

## La transmission du signal en amont et en aval de Ras

### Du signal extracellulaire à Ras

Nous avons ici, très récemment, rendu compte de l'évolution rapide des connaissances concernant les voies de transmission des signaux passant par les petites protéines G p21<sup>ras</sup> [1]. Depuis cette revue, les choses se sont

précisées, le schéma d'ensemble restant cependant valable. Des signaux perçus par des récepteurs de type tyrosine kinase ou par des récepteurs de cytokines et assimilés aboutissent, par plusieurs intermédiaires, à l'activation de Ras (figure 1). Ces étapes intermédiaires

sont des tyrosine kinases cytoplasmiques dans le cas des récepteurs des cytokines, puis toute une famille de molécules à domaines SH2 et SH3 (*Sarc homology 2* et 3), les premiers assurant une interaction spécifique avec des séquences incluant une tyrosine phos-

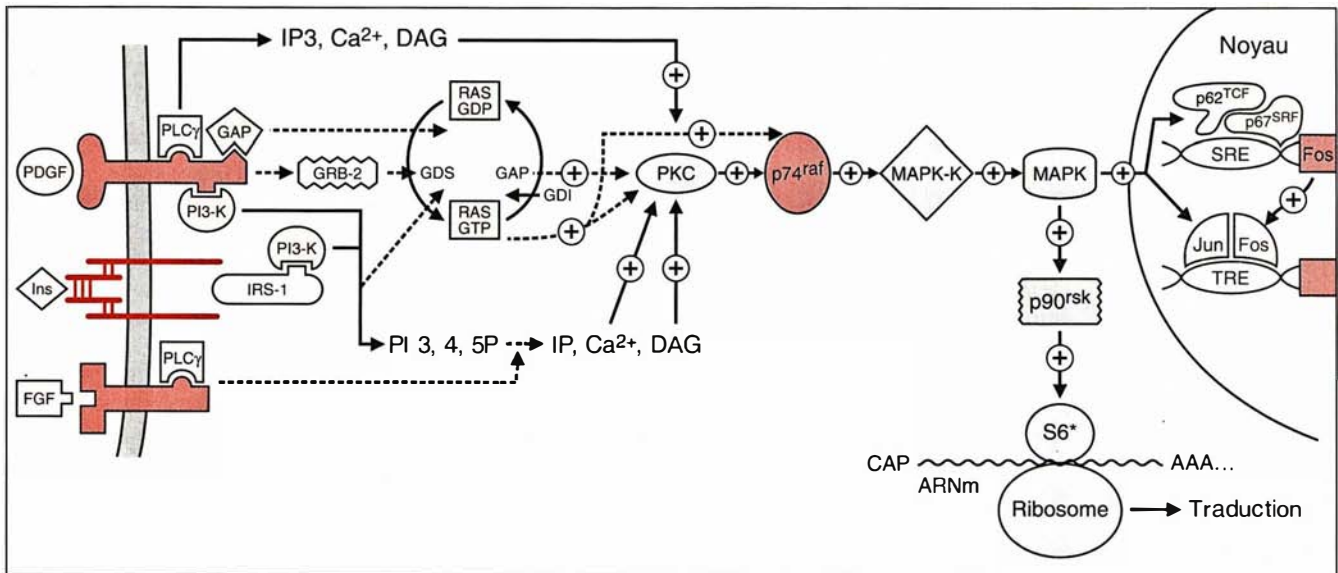


Figure 1. **Schéma de la transmission d'un signal extracellulaire jusqu'à la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle.** Des récepteurs (ici ceux de l'insuline, du platelet-derived growth factor (PDGF) et du fibroblast growth factor (FGF)) sont activés par la fixation de leurs ligands, stimulant leurs activités de tyrosine kinase et d'autophosphorylation sur des tyrosines. Les tyrosines phosphorylées font partie de motifs peptidiques interagissant spécifiquement avec les motifs SH2 de diverses protéines, la p120-GAP, la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) et la p85-ptdIns3-K (p13-K). PLC $\gamma$  et PI3-K peuvent engendrer des seconds messagers par hydrolyse des phosphatidylinositol phosphates (PI4,5-P2, PI3-4,5-P3) : inositol phosphates (IP3, IPX), diacylglycérol (DAG), Ca<sup>2+</sup> libéré sous l'effet des inositol-phosphates. DAG et Ca<sup>2+</sup> peuvent activer la protéine kinase C (PKC). Dans le cas du récepteur de l'insuline, l'activation de la p13-K est relayée par un substrat de la tyrosine kinase/récepteur, la p185-IRS-1. Des « intermédiaires » constitués de domaines SH2 et SH3, par exemple GRB-2 chez les mammifères, contribuent à véhiculer le signal vers Ras-GDP, activé en Ras-GTP ; l'échange du GDP par du GTP est catalysé par les protéines GDS alors que l'échange inverse est inhibé par des protéines GDI qui pourraient également inhiber GAP. La protéine p120-GAP stimule l'hydrolyse du GTP en GDP, mais pourrait aussi transmettre le signal d'activation en aval, vers la PKC et/ou p74<sup>raf-1</sup>. La PKC, activée par l'intermédiaire de Ras-GTP/GAP ou, directement, par le DAG et Ca<sup>2+</sup>, activerait la sérine-thréonine kinase p74<sup>raf-1</sup>. Celle-ci activerait, en cascade, une MAP kinase-kinase (MAPK-K), puis une MAP-kinase (MAPK) dont les substrats sont divers, comprenant notamment des facteurs de transcription (p62<sup>TCF</sup>, c-Jun) et une S6 kinase, la p90<sup>rsk</sup>. La protéine p62<sup>TCF</sup> phosphorylée formerait plus facilement un complexe activateur avec p67<sup>SRF</sup> sur l'élément SRE (serum response element) du gène c-fos, et d'autres gènes à réponse ultra-rapide aux