteur de croissance provoque la phosphorylation de son récepteur (tyrosine kinase) sur de nombreux résidus tyrosine. Une des tyrosines phosphorylées du récepteur activé est spécifiquement reconnue par le domaine SH2 de Grb2, le complexe Grb2/Sos se retrouve donc à proximité de Ras sous la membrane plasmique, ce qui permet à Sos de promouvoir l'échange GDP → GTP sur Ras. Ras-GTP permet à son tour de « transloquer » Raf sous la membrane plasmique, où une autre kinase comme la PKCα ou Src (?) pourrait contribuer à l'activer. Après activation, Raf peut phosphoryler MEK (MAP kinase kinase), qui à son tour phosphoryle la MAP kinase. Cette MAP kinase phosphorylée peut ensuite pénétrer dans le noyau et phosphoryler des facteurs de transcription comme Elk (appartenant à la famille Ets), Jun ou Myc qui contrôlent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la division cellulaire.

récepteurs activés qui vont, à leur tour, phosphoryler Shc sur plusieurs tyrosines, l'une d'elles étant reconnue par le domaine SH2 de Grb2. Dans le cas du récepteur du PDGF, Grb2 se fixe sur une tyrosine phosphorylée de la protéine tyrosine phosphatase 1D (ou SH-PTP2 ou Syp), qui possède un domaine SH2 et reconnaît la tyrosine 1009 du récepteur du PDGF (*mini-synthèse dans ce numéro*). Outre son activité de tyrosine phosphatase, elle sert donc d'adaptateur pour Grb2 [35]. Dans les lymphocytes T aussi, des adaptateurs différents pourraient relier le complexe Grb2/Sos aux récepteurs. La protéine Shc apparaît cependant comme un adaptateur essentiel dans de nombreux systèmes.

Chaque étape de ce schéma semble pouvoir être modulée positivement ou négativement. Ainsi, une des sérine/thréonine kinases de cette cascade pourrait-elle moduler l'activité de la protéine Sos par phosphorylation; l'AMPc, en activant la protéine kinase A, inhibe l'activation de Raf, alors que la protéine kinase C a un effet stimulateur [19]. On voit donc de nombreuses variations sur un même thème pour cette voie de transmission du signal mitogène. On voit aussi qu'il existe de nombreux mécanismes de régulation, variant d'une cellule à l'autre, qui commencent seulement à être découverts.

Questions en suspens

Le schéma d'ensemble paraît donc élucidé; il faut maintenant en préciser les mécanismes moléculaires. Il reste à comprendre précisément chacune des étapes du cycle de fonctionnement des protéines Ras, en particulier le mode de fonctionnement des facteurs d'échange, le mécanisme d'activation des effecteurs, et comment interviennent les protéines p120-GAP et NF-1. Nous avons vu aussi qu'il existe au moins trois protéines « facteurs d'échange » et deux protéines à activité GAP, chacune ayant plusieurs isoformes; il existe aussi vraisemblablement d'autres effecteurs que Raf. Pour expliquer les effets très différents de Ras — prolifération dans le cas des

fibroblastes, différenciation pour les cellules nerveuses —, il va falloir déterminer l'importance respective de ces différents partenaires de Ras, selon le type de cellule. Par ailleurs, il existe trois protéines Ras différentes: H-Ras, K-Ras et N-Ras, et, pour l'instant, on ne comprend pas le rôle spécifique de chacune. p120-GAP, neurofibromine, Raf, et facteurs d'échange ont l'air d'interagir avec les trois, on peut supposer que la spécificité résidera dans la reconnaissance de « protéines d'ancrage » différentes, mais l'existence de ces protéines est encore purement hypothétique. On trouve plus fréquemment K-Ras muté dans de nombreux types de carcinomes, sauf ceux des reins ou de la vessie où c'est plutôt H-Ras qui est activé, alors que c'est plus fréquemment N-Ras dans les leucémies. Les trois gènes Ras semblent être exprimés à des taux semblables dans ces différents tissus; on ne comprend donc pas les raisons physiologiques qui pourraient expliquer ces activations préférentielles. L'invalidation de chacun des gènes *ras* par recombinaison homologue pourrait apporter une réponse à ces questions sur le rôle physiologique spécifique de chacune des trois protéines Ras ■

Remerciements

Ces recherches sont conduites dans le laboratoire de Marc Chabre, avec Didier Cussac, Matthias Frech et Sonia Paris, en collaboration avec Jacques Camonis, et avec le soutien de l'Association pour la Recherche sur le Cancer.

Summary

Ras proteins and mitogenic signals transduction

Ras proteins are key elements in growth factors signal transduction, from receptor tyrosine kinases to the stimulation of immediate early genes transcription. The major players in this pathway have now been identified. The binding of epidermal growth factor to its receptor induces the dimerization and trans-phosphorylation of the receptor, providing a binding site for Grb2. Grb2 forms a complex with the Ras exchange factors Sos; thus, binding of Grb2 to the receptor at the plasma membrane recruits Sos in a position where it can promote GDP → GTP exchange on Ras. GTP-bound Ras is then able to activate Raf, probably by recruiting Raf at the plasma membrane where other kinases such as PKC or Src may contribute to the activation. Activation of Raf triggers a cascade of phosphorylations, leading to MAPkinases activation and phosphorylation of ternary complex factors such as Elk-1 or Sap-1, controlling *c-fos* transcription. However, the precise physiological role of GAP proteins, stimulating GTP hydrolysis on Ras, the way Ras proteins are specifically targeted to the plasma membrane, the function of Ras in non-dividing cells such as neurons, and the physiological specificities of the three different H-Ras, K-Ras and N-Ras proteins, are not yet understood.