inducteurs de la croissance et de la prolifération. La protéine Fos ainsi synthétisée se complexerait à c-Jun, elle-même activée par la MAPK, pour former le complexe AP-1 qui se fixe au TRE (TPA response element) et stimule, lui aussi, la transcription de nombreux gènes activés lors de la prolifération cellulaire (ou, parfois, lors de leur différenciation). Enfin, la phosphorylation de la protéine ribosomique S6 contribuerait à l'augmentation de l'activité traductionnelle contemporaine de l'activation cellulaire. Les effets démontrés sont symbolisés par des flèches et des lignes pleines, le signe + indiquant une activation. Les effets supposés, ou dont les modalités sont encore peu connues, sont symbolisés par des pointillés.

phorylée et les seconds jouant probablement un rôle dans le contact avec des protéines du cytosquelette, particulièrement l'actine, et d'autres protéines [2]. Certaines de ces molécules sont dotées d'activités enzymatiques bien précisées, par exemple les sous-unités régulatrices p85  $\alpha$  et  $\beta$  de la phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3-K), qui contiennent également un domaine de type GAP (*GTP-ase activating protein*), la protéine p120-GAP active sur Ras et la phospholipase C $\gamma$ . D'autres molécules à domaines SH2-SH3 joueraient uniquement un rôle d'intermédiaire, non encore bien précisé, comme Sem5 de *Caenorhabditis elegans*, GRB-2 (son équivalent humain) et Crk-like (le probable équivalent chez la drosophile) [3, 4]. Ces protéines pourraient coupler les récepteurs à des facteurs d'échange GDS (*GDP-exchanger stimulatory proteins*) comme Sos de *Drosophila* [1], GRF<sup>ras</sup> [5, 6] ou Dbl [7]. D'autres facteurs intermédiaires seraient spécifiques de certains récepteurs : par exemple, contrairement au récepteur du PDGF, le récepteur de l'insuline semble incapable d'activer directement p85-PtdIns3-K. En fait, la stimulation de l'activité kinase du récepteur, consécutive à la fixation de l'hormone, aboutit à la phosphorylation sur une tyrosine de p185-IRS-1 qui interagit alors avec le domaine SH2 de la p85-PtdIns3-K et l'active. Le site phosphorylé d'IRS-1 est du type Tyr-Met-X-Met, similaire au site spécifique d'interaction de la p85-PtdIns3-K avec le récepteur du PDGF [8, 9]\*. Le fait que de nombreuses molécules impliquées dans ces interactions entre des tyrosine kinases et des protéines à domaines SH2-SH3 aient des activités, putatives ou avérées, de facteur d'échange (p95<sup>va</sup>) [7] ou de GAP (p120-GAP, p85-PtdIns3-K, 3 BPI [6-8]) suggère les mécanismes par lesquels pourraient être activées les protéines Ras.

\* La famille des adaptateurs à domaine SH2 et SH3 comporte aussi des produits d'oncogènes, avérés (*crk* [24]) ou potentiels (*Nck* [25, 26]) qui semblent, eux aussi, coupler des tyrosine kinases à des effecteurs aval. Phosphorylables sur des tyrosines, des sérines et des thréonines, ces protéines pourraient intégrer des signaux divers provenant de facteurs de croissance, d'activateurs de la protéine kinase C et de la protéine kinase A stimulée par l'AMPc [27].

### De Ras aux effecteurs ultimes

Nous avons vu que les protéines GAP pouvaient, soit n'être que des « désactivateurs » de Ras (transformant Ras-GTP en Ras-GDP), soit être des transducteurs amont du signal [1]. Un tel schéma de désensibilisation de Ras-GTP par interaction avec un effecteur aval (ici p120-GAP) a trouvé récemment sa correspondance au niveau des grandes protéines G trimériques : l'activité GTP-ase intrinsèque de la sous-unité  $\alpha$ -GTP de la protéine G<sub>q/11</sub> peut être stimulée par interaction avec sa cible, phospholipase C- $\beta$ 1 [11, 12], alors que, dans les photorécepteurs, c'est la phosphodiesterase qui stimulerait l'hydrolyse du GTP lié à la sous-unité  $\alpha$  de la transducine (*m/s n° 7, vol. 8, p. 731*) [13]. Plus en aval encore, on peut placer la sérine-thréonine kinase p74<sup>raf</sup> (Raf-1), dont l'inactivation bloque l'effet prolifératif de Ras-GTP mais dont l'activation ne nécessite pas la mise en jeu d'une protéine Ras fonctionnelle [14]. Raf-1 est un substrat potentiel de la protéine kinase C (qui semble activée par les signaux empruntant la voie de Ras [15, 16]). Cependant, selon les systèmes cellulaires, l'effet prolifératif des activateurs de la protéine kinase C (les esters de phorbol) exige ou n'exige pas un système Ras fonctionnel [16], ce qui permet de suggérer que la protéine kinase C serait un intermédiaire conditionnel entre Ras et Raf (*figure 1*). Raf est capable d'activer les MAP-kinases. Les MAP-kinases (*mitogen-activated protein kinases*) encore appelées ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) sont des sérine/thréonine kinases de 40 à 46 kDa stimulées par une grande diversité de signaux extracellulaires entraînant la prolifération (par exemple EGF, PDGF, FGF...) ou la différenciation (par exemple NGF, l'insuline dans certains systèmes) [17]. Les MAP-kinases peuvent être phosphorylées sur des résidus tyrosines aussi bien que sérines et/ou thréonines. Cependant, il ne semble pas qu'elles soient des substrats directs des récepteurs dotés d'activité tyrosine kinase ou des tyrosine kinases non récepteurs comme Src ou Abl. En réalité, leur activation par phosphorylation est l'aboutissement d'une cascade de protéine kinases comprenant aussi des MAP kinases-kinases (MAPK-K-K) et des MAP-kinases-kinases (MAPK-K).

Raf-1 est probablement l'un des partenaires situé en amont de cette cascade, peut-être identique à une MAPK-K-K [16, 18, 19]. Si la MAPK-K-K est le seul substrat physiologique de Raf-1 connu à ce jour, les MAPK ont, en revanche, de très nombreux substrats, dont certains appartiennent directement à la machinerie transcriptionnelle. La phosphorylation de p62<sup>TCF</sup> [20], probablement équivalente à Elk 1 (un facteur de transcription de la famille *ets* [21,22]), pourrait être particulièrement importante. En effet, une telle phosphorylation stimule la constitution *in vitro* d'un complexe ternaire entre l'élément d'ADN SRE (*serum response element*) et les protéines SRF (p67<sup>SRF</sup>) et p62<sup>TCF</sup> [20]. Or, un tel complexe est essentiel à la réponse transcriptionnelle de gènes stimulés très rapidement par le sérum, les facteurs de croissances, l'insuline et les esters de phorbol, tel l'oncogène *c-fos* [21,22]. Ce phénomène pourrait, par conséquent, expliquer l'effet de l'insuline, d'EGF et d'autres agents sur l'induction transcriptionnelle de gènes à réponse très précoce, comme *c-fos*. Par ailleurs, des MAPK auraient aussi comme substrat le composant c-Jun du complexe API (complexe Jun/Fos), pouvant également, par cet intermédiaire, stimuler d'autres gènes répondant aux inducteurs de la prolifération cellulaire (*figure 1*) [23].

Toute activation mitogénique des cellules aboutit à une stimulation de la synthèse protéique et à la phosphorylation de la protéine ribosomique S6 sur de multiples sites. Récemment, la cascade terminale aboutissant à la phosphorylation de certains de ces sites a été élucidée : elle comporte plusieurs S6-kinases, de 70 kDa et 90 kDa. Cette dernière kinase appartient à la famille Rsk (p90<sup>rsk</sup>) et est très probablement un substrat des MAPK [17]. En revanche, l'activation de la p70-S6-kinase, dont nous avons vu qu'elle est bloquée par l'immunosuppresseur rapamycine (*m/s n° 8, vol. 8, p. 868*), ne passe pas par ces MAPK. En peu de temps, la chaîne réactionnelle liant la perception d'un signal extracellulaire à des réponses transcriptionnelles et traductionnelles a donc été presque complètement élucidée, avec ses multiples cascades de phosphorylations activatrices qui, s'il était besoin, confirment combien est justifié le prix

Nobel de médecine accordé cette année à E. Fischer et E. Krebs (*m/s* n° 8, p. 840 et n° 9, vol. 8, p. 1007). Le fait que l'étude de ces mécanismes soit à la frontière de la biochimie, de la biologie cellulaire et de la génétique moléculaire, qu'ils soient impliqués aussi bien dans la stimulation de la prolifération que dans la réponse hormonale, la différenciation cellulaire ou l'activation des cellules du système immunitaire, dit assez combien il s'agit là de processus centraux dans l'adaptabilité et la réactivité des cellules vivantes ■

## TIRÉS A PART

A. Kahn

### Axel Kahn

Directeur de l'Inserm U. 129

ICGM, Inserm U. 129

Unité de génétique et de pathologie moléculaires, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

## RÉFÉRENCES

- Kahn A. Les protéines Ras et GAP, des relais sur la voie de transmission du signal passant par l'activation des tyrosine kinases. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 471-5.
- Fawson T, Gish GD. SH2 and SH3 domains : from structure to function. *Cell* 1992 ; 71 : 359-62.
- Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 1992 ; 70 : 431-42.
- Williams LT. Missing links between receptors and Ras. *Curr Biol* 1992 ; 2 : 601-3.
- Shou C, Farnsworth CL, Neel BG, Feig LA. Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature* 1992 ; 358 : 351-4.
- Fort P, Vincent S. Transduction du signal mitogène, cytosquelette et petites protéines G : vers un réseau de protéines GAP ? *médecine/sciences* 1993 (sous presse).
- Galland F, Birnbaum D. Le proto-oncogène *mcfl2/dbl* et les facteurs d'échange GDP-GTP. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 819-26.
- Backer JM, Myers MG, Shoelson SE, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* 1992 ; 11 : 3469-79.
- Pazin MJ, Williams LT. Triggering signalling cascades by receptor tyrosine kinases. *Trends Biochem Sci* 1992 ; 17 : 374-8.
- Cicchetti P, Mayer BJ, Thiel G, Baltimore D. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science* 1992 ; 257 : 803-6.
- Berstein G, Blank JL, Jhon DY, Exton JH, Rhee SG, Ross EM. Phospholipase C- $\beta$ /1 is a GTPase-activating protein for G9/11, its physiologic regulator. *Cell* 1992 ; 70 : 411-8.
- Ross EM. Twists and turn on G-protein signalling pathways. *Curr Biol* 1992 ; 2 : 517-9.
- Arshavsky VY, Bownds MD. Regulation or deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP. *Nature* 1992 ; 357 : 416-7.
- Kolch W, Heidecker G, Lloyd P, Rapp UR. Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature* 1991 ; 349 : 426-8.
- Sözeri O, Vollmer K, Liyanage M, et al. Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* 1992 ; 7 : 2259-62.
- Howe LR, Leever SJ, Gomez N, et al. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 1992 ; 71 : 335-42.
- Pelech SL, Sanghera JS. MAP kinases : charting the regulatory pathways. *Science* 1992 ; 257 : 1355-6.
- Kyriakis JM, App H, Zhang XF, et al. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 1992 ; 358 : 417-21.
- Dent P, Haser W, Haystead TAJ, Vincent LA, Roberts TM, Sturgill TW. Activation of mitogen-activated protein kinase-kinase by v-Raf in NIH 3T3 and *in vitro*. *Science* 1992 ; 257 : 1404-7.
- Gille H, Sharrocks AD, Shaw PE. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-Fos promoter. *Nature* 1992 ; 358 : 414-7.
- Blanchard JM. Le proto-oncogène *c-fos*, un entremetteur moléculaire. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 455-70.
- Gauthier-Rouvière C, Vandromme H, Cavadore JC, Lamb N, Fernandez A. SRF, un régulateur transcriptionnel contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire. *médecine/sciences* 1992 ; 9 : 958-65.
- Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 1992 ; 353 : 670-4.
- Reichman CT, Mayer BJ, Keshav S, Hanafusa H. The product of the cellular *crk* gene consists primarily of SH2 and SH3 regions. *Cell Growth Differ* 1992 ; 3 : 451-60.
- Chou MM, Fajardo JE, Hanafusa H. The SH2 and SH3-containing Nck protein transforms mammalian fibroblasts in the absence of elevated phosphotyrosine levels. *Mol Cell Biol* 1992 ; 12 : 5834-42.
- Hu WMP, Skolnik EY, Ullrich A, Schlessinger J. The SH2 and SH3 domain-containing Nck protein is oncogenic and a common target for phosphorylation by different surface receptors. *Mol Cell Biol* 1992 ; 12 : 5824-33.
- Park D, Rhee SG. Phosphorylation of Nck in response to a variety of receptors, phorbol myristate acetate, and cyclic AMP. *Mol Cell Biol* 1992 ; 12 : 5816-23.